



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

DANIEL DE ARAÚJO BRITO BUTTROS

**Associação das HSP 60 e 70 com fatores de risco
cardiovascular em mulheres na pós-menopausa
tratadas de câncer de mama**

DEFESA DE DOUTORADO

Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahas

Co-Orientador: Prof. Dr. Claudio Lera Orsatti

Botucatu

2018

DANIEL DE ARAÚJO BRITO BUTTROS

Associação das HSP 60 e 70 com fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama

Defesa apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientadora: Profa. Livre Docente Eliana Aguiar Petri Nahas
Co-Orientador: Prof. Dr. Claudio Lera Orsatti

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Buttros, Daniel de Araújo Brito.

Associação das HSP 60 e 70 com fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama / Daniel de Araújo Brito Buttros. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Eliana Aguiar Petri Nahás
Coorientador: Cláudio Lera Orsatti
Capes: 40101150

1. Mamas - Câncer - Prevenção. 2. Menopausa. 3. Sistema cardiovascular - Doenças. 4. Proteínas de choque térmico. 5. Síndrome metabólica.

Palavras-chave: câncer de mama; doença cardiovascular; heat shock proteins; menopausa; síndrome metabólica.



Igreja de Santo Antônio - Rubião Júnior, Botucatu.

“Há um DEUS que por todas as dores fará acontecer LUZ.”

POEMA DA ONCOLOGIA

*“Haverá dores que como todas
causarão angústias.*

*Haverá dores que, por obscuras
origens, causarão a dor das
limitações.*

*Haverá dores que resolvidas
causarão sorrisos.*

*Haverá LUZ no horizonte das
obscuras dores que as tornarão
lúcidas.*

*Há um DEUS que por todas as
dores fará acontecer a LUZ”.*

Ibrahim Buttros, meu querido pai.



*Ao meu querido Professor Gilberto Uemura,
Dedico essa obra singela e carinhosa, com a
certeza que contribuirá para o enriquecimento da
MASTOLOGIA que o senhor me ensinou.*

Daniel

DEDICATÓRIA

*“Não sei se os meus outubros
continuarão rosa... certamente
não. Aliás, acho que muitos de nós
perdemos hoje um pouco da nossa
cor preferida. Rosa cuja sinonímia
remete a alegria, prazer e
felicidade. Rosa da delicada flor,
do amor. Rosa do brasão do CAM
"Centro de Avaliação em
Mastologia" da UNESP de
Botucatu; que estampamos no
peito. Rosa símbolo da nossa luta,
que o senhor, nosso PROFESSOR,
nos apresentou. Amado Professor
Gilberto Uemura, esteja com DEUS
e nos ilumine na reconquista da
nossa cor”.*

Escrito por mim em 16 de outubro de 2016,

e desde então, na busca da minha cor.



DEDICATÓRIA

“Medicina se aprende em casa.”

Prof. José Aristodemo Pinotti

Aos nossos amados pais, Marina e Ibrahim,

*Dignos da brilhante trajetória na formação de três
grandes médicos.*

Obrigado por tudo. Amamos vocês.

Daniel, Davi e Luciana



DEDICATÓRIA

“Dizem que sou louco, por pensar assim. Se eu sou muito louco, por eu ser feliz. Mas louco é quem me diz, e não é feliz, não é feliz”.

Rita Lee

Aos meus amores Regina, Isabela e Lara,

*Donas da minha felicidade, e motivo da convicção
que tenho de que a vida é maravilhosa.*

Amo vocês.

Esposo e Papai

*A Deus, por me conceder a felicidade desde o dia
em que eu nasci.*

*Aos amigos Eliana e Jorge,
Por toda cumplicidade, dedicação e carinho
que sempre tiveram pela família Buttros.*

*Ao Professor Claudio Orsatti,
pelo apoio e orientação.*

*Às minhas pacientes, pela lealdade e
certeza de que dividimos os mesmos sentimentos.*

AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

*“E seja sobre nós, a graça do
Senhor nosso DEUS”.*

Salmo 90:17

Preferido da minha amada Avó Lourdes.

*À Santa de Casa de Rio Claro,
por apoiar e acreditar nesse projeto.*

*À Profa Maria Aparecida Marin,
por todo o carinho e retaguarda.*

*Ao amigo Mauro,
pela confiança e belíssima parceria diária.*

*Ao amigo-irmão Caio Albertini,
pela brilhante parceria científica de sempre.*

*Às amigas, Solange Sako, Nivea, Carla,
Jandira e toda a equipe de funcionárias da
oncologia da Santa Casa, por toda a ajuda na
execução desse projeto.*

AGRADECIMENTOS

*“Tu te tornas eternamente
responsável por aquilo que
cativas”.*

Antoine de Saint-Exupéry

1999-2004: *Graduação em Medicina pela Faculdade de Medicina de Sorocaba / PUC-SP.*

2005-2008: *Residência Médica em Ginecologia e Obstetrícia pela Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP.*

2007: *Título de Especialista em Ginecologia e Obstetrícia (TEGO/ FEBRASGO).*

2008-2010: *Residência Médica em Mastologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP.*

2010: *Título de Especialista em Mastologia (TEMA / SBM).*

Habilitação em Mamografia (CBR).

2010-2012: *Mestrado em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP.*

Estudo: “Síndrome Metabólica em Mulheres na Pós-Menopausa Tratadas de Câncer de Mama”.

2016-2018: *Aluno regular, nível doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, pela Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP.*

Estudo: “Associação das HSP 60 e 70 com fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama”.

2018: *Coordenador do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Curso de Medicina da Faculdade Claretiano/Rio Claro. Membro do Núcleo Docente Estruturante.*

BIOGRAFIA

“Cada um de nós compõe a sua história. Cada ser em si carrega o dom de ser capaz. E ser feliz”.

Renato Teixeira e Almir Sater

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| Lista de Abreviaturas | 12 |
| Resumo | 13 |
| Abstract | 15 |
| 1. Introdução | 17 |
| 2. Objetivos | 36 |
| 3. Métodos | 37 |
| 4. Resultados | 46 |
| 4.1. Artigo Original | |
| “Alto Risco de Doença Cardiovascular em Mulheres na Pós-Menopausa Tratadas de Câncer de Mama” | |
| 5. Conclusões | 80 |
| 6. Referências | 81 |
| 7. Anexos | |
| 7.1. Anexo I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. | 95 |
| 7.2. Anexo II- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB. | 97 |
| 7.3. Questionário | 101 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS - *American Cancer Society*

AHA – *American Heart Association*

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

ASCO - *American Society of Clinical Oncology*

CAP - *College of American Pathologists*

CBR – Colégio Brasileiro de Radiologia

CC - Circunferência da Cintura

CMI - Complexo Médio-Intimal

CT - Colesterol Total

DCV - Doença Cardiovascular

FISH - Hibridização Fluorescente *in situ*

FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

HER2 - Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2

HDL - *High Density Lipoprotein*

HSP - *Heat Shock Protein*

IA - Inibidores da Aromatase

IC - Intervalo de Confiança

IDF - *International Diabetes Federation*

IGF-1 - Fator de Crescimento Insulina-Like-1

IMC - Índice de Massa Corpórea

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IHQ - Imunohistoquímica

Ki67- Atividade Proliferativa Epitelial

LDL - *Low Density Lipoprotein*

MDM2- *Mouse double minute 2 homolog*

MetS - Metabolic Syndrome

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

NCEP/ATP III - *National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III*

OMS - Organização Mundial da Saúde (OMS)

OR - *Odds Ratio*

RCV - Risco Cardiovascular

RCQ - Relação Cintura-Quadril

RE - Receptor de Estrogênio

RI - Resistência Insulínica

RP - Receptor de Progesterona

RR - Risco Relativo

SBM - Sociedade Brasileira de Mastologia

SG - Sobrevida Global

SHBG - Globulina Carreadora de Hormônios Sexuais

SM - Síndrome Metabólica

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG - Triglicerídeos

TH - Terapia Hormonal

THaE - Terapia Hormonal anti-Estrogênica

TMX - Tamoxifeno

TLD - Tempo Livre de Doença

UNESP - Universidade Estadual Paulista

WHO - World Health Organization

Resumo

Objetivo: Avaliar os fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama comparadas a mulheres na pós-menopausa sem câncer de mama e a associação das *heat shock proteins* (HSP) 60 e 70 com o câncer de mama em mulheres na pós-menopausa.

Métodos: Realizou-se estudo clínico de corte transversal com 96 mulheres tratadas de câncer de mama comparadas a 192 mulheres na pós-menopausa (controle), com idades entre 45 e 75 anos. Foram incluídas no grupo principal mulheres com amenorréia > 12 meses e idade \geq 45 anos, com diagnóstico histológico de câncer de mama, sem doença metastática e sem doença cardiovascular (DCV) estabelecida. O grupo controle foi constituído por mulheres com amenorréia > 12 meses, idade \geq 45 anos, sem câncer de mama e DCV. Os grupos foram pareados por idade, tempo de menopausa e índice de massa corpórea (IMC) na proporção 1 caso para 2 controles, conforme cálculo amostral, com o mínimo de 92 pacientes tratadas de câncer de mama. Dados clínicos e antropométricos (IMC e circunferência da cintura) foram coletados por meio de entrevista e exame físico. Para análise bioquímica foram solicitados colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, glicose e insulina. Foram consideradas com síndrome metabólica (SM), as mulheres que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos: circunferência da cintura (CC) > 88 cm; TG \geq 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial \geq 130/85 mmHg; glicose \geq 100 mg/dL. Para determinação das concentrações plasmáticas de HSP 60 e 70 foram empregados imunoenaios pela técnica de ELISA. A doença aterosclerótica foi determinada pela espessura do complexo médio-intimal (CMI > 1mm) das artérias carótidas e/ou pela presença de placa ateromatosa, avaliadas pela ultrassonografia carotídea (*scanner*

duplex). Para análise estatística foram empregados: Teste *t-student*, Distribuição Gama (variáveis assimétricas), Teste do Qui-Quadrado e Regressão Logística (*odds ratio*-OR).

Resultados: A média de idade das pacientes tratadas de câncer de mama foi de $59,8 \pm 9,0$ anos com tempo médio de seguimento de $4,2 \pm 2,0$ anos. Na comparação entre os grupos, mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram valores médios elevados da pressão sistólica e diastólica ($p < 0.001$) e valores médios de triglicerídeos e glicose, acima dos valores desejáveis ($p < 0.05$). As pacientes do grupo principal apresentaram valores mais altos de HSP 60 e mais baixos de HSP 70 quando comparados ao controle ($p < 0.05$). Foi observada maior ocorrência de diabetes, SM e placa ateromatosa entre as mulheres tratadas de câncer mama quando comparadas ao controle (19,8% vs 6,8%; 54,2% vs 30,7%; 19.8% vs 9.4%, respectivamente) ($p < 0.05$). Na análise de risco ajustado para idade, tempo de menopausa e IMC, as mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram risco significativamente aumentado para SM (OR=4.21; IC 95% 2.28-7.76), presença de placa ateromatosa (OR=2.61; IC 95% 1.19-5.72), diabetes (OR=4.42; IC 95% 1.86-10.49), hipertrigliceridemia (OR=2.32; IC 95% 1.33-4.0) e circunferência de cintura aumentada (OR=11.22; IC 95% 4.0 – 31.65), quando comparadas as mulheres sem câncer de mama.

Conclusão: Mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram maior risco para síndrome metabólica, diabetes, doença aterosclerótica, hipertrigliceridemia e obesidade abdominal, importantes fatores de risco para doença cardiovascular, quando comparadas as mulheres na pós-menopausa sem câncer de mama. Assim como, mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram valores elevados de HSP 60 e diminuídos de HSP 70 quando comparadas às mulheres sem câncer.

Abstract

Objective: To evaluate cardiovascular risk factors in postmenopausal breast cancer survivors as compared to postmenopausal women without breast cancer and the association of heat shock proteins (HSP) 60 and 70 with breast cancer in postmenopausal women.

Methods: In this cross-sectional study, 96 postmenopausal breast cancer survivors were compared with 192 postmenopausal women (controls), aged 45 to 75 years. The principal group included women with amenorrhea > 12 months and age ≥ 45 years, with histological diagnosis of breast cancer, without metastatic disease and without established cardiovascular disease (CVD). The control group consisted of women with amenorrhea > 12 months, age ≥ 45 years, without breast cancer and CVD. The groups were matched by age, time since menopause, and body mass index (BMI) in the proportion 1 case for 2 controls, according to the sample calculation, with a minimum of 92 breast cancer survivors. Clinical and anthropometric data (BMI and waist circumference) were collected by interview and physical examination. For biochemical analysis, total cholesterol, HLD, LDL, triglycerides, glucose and insulin levels were measured. Women who presented three or more of the following criteria were diagnosed as having metabolic syndrome (MetS): waist circumference (WC) > 88 cm; TG ≥ 150 mg/dL; HDL cholesterol < 50 mg/dL; blood pressure $\geq 130/85$ mmHg; glucose ≥ 100 mg/dL. For measuring plasma concentrations of HSP 60 and 70, immunoassays by ELISA technique were used. Atherosclerotic disease was determined by the intima-media thickness (IMT > 1mm) of the carotid arteries and / or by the presence of atheromatous plaque, assessed by carotid ultrasound (scanner duplex). For statistical

analysis, Student's t-test, Gamma Distribution (asymmetric variables), Chi-Square Test, and Logistic Regression (odds ratio-OR) were used.

Results: The mean (\pm SD) age of breast cancer survivors was 59.8 ± 9.0 years, with a mean (\pm SD) follow-up of 4.2 ± 2.0 years. The breast cancer survivors presented high mean values of systolic and diastolic pressure ($p < 0.001$), and mean values of triglycerides and glucose, above the desirable values ($p < 0.05$). Patients with breast cancer had higher levels of HSP 60 and lower HSP 70 when compared to control ($p < 0.05$). There was a higher occurrence of diabetes, MetS, and atheromatous plaque among the breast cancer survivors when compared to the control group (19.8% vs 6.8%, 54.2% vs. 30.7%, 19.8% vs. 9.4% respectively) ($p < 0.05$). In the risk analysis adjusted for age, time since menopause and BMI, women treated for breast cancer had a significantly increased risk for MetS (OR = 4.21, 95% CI 2.28-7.76), presence of atheromatous plaque (OR = 2.61, CI 95% CI 1.19-5.72), diabetes (OR=4.42; IC 95% 1.86-10.49), hypertriglyceridemia (OR = 2.32, 95% CI 1.33-4.0) and large waist circumference (OR = 11.22, 95% CI 4.0 - 31.65) when compared to women without breast cancer.

Conclusion: Postmenopausal breast cancer survivors had a higher risk for metabolic syndrome, diabetes, atherosclerotic disease, hypertriglyceridemia and abdominal obesity, important risk factors for cardiovascular disease when compared to postmenopausal women without breast cancer. Similarly, women treated for breast cancer presented high levels of HSP 60 and decreased HSP 70 when compared to women without cancer.

1. Introdução

1.1. Câncer de Mama

A Organização Mundial da Saúde prevê que no ano de 2020 aproximadamente 2 milhões de mulheres terão câncer de mama e 622 mil morrerão da doença em todo o mundo. Para 2035 serão 2,6 milhões de mulheres com câncer de mama (aumento de 30%) e a mortalidade terá um acréscimo de 35%, com 846 mil mortes (1). No Brasil, a estimativa para o ano de 2018 é que 200 mil mulheres terão novos casos de câncer, sendo o câncer de mama o mais prevalente (excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) com aproximadamente 60 mil casos (29,5% do total). O câncer de mama prevalece em todas as regiões do país, com exceção da região Norte onde o câncer de colo de útero ainda é mais prevalente. A região Sul tem a maior incidência de câncer de mama com 70,3 casos para 100 mil habitantes, sendo a menor taxa a da região Norte com 19,21 casos/100.000 habitantes. A incidência nacional é de 56,3 casos/100.000 habitantes (2).

A taxa de mortalidade do câncer de mama em mulheres americanas atingiu um pico de 33,2/100.000 em 1989, declinando 39% para 20,3/100.000 em 2015. Este progresso é atribuído a melhorias na detecção precoce e tratamento da doença. Dados recentes preveem que os EUA terão 330.080 novos casos de neoplasia de mama para 2018, sendo 266.120 casos de neoplasia invasiva e 40.960 casos de neoplasia *in situ* (12,5%), demonstrando taxa significativa de diagnóstico precoce da doença (3). O rastreamento mamográfico é a principal ação para diagnóstico precoce do câncer de mama e, conseqüentemente, na redução da mortalidade pela doença. Tabar *et al.* avaliaram 133 mil mulheres, randomizadas em dois grupos: com ou sem

rastreamento mamográfico preconizado. Após 29 anos de seguimento, o estudo concluiu que o rastreamento mamográfico diminuiu o risco de morte por câncer de mama em 30% (4).

A idade e a periodicidade do rastreamento são intensamente discutidas na literatura, embora a mamografia anual a partir dos 40 anos demonstra ser a estratégia mais eficaz. Estudo inglês avaliou 161 mil mulheres divididas em dois grupos: 54 mil com mamografia anual a partir dos 40 anos e 107 mil submetidas a rastreamento usual (trianual a partir dos 50 anos). Após seguimento de 17 anos, o estudo concluiu que o rastreamento mamográfico anual a partir dos 40 anos diminuiu o risco de morte pela doença nos primeiros 10 anos após o diagnóstico, quando comparado ao rastreamento a partir dos 50 anos (5). A Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM), Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) e Colégio Brasileiro de Radiologia (CBR) sugerem o rastreamento mamográfico anual a partir do 40 anos, embora o Instituto Nacional de Câncer (INCA) e o Sistema Único de Saúde (SUS) indiquem o início a partir dos 50 anos com periodicidade bienal (2,6). No Brasil, até 2015 havia 4.647 mamógrafos em atividade, sendo 2083 disponíveis ao SUS. Embora o número de equipamentos seja suficiente para a realização dos 12,7 milhões exames/ano, a distribuição geográfica desigual dos mamógrafos não permite a ação (7).

Além do diagnóstico precoce do câncer de mama, possibilitado pelo rastreamento mamográfico, tratamentos para a doença também aumentam significativamente a sobrevivência das pacientes (8). Em casos iniciais de câncer de mama, a hormonioterapia adjuvante por cinco anos reduz significativamente o risco de recorrência de câncer de mama contralateral e de morte pela doença (9,10,11).

Estudos com uso de tamoxifeno por cinco anos demonstraram que as taxas de recorrência nos primeiros 5 anos e mortalidade nos primeiros 15 anos eram menores em 50% e 30%, respectivamente, quando comparadas aos grupos que não utilizaram a droga (10). Na comparação entre o uso dos inibidores da aromatase e o tamoxifeno em mulheres na pós-menopausa, os inibidores foram mais efetivos, com 1/3 menos recorrências durante o tratamento e 15% menos morte durante os primeiros 10 anos (11).

Recente estudo incluiu 62.923 mulheres com câncer de mama que utilizaram hormonioterapia por cinco anos, com seguimento de 5 a 20 anos. Foram realizadas associações com o tamanho do tumor, *status* axilar e grau histológico. O estudo demonstrou que o risco de recorrência à distância em 20 anos entre mulheres com *status* axilar negativo (N0) foi de 22% e o risco de morte no mesmo período de 15%. Quando levado em consideração o tamanho do tumor e o *status* axilar, mulheres com estágio T1N0 apresentaram 13% de risco de recorrência em 20 anos. Estratificando o tamanho do tumor, os casos com estágio T1aN0 e T1cN0 apresentaram risco de recorrência a distância em 20 anos de 10% e 14%, respectivamente. Em relação ao grau histológico isolado, os tumores de alto grau tiveram risco de recorrência de 17% e os de baixo grau de 10%, ambos em 20 anos. O estudo conclui que o risco de recorrência a distância está diretamente relacionado ao tamanho do tumor e *status* axilar; e que o tratamento continuado com hormonioterapia após cinco anos pode reduzir o risco de complicações pelo câncer de mama (8). Esses resultados foram corroborados por outro estudo que avaliou 3128 mulheres que foram submetidas à hormonioterapia adjuvante por cinco anos e demonstraram risco de recorrência a

distância de 6,8% após 5 anos, 12,3% após 10 anos e 21% após 15 anos de seguimento (12).

1.2. Câncer de Mama x Doença Cardiovascular

Estratégias atuais anticâncer têm contribuído para o aumento na sobrevivência de pacientes oncológicos e em alguns casos o câncer torna-se uma doença crônica (13, 14). Estudos indicam que as pacientes sobreviventes de câncer mama são de risco para outros cânceres, assim como para doença cardiovascular (DCV), osteoporose e diabetes; reconhecidamente uma população vulnerável (15,16,17,18). A DCV, principalmente a doença coronariana, apresenta risco que aumenta ao longo de toda a vida, com especial incremento em mulheres na pós-menopausa, quando ocupam o primeiro lugar como causa de mortalidade (19). Com o aumento da expectativa de vida das mulheres tratadas de câncer de mama, semelhante aquelas sem câncer, o risco de morte por DCV aumenta (20,21). Existe também um aumento no risco pela exposição a tratamentos cardiotoxicos como a radioterapia da mama esquerda e mediastino, a quimioterapia com antraciclina e trastuzumab, e é ainda maior em pacientes com risco de DCV pré-existente, como diabetes e hipertensão (22,23,24,25).

A *American Heart Association* (AHA) divulgou em 2018 um documento inédito demonstrando grande preocupação com o risco cardiovascular de mulheres com câncer de mama (26). O documento afirma que o tratamento do câncer pode levar a cardiotoxicidade precoce ou tardia, que pode variar de disfunção de ventrículo esquerdo, hipertensão, arritmias, isquemia miocárdica, doença valvar, doença tromboembólica, hipertensão pulmonar e pericardite. A disfunção sistólica do ventrículo esquerdo é o efeito colateral mais comumente relatado e monitorado

durante quimioterapia. As terapias de câncer de mama que aumentam o risco de disfunção cardíaca são: 1- Quimioterapia com antraciclinas em doses elevadas: doxorubicina com doses acima de 250 mg/m² ou epirrubicina acima de 600 mg/m²; 2-Radioterapia com alta dose quando o coração está no campo de tratamento: radioterapia acima de 30 Gy; 3- Tratamento sequencial: terapia com antraciclina com doses mais baixas (doxorubicina menor de 250 mg/m² ou epirrubicina menor de 600 mg/m²) e depois tratamento posterior com trastuzumab; e 4- Terapia combinada: antraciclina com doses mais baixas combinada com radioterapia de dose mais baixa quando o coração está no campo de tratamento (26).

Evidências recentes sugerem que a adição do agente cardioprotetor dexrazoxano à quimioterapia com doxorubicina ou epirrubicina leva a reduções significativas na cardiotoxicidade do tratamento, principalmente em pacientes diabéticas (27). Uma revisão Cochrane com oito ensaios clínicos revelou que o uso de dexrazoxano estava associado a uma redução de 82% na insuficiência cardíaca (risco relativo de 0,18), sem impacto na sobrevida livre de doença, sobrevida global ou taxas de resposta ao câncer (27). A diretriz da AHA refere que o campo da cardio-oncologia surgiu para oferecer o melhor atendimento oncológico sem comprometer a saúde cardiovascular (26). Várias outras organizações, incluindo o *American College of Cardiology*, o *Canadian Cardiac Oncology Network*, a *European Society of Cardiology*, a *European Society for Medical Oncology* e a *International Cardi-Oncology Society* estão trabalhando em iniciativas para incentivar oncologistas e cardiologistas a trabalharem juntos para melhorar o atendimento de pacientes com câncer, tratadas com terapias potencialmente cardiotóxicas. A relação da radioterapia e a DCV foi avaliada em 290 mil pacientes submetidas à radioterapia adjuvante. O estudo

demonstrou que mulheres irradiadas do lado esquerdo têm maior risco cardiovascular do que aquelas com irradiação do lado direito, com risco relativo (RR) de 1.12. O risco fica mais aparente após 15 anos de seguimento, RR de 1.23 (28).

A obesidade entre as mulheres na pós-menopausa aumenta constantemente em todo o mundo. Está diretamente relacionada ao aumento da taxa de mortalidade por DCV e diabetes (29). A obesidade abdominal e a redução do HDL colesterol estão entre os principais contribuintes para a maior prevalência da síndrome metabólica (SM) no sexo feminino, principalmente entre as mulheres com 45 anos ou mais de idade, revelando o possível efeito da menopausa no estabelecimento da SM (30,31,32). Mulheres tratadas de câncer de mama têm adicional aumento do risco de SM, resultante do excesso de adiposidade e efeito dos tratamentos oncológicos (15,33,34). Metanálise incluindo 6.417 mulheres demonstrou que a SM esteve associada a 52% de aumento de risco de câncer de mama. Os componentes considerados da SM foram circunferência da cintura, pressão arterial, glicose, triglicerídeos e HDL. Com exceção dos triglicerídeos, todos os componentes demonstraram associação com o aumento do risco para câncer de mama, porém o risco atribuído a SM foi maior que de seus componentes isolados. Em relação à obesidade, demonstrou-se aumento de risco de 12% de câncer de mama em mulheres obesas (35).

Buttros *et al.*, em estudo desenvolvido na Faculdade de Medicina de Botucatu, demonstraram que pacientes na pós-menopausa tratadas de câncer de mama apresentaram aumento do risco de desenvolver SM, disglícemia e hipertensão arterial quando comparadas às mulheres de mesma faixa etária sem a doença. Os autores empregaram os critérios diagnósticos de *US National Cholesterol Education Program*:

Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) que considera a presença de pelo menos três dos seguintes critérios: obesidade abdominal (circunferência da cintura), elevação da pressão arterial, redução de HDL, aumento de triglicérides e intolerância a glicose. A SM esteve presente em 50% das pacientes tratadas de câncer de mama e em 37,5% no grupo controle (15). Por outro lado, Healy *et al.* encontraram prevalência de 39% de SM entre 105 mulheres na pós-menopausa com diagnóstico recente de câncer de mama (33).

Nesse contexto, está bem estabelecido o ganho de peso entre as mulheres tratadas de câncer de mama, superior a 60% em alguns estudos (36,37,38). Esse ganho de peso deve-se em parte a diminuição da atividade física, associado com o estresse psicológico e físico do tratamento (37,39). A promoção de estilo de vida saudável é de particular importância nessa população vulnerável, incluindo a orientação alimentar e atividade física, com melhora na qualidade de vida (40). Estudo em mulheres tratadas de câncer de mama sugere que o exercício físico melhora os valores de insulina e diminui a gordura abdominal, ambos marcadores da SM (41). Recente estudo avaliou o potencial inflamatório da dieta em 2.150 mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama. A classificação de dieta pró e anti-inflamatória foi baseado no questionário FFQ (*Food Frequency Questionnaire*) e calculado o *score* através do *Energy-adjusted DII (E-DII)*. O *score* no 1º quartil foi considerado como dieta anti-inflamatória e no 4º quartil como dieta pró-inflamatória. Após mediana de 13.3 anos de seguimento, 580 mulheres foram a óbito, sendo 212 por câncer de mama e 103 por DCV. Em comparação com as mulheres que faziam uso de dieta pró-inflamatória, as mulheres com dieta anti-inflamatória praticavam mais atividade física e apresentavam maior renda e nível de escolaridade, menor peso e

maior sobrevida oncológica. As mulheres com câncer de mama com dieta anti-inflamatória apresentaram 56% menos risco de morte por DCV quando comparadas as mulheres com dieta pró-inflamatórias (42).

Estudos têm demonstrado associação direta entre o risco de câncer de mama na pós-menopausa e o peso corporal excessivo, principalmente entre as mulheres com antecedente familiar positivo para a neoplasia (43,44). Estudo de destaque apresentado no congresso da *American Society of Clinical Oncology/2014 (ASCO)* concluiu que a obesidade é fator de risco independente para morte em mulheres com câncer de mama inicial, receptor de estrogênio positivo, na pré e perimenopausa (45). A obesidade também se relaciona com menores taxas de autodeteção, diagnóstico tardio, tumores maiores e maior taxa de comprometimento linfonodal pelo câncer de mama (46,47). Após o tratamento curativo, mulheres obesas têm maior chance de recorrência da doença e apresentam o dobro do risco de morte pelo câncer quando comparadas a mulheres não obesas (48,49).

A obesidade após a menopausa aumenta a conversão de androgênios em estrogênios no tecido adiposo periférico e diminui a concentração de globulina transportadora de hormônios sexuais (SHBG), com consequente aumento dos estrogênios livres circulantes (50). No tecido mamário, o estrogênio é fator essencial para que ocorra a fase de promoção na carcinogênese da neoplasia mamária (50). Outra teoria válida para explicar o aumento do risco de câncer em mulheres obesas na pós-menopausa relaciona-se a produção de adipocitocinas. O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo, secretando ácidos graxos e citocinas, denominadas adipocitocinas. Estas têm ação direta no metabolismo de gorduras e carboidratos, sinalização insulínica, diferenciação de adipócitos e inflamação. Evidências sugerem que a

obesidade, condição caracterizada pelo aumento no número e tamanho dos adipócitos, altera a secreção das adipocitocinas levando a aumento da angiogênese e consequentemente aumento no risco de iniciação e recorrência do câncer de mama. A leptina, considerada uma adipocitocina, está aumentada em mulheres obesas e têm efeito de proliferação e pró-angiogênese, aumentando a proliferação de linhas de células de câncer de mama humano (51).

A obesidade central também contribui para o aumento da resistência insulínica nos tecidos periféricos, com consequente aumento na concentração sérica da insulina. A insulina, por sua vez, promove proliferação celular no epitélio mamário normal e nas linhagens celulares do câncer de mama, através da sua atividade mitogênica e aumento da síntese do fator de crescimento insulina-like (IGF-1) (52,53). O tumor de mama apresenta maior número de receptores para IGF-1 quando comparado ao tecido mamário normal, sofrendo ação mais intensa dos efeitos da hiperinsulinemia (54). O aumento da insulina também tem ação direta na diminuição da SHBG, levando a aumento na concentração da testosterona e, consequentemente, aumento na conversão periférica em estrogênios circulantes pelo tecido adiposo (55).

Recente revisão sistemática analisou a relação entre o câncer de mama com o risco de morte por DCV em uma população de 1.217.910 mulheres participantes de 14 estudos. A prevalência de morte por DCV em mulheres com câncer de mama variou de 1,6% a 10,4%. As mulheres com câncer de mama apresentaram maior risco de mortalidade por DCV do que as mulheres da população em geral. Idade avançada no diagnóstico, tumor na mama esquerda e população de raça negra foram fatores de risco de DCV no seguimento do câncer de mama. O estudo concluiu que a combinação da alta incidência do câncer de mama, aumento da sobrevida, presença de fatores de

risco cardiovasculares e a cardiotoxicidade dos tratamentos oncológicos têm resultado em aumento de risco cardiovascular em mulheres tratadas de câncer de mama (56). Assim, deve haver empenho multidisciplinar na identificação de mulheres tratadas de câncer de mama com aumento do risco de DCV, com recomendações para redução do risco. Além disso, uma abordagem individualizada com monitoramento precoce e tardio da disfunção cardíaca em mulheres tratadas de câncer de mama deveria ser incluída rotineiramente.

1.3. Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*)

A observação de que o aumento subletal na temperatura induz a alterações celulares adaptativas para proteger as células da lesão térmica, conduziu à descoberta de mecanismo endógeno de defesa celular, referido como resposta ao choque térmico (57). Este mecanismo tem sido conservado ao longo da evolução das espécies e envolve, a nível molecular, a síntese de diversas proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico ou *heat shock proteins* (HSP) (58,59). As HSP apresentam funções de protetoras e guardiãs (*chaperons*) moleculares contra danos celulares provocados em respostas a diversos estímulos, auxiliando as células a combater possíveis agentes agressores ao organismo (60). Sua expressão é regulada por vários fatores, incluindo infecção, hipóxia, estresse oxidativo e inflamação (61). Sob condições adversas, as HSP ajudam à sobrevivência celular pela prevenção da desnaturação e pela inibição de apoptose celular (62). São classificadas em subfamílias de acordo com o peso molecular aproximado, que varia entre 10 e 150 kilodaltons (kDa). As quatro principais classes são 27 kDa (HSP27), 60 kDa (HSP60), 70 kDa (HSP70) e 90 kDa (HSP90) (63).

As HSP são normalmente encontradas dentro das células, estrategicamente posicionadas no citoplasma, mitocôndrias, peroxissomos, e retículo endoplasmático; quando detectadas no ambiente extracelular, indicam morte celular ou liberação de conteúdo intracelular (64). A HSP extracelular funciona como “sinal de perigo”, alertando o sistema imune de possível alteração não fisiológica (60,65). Esta se liga aos receptores de superfície das células imunes e epiteliais, resultando na ativação de resposta imuno-inflamatória (66). Por outro lado, esse tipo de resposta é um dos mecanismos envolvidos na patogênese da aterosclerose (67). Evidência cumulativa sugere que o componente imunológico do desenvolvimento da aterosclerose pode, pelo menos em parte, envolver a expressão das HSP (68,69,70). Tem sido sugerido que as HSP podem atuar como moléculas sinalizadoras que, depois de serem liberadas para o meio extracelular, regulam a produção de citocinas (57).

Estudos sugerem o envolvimento das HSP no desenvolvimento da DCV (71,72,73). Embora as HSP tenham importante função protetora no sistema cardiovascular, essas proteínas podem também mediar efeitos deletérios sobre a parede arterial, como a ativação das células endoteliais, promovendo a aterogênese (73). Estudos *in vitro* têm demonstrado que as HSP induzem a expressão de moléculas de adesão, e a secreção de citocinas pró-inflamatórias a partir de células endoteliais, de músculo liso e macrófagos (74,75). Estudos clínicos com HSP, principalmente a HSP60 e HSP70, e doença aterosclerótica são controversos. HSP60 e 70 são proteínas nucleares encontradas nas mitocôndrias e citoplasma, respectivamente, expressas pelas células normais com função de proteção contra o estresse induzido (57,76). Embora sejam consideradas moléculas intracelulares,

podem ser liberadas para a corrente sanguínea estando presentes na circulação periférica em condições de estresse (69,77,78).

A HSP60 está aumentada no soro de pacientes com aterosclerose e estão associados com a progressão e a severidade da doença (71,72,79,80,81,82,83). A HSP60 elevada pode refletir um estado de imunidade associada à aterogênese (70). A imunidade à proteína HSP60 tem sido implicada na ativação da célula endotelial e desenvolvimento da aterosclerose (70). Valores elevados de HSP60 são capazes de estimular células endoteliais a expressar proteínas de adesão vascular contribuindo diretamente para a patogênese da aterosclerose (74). Embora os mecanismos precisos subjacentes à relação entre valores plasmáticos de HSP60 e a DAC ainda necessitam ser definidos, um componente autoimune poderia explicar o efeito da HSP60 (71). A HSP60 é altamente imunogênica e pode ser processada por células apresentadoras de antígenos tais como macrófagos e linfócitos T e B (59). Isto resulta na geração de anticorpos e na expansão clonal das células T auto-reativas e células B, induzindo assim reação autoimune direta contra os tecidos vasculares (84). Simultaneamente, o sistema imunológico inato pode ser ativado diretamente pela HSP60, resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-12, na promoção da adesão de monócitos às células endoteliais e pelo recrutamento de células inflamatórias nos tecidos vasculares (85,86). Ambas as respostas celulares e humorais específicas contra HSP60 poderia contribuir para a aterogênese (84). Possivelmente, a HSP60 seja potente sinalizador molecular capaz de ativar a maioria das células envolvidas na doença aterosclerótica, incluindo células vasculares endoteliais e musculares lisas e linfócitos

T e B, estando associada com piora da função endotelial nos processos iniciais da DAC assim como na progressão da doença aterosclerótica (66,87).

Por outro lado, estudos observaram que valores plasmáticos elevados de HSP70 protegeriam contra o desenvolvimento da DCV (80,88,89). A HSP70 protege os elementos celulares da lesão, reduzindo a inflamação, oxidação e apoptose; melhora a viabilidade das células musculares lisas vasculares, possivelmente por meio das suas funções de *chaperones* (90). A HSP70 é expressa dentro da lesão aterosclerótica humana (90,91). Estudos *in vitro* demonstraram que LDL-oxidado pode desencadear a expressão da HSP70 em culturas de células endoteliais (93) e de células musculares lisas (94), sugerindo que a HSP70 pode representar defesa contra a toxicidade do LDL-oxidado. Estudo experimental encontrou que a exposição ao fumo reduziu a expressão arterial da HSP70, aumentando significativamente a espessura da camada íntima da artéria carótida em ratos (95).

Estudo de base populacional, avaliando 826 pacientes (40-75 anos, de ambos os sexos), demonstrou associação entre as concentrações de HSP60 com aterosclerose de carótida e o espessamento da carótida comum, independentemente da idade, sexo e fatores de risco para aterosclerose. De acordo com os autores, esses dados forneceram evidência de correlação entre HSP60 e aterosclerose, sugerindo que pode desempenhar importante papel na ativação de células vasculares e do sistema imune durante o desenvolvimento da aterosclerose (69). Outro estudo correlacionou a espessura da íntima-média da carótida com valores da HSP 60 e 70 em 72 homens (idade 45-75 anos) com hipertensão arterial limítrofe, definida como pressão arterial diastólica (PAD) entre 85-94 mmHg e 75 controles normotensos (PAD \leq 80 mmHg). Apenas valores da HSP60 foram

significativamente superiores entre os pacientes com hipertensão limítrofe quando comparados aos controles. Os autores observaram associação entre a espessura da camada íntima-média com valores elevados de HSP60 apenas entre os pacientes com aterosclerose de carótida. Outros marcadores metabólicos não se associaram com nenhuma HSP avaliada. Concluem pela existência de associação entre aterosclerose precoce e o valores de HSP60 (68).

Estudo caso controle com 1003 pacientes (idade entre 40 e 79 anos) com DAC estabelecida e 1003 pacientes saudáveis (controle), pareados por sexo e idade, avaliou a influência dos valores circulantes de HSP60 sobre a DAC. O valor médio de HSP60 foi superior entre os pacientes com DAC quando comparado aos controles saudáveis. Houve associação significativa da HSP60 apenas com a idade; não foi observada associação com outros fatores de risco para DAC como sexo, tabagismo, peso, dislipidemia, HAS ou diabetes (71). Em outro estudo com amostra de 456 pacientes (218 homens, 234 mulheres, idade entre 40-60 anos), foi investigado a prevalência de fatores de risco vasculares e valores de HSP70 de acordo com o risco de DCV. Os participantes foram divididos em três grupos: sem fator de risco ou risco inferior a 5% (n = 239); risco moderado entre 10-20%, sem DCV estabelecida (n = 161); e com doença aterosclerótica estabelecida (n = 52). Valores de HSP70 foram significativamente menores no grupo com DCV estabelecida em relação aos outros grupos. Não foi demonstrada correlação entre as concentrações circulantes de HSP70 com os clássicos fatores de risco cardiovascular. Para os autores, pacientes com baixos valores de HSP70 devem ser considerados de risco para DCV. A redução de HSP70 pode ser explicado pela formação de imuno complexos circulantes, que são considerados biomarcadores da progressão de doença aterosclerótica (95). Estudo

desenvolvido na Faculdade de Medicina de Botucatu investigou a relação das HSP 60 e 70 com fatores de risco de doença cardiovascular em 311 mulheres na pós-menopausa com e sem SM. As concentrações séricas de HSP 60 foram maiores em mulheres com SM quando comparadas aquelas sem SM. Os autores comprovaram que quanto maior o número de fatores diagnósticos para SM, maior é a concentração das HSP 60, aumentando o risco de DCV (96).

1.4. *Heat Shock Proteins (HSP) e Câncer de mama*

Marcadores moleculares de HSP estão elevados em muitos tipos de câncer, e a superexpressão das HSP é sinal de pior prognóstico em termos de sobrevida e resposta a terapia específica no tratamento (97,98,99,100,101). Em muitos casos, a expressão da HSP tem sido analisada em relação às características histopatológicas do tumor (grau tumoral, tipo do tumor), com a expressão molecular (receptores hormonais, mutação p53) e com parâmetros clínicos (sexo e idade) (101). A relação de algumas HSP com o diagnóstico, prognóstico e predição de tratamentos do câncer de mama tem sido estabelecida, como demonstrado na Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1 - HSP e câncer de mama: implicações diagnósticas

| HSP | ACHADOS | REFERÊNCIAS |
|----------------|--|--------------------|
| HSP 27 | - correlação com receptor estrogênio (RE) + | (102) |
| | - baixa proliferação celular | (103) |
| | - ausência de RE em câncer de mama masculino | (104) |
| HSP 70 | - expressão + de c-myc em 63% carcinomas | (105) |
| | - RE +, p53 diminuído | (106) |
| | - aumento de proliferação celular | (103) |
| | - linfonodo +, menor diferenciação | (107) |
| Hsp90 α | - linfonodo + | (108) |
| | - relação ciclina D1 | (109) |

Tabela 2 - HSP e câncer de mama: implicações prognósticas

| HSP | ACHADOS | REFERÊNCIAS |
|------------|---|--------------------|
| HSP 27 | - menor tempo livre de doença com linfonodo + | (110) |
| | - sem correlação com tempo livre de doença e sobrevida global | (111) (112) |
| | - sem valor prognóstico | (113) |
| | - melhora sobrevida | (114) |
| | - sem correlação com metástase | (115) |
| HSP 70 | - menor tempo livre de doença | (116) |
| | - aumento sobrevida global | (117) |
| | - menor sobrevida global | (118) |
| | - aumento recorrência, menor sobrevida | (119) (120) |
| Hsp90α | - menor sobrevida global | (114) |

Tabela 3 - HSP e câncer de mama: implicações preditivas

| HSP | ACHADOS | REFERÊNCIAS |
|--------|---|-------------|
| HSP 27 | - maior resposta a politerapia | (121) |
| | - sem predição a terapia hormonal antiestrogênica | (111) |
| | - sem predição ao tamoxifeno | (122) |
| | - menor tempo livre de doença após qt neo | (123) |
| HSP 70 | - preditor de recorrência após qt neo | (97) |
| | - sem predição ao tamoxifeno | (122) |
| | - menor tempo livre de doença pós qt neo | (123) |

Ciocca *et al.* demonstraram relação das HSP com muitos aspectos da progressão tumoral e resposta a terapias específicas. As concentrações séricas das HSP são efeitos de biomarcadores da carcinogênese em muitos tecidos e podem sinalizar a diminuição da diferenciação e agressividade de alguns tipos de câncer. Muitos tipos de HSP estão relacionados com o prognóstico de tipos específicos de câncer, incluindo a HSP 27 com pior prognóstico em carcinoma de próstata, fígado e estômago; HSP 70 com pior prognóstico em mama, endométrio, colo e bexiga. A relação das HSP com alguns tipos de carcinoma podem auxiliar no entendimento sobre a doença e na escolha do tratamento (101).

Gunaldi *et al.* estudaram o valor preditivo do nível sérico da HSP 70 como teste diagnóstico e preditivo em pacientes com câncer de mama. O desenho do estudo foi com 45 mulheres com câncer de mama pareadas por idade e índice de massa corpórea com 16 mulheres saudáveis. Os autores encontraram níveis significativamente maiores

de HSP 70 no grupo com câncer de mama (5.98 ± 2.05 vs. 1.49 ± 0.47 ng/ml). O valor sérico de HSP 70 > 2.41 ng/ml foi o melhor ponto de corte para predizer o câncer (97,78% sensibilidade e 93,75% de especificidade). O estudo concluiu que a HSP 70 pode ser utilizada em conjunto com outros testes diagnósticos no câncer de mama para auxiliar a identificar pacientes com risco aumentado para a doença (124).

A relação das HSP, principalmente a 27 e 70, com fatores diagnósticos e preditivos do câncer de mama estão estabelecidos, conforme demonstrado nas Tabelas 1, 2 e 3. Porém a literatura carece de dados sobre a relação entre as HSP e o risco cardiovascular em mulheres tratadas de câncer de mama, fato amplamente estudado em mulheres saudáveis. O significado da relação das HSP 60 e 70 em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama com o risco de DCV é uma área que necessita mais estudos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Principal

Avaliar os fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama comparadas às mulheres na pós-menopausa sem câncer de mama.

2.2. Objetivo Específico

Avaliar a associação das HSP 60 e 70 com o câncer de mama em mulheres na pós-menopausa.

3. Métodos

3.1. Desenho do Estudo e Seleção da Amostra

Trata-se de estudo clínico de corte transversal e comparativo. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Ambulatório de Oncologia da Santa Casa do município de Rio Claro/SP e no Ambulatório de Climatério & Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)-UNESP, no período de 2016 a 2017. O cálculo do tamanho amostral foi realizado pelo escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da FMB e embasado nos estudos de Melichar *et al*, 2012 (125) e Nahas *et al*, 2014 (126) que demonstraram diferenças na incidência de aterosclerose subclínica em mulheres com e sem câncer de mama, com redução de 27% em relação às pacientes sem câncer. Considerando a diferença entre os valores e corrigindo a estimativa para os efeitos dos erros do tipo I (5%) e do tipo II (20%) atribuídos ao estudo, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 92 pacientes com câncer de mama.

Foram incluídas no grupo de estudo mulheres com: (1) data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade ≥ 45 anos; (2) diagnóstico histológico de câncer de mama; (3) ter completado tratamentos cirúrgico, radioterápico e quimioterápico (quando indicado); (4) estádios I, II ou III; (5) não etilista e não drogaditas; e (6) sem antecedente pessoal de doença cardiovascular (angina, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral). Foram excluídas aquelas com idade superior a 75 anos e dados incompletos. O grupo controle foi constituído de mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade ≥ 45 anos, sem câncer de mama (comprovado por mamografia do último ano), e sem antecedente pessoal de DCV. Os grupos foram pareados pela idade, tempo de menopausa e índice

de massa corpórea, na proporção de um caso para dois controles (1:2), a partir de um banco de dados. Foram incluídas 96 mulheres tratadas de câncer de mama e 192 mulheres sem câncer de mama.

Para todas as pacientes selecionadas foram esclarecidos os objetivos e procedimentos a que seriam submetidas, e solicitadas às assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), exigência da resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB- UNESP em 26 de outubro de 2016, parecer número 1.782.545 (Anexo II).

Metodologia

Inicialmente no dia da consulta, foram coletados por meio de entrevista individual (Anexo III), os seguintes dados: idade, idade e tempo de menopausa, paridade, tabagismo, uso de terapia hormonal (TH), antecedentes familiares de DCV, antecedentes pessoais de hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes, dislipidemias, e frequência de atividade física semanal. A medida da pressão arterial foi aferida no braço direito, com a paciente sentada com o antebraço apoiado no nível do precórdio, palma da mão para cima, com uso de esfigmomanômetro aneróide padrão. Foram definidas como tabagistas as pacientes com o hábito de fumar diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram consideradas ativas as mulheres que praticavam exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada, pelo menos 30 minutos, de três a cinco vezes na semana (90 - 150min/sem) ou exercícios de resistência três dias por semana. Foram consideradas com síndrome metabólica (SM) as mulheres que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos propostos pelo US

National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III)

(127): circunferência da cintura (CC) > 88 cm; triglicerídios (TG) \geq 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial sistêmica \geq 130/85 mmHg; glicose \geq 100 mg/dL ou sob terapia.

Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura, índice de massa corpórea (IMC=peso / altura²) e circunferência da cintura (CC). Para a mensuração do peso, foi utilizada balança antropométrica eletrônica, tipo plataforma da marca Filizola®, graduada a cada 100g, capacidade até 150 kg, com precisão de 0,1 kg, com a paciente descalça e mínimo de roupa. A estatura foi determinada em estadiômetro vertical afixado a balança, com precisão de 0,1cm, com a paciente em posição ortostática, com braços ao lado do corpo, cabeça orientada à frente, descalça, mantendo os pés juntos e em inspiração profunda. Foram empregados os critérios da *World Health Organization* de 2002 para classificação das pacientes conforme o IMC: menor que 18,5kg/m² - baixo peso, de 18,5-24,9kg/m² - normal, de 25-29,9kg/m² - sobrepeso, de 30-34,9kg/m² - obesidade grau I, de 35-39,9kg/m² - obesidade grau II e \geq 40kg/m² - obesidade grau III. Para a medida da circunferência da cintura foi empregado o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, por meio de fita métrica inextensível milimetrada e com escala de 0,5cm, da marca Lange®, com a paciente em posição ortostática; sendo considerada aumentada a medida acima de 88 cm (127).

Análise Bioquímica

Para a realização dos exames laboratoriais, as pacientes foram orientadas a realizar jejum de 12 horas. Por meio de punção venosa, em sistema fechado a vácuo

(*Vacutainer*[®], *England*), foram obtidos 20 ml de sangue diretamente em dois tubos a seco (10 ml) com gel separador de soro. Ao final de cada coleta, foram centrifugadas por 10 min (3.000 rpm). Um tubo com o soro obtido seguiu para dosagens bioquímicas imediatas e outro tubo foi congelado a -80°C até a dosagem das HSP.

Foi realizada avaliação do perfil lipídico e glicídico pela mensuração do colesterol total (CT), HDL, LDL, triglicerídeos (TG), glicose e insulina. As mensurações de triglicerídeos, colesterol total, HDL e glicose foram processadas pelo analisador bioquímico automático RAXT (*Technicon*[®], *USA*), quantificadas pelo método colorimétrico, utilizando reagentes comerciais específicos (*Sera-Pak*[®], *Bayer, USA*). O método é linear até 800mg/dL para TG e 900mg/dL para CT. O LDL foi calculado pela fórmula de Friedewald, que apresenta limitação de uso quando valores de TG ultrapassam 400mg/dL (128). O LDL foi obtido subtraindo-se o valor do CT da soma do HDL e do TG dividido por cinco. Os valores considerados ótimos foram: CT <200 mg/dL, HDL >50mg/dL, LDL <100 mg/dL, TG <150 mg/dL e glicose <100mg/dL (127). A insulina foi quantificada pelo Sistema Immulite[®] (*DPC*[®],*USA*), que emprega imunoensaio em fase sólida por quimioluminescência, para uso em analisador automático, designado para leitura quantitativa. A taxa de normalidade segundo o método empregado foi de 6,0 a 27,0 µIU/ml. Para a avaliação da resistência insulínica (RI) foi utilizado método baseado em medida estática com dois constituintes plasmáticos (insulina e glicose de jejum). O HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistant*) foi calculado pela fórmula: $\text{Insulina } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glicose de jejum } (\text{mg/dl}) / 405$. Valores que indicam RI foi definido como HOMA-IR > 2,7 (129).

Para determinação das concentrações plasmáticas de HSP 60 e 70 foram empregados os imunoensaios (*Assay Designs*[®], *Stressgen, USA*) pela técnica de ELISA

(*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) em fase sólida, com duração de 5 horas, obedecendo às recomendações do fabricante dos kits, conforme descritos previamente (130). A sensibilidade analítica para as diferentes determinações foi de HSP60 de 3.12 ng/ml e HSP70 de 0.09 ng/ml. O coeficiente de variação intra e interensaio foram inferiores a 10% segundo descrição dos Kits. Todas as dosagens foram realizadas em um único momento, para minimizar variações interensaios, por único pesquisador biomédico especializado (Orsatti CL).

Ecografia das Artérias Carótida

As artérias carótidas direita e esquerda foram examinadas com *scanner duplex*, utilizando transdutor linear de 7.0 MHz pelo aparelho Logiq 7 (GE[®], Waukesha, Wisconsin, USA), com ecocardiograma acoplado. As artérias carótidas foram avaliadas próximas à bifurcação a partir do plano longitudinal, para mensuração da espessura do complexo médio-intimal (CMI). O CMI é definido como a largura incluindo a interface lúmen-íntima/média-adventícia, e avaliada por meio da ultrassonografia (131) (**Figura 1**). As medidas foram realizadas durante o período diastólico final (correspondente à onda R do eletrocardiograma), a dois centímetros proximais do bulbo carotídeo, com a paciente em decúbito dorsal inclinando a cabeça 45° no sentido contrário ao da artéria avaliada (132). Esta medida foi realizada em três ciclos cardíacos consecutivos em ambas as carótidas, sendo considerada para avaliação final da espessura a média das seis medidas. Os exames foram realizado por um único radiologista membro titular do CBR. Doença aterosclerótica subclínica foi definida pela presença de placa aterosclerótica (**Figura 2**) e/ou espessamento do CMI maior que 1,0 mm, ponto de corte indicador de eventos clínicos cardiovasculares (133).

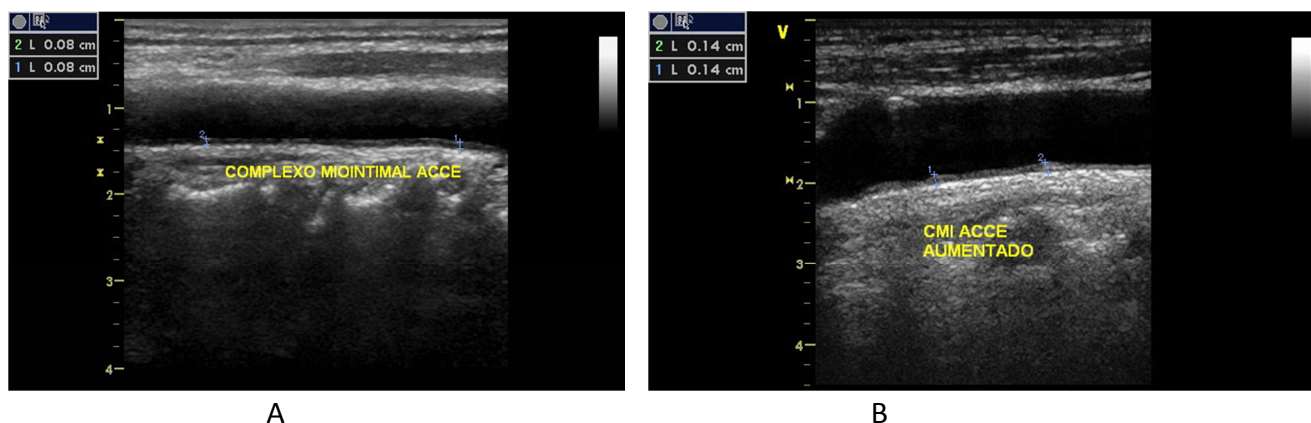


Figura 1- Imagem ultrassonográfica do complexo médio-intimal (CMI) da artéria carótida comum esquerda (ACCE), normal (A) e aumentado (B).

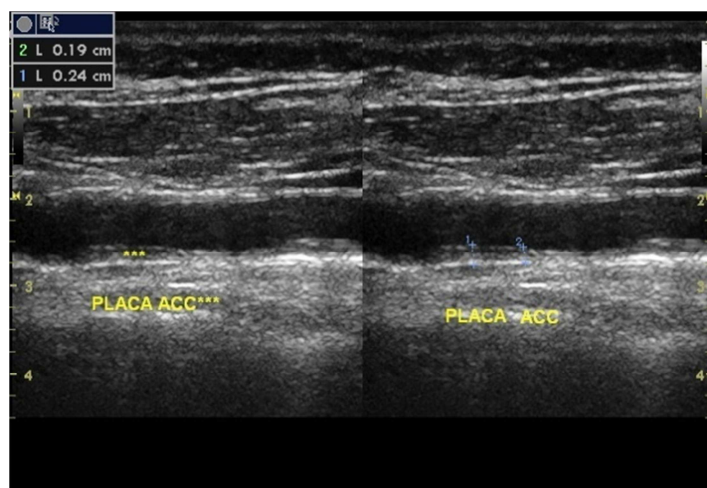


Figura 2- Imagem ultrassonográfica do complexo médio-intimal da artéria carótida comum (ACC) com placa.

Anatomopatológico e Imunohistoquímica

A partir da análise dos prontuários foram obtidos os seguintes dados: diagnóstico histopatológico do câncer de mama, grau histológico, *status* de receptor hormonal (receptor de estrogênio, RE; receptor de progesterona, RP), *status* do receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2), atividade proliferativa

epitelial (Ki67), estágio do tumor, tratamentos realizados (cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia) e o tempo de seguimento. O diâmetro do tumor foi obtido a partir dos laudos histopatológicos; e o grau histológico graduado em grau I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (indiferenciado), de acordo com o método proposto por Elston & Ellis (134), que utiliza como critérios os aspectos arquiteturais, o grau de diferenciação nuclear e o índice mitótico.

O estadiamento patológico do tumor foi definido de acordo com a 6ª edição do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, sistema TNM (tamanho do tumor, *status* linfonodal, metástase), sendo: estágio 0 (TisN0M0), estágio I (T1N0M0), estágio IIA (T0N1M0, T1N1M0 e T2N0M0), estágio IIB (T2N1M0 e T3N0M0), estágio IIIA (T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 e T3N2M0), estágio IIIB (T4N0M0, T4N1M0 e T4N2M0), estágio IIIC (qualquer TN3M0) e estágio IV (qualquer T qualquer N M1) (135). De acordo com o perfil de imunohistoquímica, os tumores foram agrupados em quatro subtipos: 1-Luminal A: RE positivo, RP positivo, HER-2 negativo e Ki-67 <14%; 2-Luminal B: RE positivo, RP positivo ou negativo, HER-2 positivo ou negativo, Ki-67 ≥14%; 3- Não-luminal HER-2: RE e RP negativos e HER-2 positivo; 4- Triplo-negativo: RE, RP e HER-2 negativos (136).

O perfil de RE, RP, HER2 e Ki67 foram determinados pela técnica de imunohistoquímica (IHQ) utilizando blocos de tecido, segundo recomendação dos Kits empregados (DakoCytomation®, Glostrup, Denmark). Os ensaios de IHQ visam demonstrar a presença e localização de proteínas em secções de tecido, por meio de análise semiquantitativa quanto à positividade ou negatividade do marcador. A coloração para IHQ é realizada em secções finas de tecido fixado em formalina que estão sujeitas a vários métodos de recuperação de antígenos. Isto é seguido por

incubação do tecido com um anticorpo primário dirigido contra a proteína/antígeno alvo. Uma vez que os anticorpos são altamente específicos, o anticorpo irá ligar-se apenas à proteína de interesse na secção de tecido. A interação anticorpo-antígeno é então visualizada utilizando detecção cromogênica, em que uma enzima conjugada ao anticorpo cliva um substrato para produzir um precipitado colorido no local da proteína, denominada detecção fluorescente, sendo visualizado pela microscopia de fluorescência (137).

Após a avaliação imunohistoquímica, os receptores de estrogênio e progesterona foram considerados positivos quando houve marcação nuclear em mais de 1% das células tumorais (138). Para o Ki67, como não existe consenso na literatura em relação à positividade, foi considerado positivo se mais de 14% das células tumorais estivessem marcadas (136). Para análise do HER2 foi utilizado critérios da ASCO (138), sendo: 0 - sem marcação de membrana, 1+ - marcação parcial de membrana, 2+ - marcação completa de membrana porém fraca ou moderada em mais de 10% das células tumorais e 3+ - marcação completa e intensa de membrana em mais de 10% das células tumorais (139). A amplificação do gene HER2 foi testada por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) quando a imunohistoquímica resultou em escore 2+ (140).

Análise Estatística

A partir dos dados, foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados do grupo principal com câncer de mama (n=96) e controle sem câncer (n=192). As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e frequência e

porcentagem para variáveis qualitativas. Para comparação entre os grupos em relação às características quantitativas, foi empregado o Teste *t-student* e a distribuição Gama (variáveis assimétricas). Na associação entre a frequência das características categóricas foi empregado o Teste do Qui-quadrado. Para o cálculo do *odds ratio* (OR) foi utilizada a análise multivariada por regressão logística binária, considerando-se intervalo de confiança (IC) de 95%; foi examinada a associação entre o câncer de mama (variável independente) e os fatores de risco cardiovascular (tabagismo, SM, hipertensão, diabetes, obesidade, circunferência da cintura elevada, HDL baixo, hipertrigliceridemia, CMI elevado e presença de placa ateromatosa como variáveis dependentes), sendo ajustada para idade, tempo de menopausa e IMC (variáveis confundidoras). Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System* (SAS), versão 9.4, pelo Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, que deu o atendimento metodológico e conduziu os procedimentos estatísticos.

4. Resultados

4.1. Artigo Original

Alto Risco de Doença Cardiovascular em Mulheres na Pós-Menopausa Tratadas de Câncer de Mama

High Risk for Cardiovascular Disease in Postmenopausal Breast Cancer Survivors

Buttros DAB, Branco MT, Orsatti CL, Nahas-Neto J, Nahas EAP

RESUMO

Objetivo: Avaliar os fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama comparadas às mulheres na pós-menopausa sem câncer de mama.

Métodos: Realizou-se estudo clínico de corte transversal com 96 mulheres tratadas de câncer de mama comparadas a 192 mulheres na pós-menopausa (controle), com idades entre 45 e 75 anos. Foram incluídas no grupo principal mulheres com amenorreia >12 meses e idade ≥ 45 anos, com diagnóstico histológico de câncer de mama, sem doença metastática e sem doença cardiovascular (DCV) estabelecida. O grupo controle foi constituído por mulheres com amenorreia > 12 meses, idade ≥ 45 anos, sem câncer de mama e DCV. Os grupos foram pareados por idade, tempo de menopausa e índice de massa corpórea (IMC) na proporção 1 caso para 2 controles. Dados clínicos e antropométricos (IMC e circunferência da cintura) foram coletados. Foram solicitados colesterol total, HLD, LDL, triglicerídeos (TG), glicose e insulina. Foi considerada síndrome metabólica (SM), a presença de três ou mais critérios: circunferência da cintura (CC) > 88 cm; TG ≥ 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial $\geq 130/85$ mmHg; glicose ≥ 100 mg/dL. Para determinação das concentrações plasmáticas de *heat shock proteins* (HSP) 60 e 70 foram empregados imunoenaios pela técnica de ELISA. Foi realizado ultrassonografia das artérias carótidas (*scanner duplex*) para avaliação da espessura do complexo médio-intimal. Para análise estatística foram empregados: Teste *t-student*, Distribuição Gama, Teste do Qui-Quadrado e Regressão Logística (*odds ratio-OR*).

Resultados: Na comparação entre os grupos, mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram valores médios elevados da pressão sistólica e diastólica ($p < 0.001$), e

valores médios de TG e glicose, acima dos valores desejáveis ($p < 0.05$). As pacientes com câncer de mama apresentaram valores mais altos de HSP 60 e mais baixos de HSP 70 quando comparadas ao controle ($p < 0.05$). Foi observada maior ocorrência de placa ateromatosa entre as mulheres tratadas de câncer mama quando comparadas ao controle (19.8% vs 9.4%, respectivamente) ($p < 0.05$). Na análise de risco ajustado para idade, tempo de menopausa e IMC, mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram risco aumentado para SM (OR=4.21; IC 95% 2.28-7.76), presença de placa ateromatosa (OR=2.61; IC 95% 1.19-5.72), diabetes (OR=4.42; IC 95% 1.86-10.49), hipertrigliceridemia (OR=2.32; IC 95% 1.33-4.0) e circunferência da cintura elevada (OR=11.22; IC 95% 4.0 – 31.65) quando comparadas as mulheres sem câncer de mama ($p < 0.05$).

Conclusão: Mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram maior risco para síndrome metabólica, diabetes, doença aterosclerótica, hipertrigliceridemia e obesidade abdominal, importantes fatores de risco para doença cardiovascular, quando comparadas às mulheres na pós-menopausa sem câncer de mama.

ABSTRACT

Objective: To evaluate cardiovascular risk factors in postmenopausal breast cancer survivors as compared to postmenopausal women without breast cancer.

Methods: In this cross-sectional study, 96 postmenopausal breast cancer survivors were compared with 192 postmenopausal women (controls), aged 45 to 75 years. The principal group included women with amenorrhea > 12 months and age ≥ 45 years, with histological diagnosis of breast cancer, without metastatic disease and without established cardiovascular disease (CVD). The control group consisted of women with amenorrhea > 12 months, age ≥ 45 years, without breast cancer and CVD. The groups were matched by age, time since menopause, and body mass index (BMI) in the proportion 1 case for 2 controls, according to the sample calculation, with a minimum of 92 breast cancer survivors. Clinical and anthropometric data (BMI and waist circumference) were collected by interview and physical examination. For biochemical analysis, total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, glucose and insulin levels were measured. Women who presented three or more of the following criteria were diagnosed as having metabolic syndrome (MetS): waist circumference (WC) > 88 cm; TG ≥ 150 mg/dL; HDL cholesterol < 50 mg/dL; blood pressure $\geq 130/85$ mmHg; glucose ≥ 100 mg/dL. For measuring plasma concentrations of HSP 60 and 70, immunoassays by ELISA technique were used. Atherosclerotic disease was determined by the intima-media thickness (IMT > 1mm) of the carotid arteries and / or by the presence of atheromatous plaque, assessed by carotid ultrasound (scanner duplex). For statistical analysis, Student's t-test, Gamma Distribution (asymmetric variables), Chi-Square Test, and Logistic Regression (odds ratio-OR) were used.

Results: The breast cancer survivors presented high mean values of systolic and distal pressure ($p < 0.001$), and mean values of triglycerides and glucose, above the desirable values ($p < 0.05$). Patients with breast cancer had higher levels of HSP 60 and lower HSP 70 when compared to control ($p < 0.05$). There was a higher occurrence of atheromatous plaque among the breast cancer survivors when compared to the control group (19.8% vs. 9.4% respectively) ($p < 0.05$). In the risk analysis adjusted for age, time since menopause and BMI, women treated for breast cancer had a significantly increased risk for MetS (OR = 4.21, 95% CI 2.28-7.76), presence of atheromatous plaque (OR = 2.61, CI 95% CI 1.19-5.72), diabetes (OR=4.42; IC 95% 1.86-10.49), hypertriglyceridemia (OR = 2.32, 95% CI 1.33-4.0) and large waist circumference (OR = 11.22, 95% CI 4.0 - 31.65) when compared to women without breast cancer.

Conclusion: Postmenopausal breast cancer survivors had a higher risk for metabolic syndrome, diabetes, atherosclerotic disease, hypertriglyceridemia and abdominal obesity, important risk factors for cardiovascular disease when compared to postmenopausal women without breast cancer.

INTRODUÇÃO

A maioria das mulheres com diagnóstico de câncer de mama é considerada de bom prognóstico e sobreviverá a doença. A redução na mortalidade deve-se ao rastreamento populacional com detecção precoce e a tratamentos mais eficazes (1). Mulheres submetidas a rastreamento mamográfico rigoroso durante a vida têm o risco de morte diminuído em até 30% (2). Em relação aos tratamentos, o uso do tamoxifeno e inibidores da aromatase por cinco anos garantem sobrevida em 20 anos de até 85%, com risco de recidiva de 22% (3). Longo tempo de seguimento é recomendado após o diagnóstico e tratamento do câncer de mama; e com o envelhecer o risco de comorbidades aumenta (4,5,6,7). Devido ao fato da maior parte do diagnóstico de câncer de mama ser realizado após os 50 anos, essa população fica susceptível principalmente a doença cardiovascular (DCV), principal causa de mortalidade em mulheres na pós-menopausa (8,9,10).

O risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama é maior que em mulheres sem câncer (6, 11). Essa população tem maior risco para desenvolvimento da síndrome metabólica (SM) (6,11) - conjunto de fatores de riscos metabólicos que incluem obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e disglucemia - que reconhecidamente associa-se ao aumento no risco de desenvolvimento de DCV em mulheres na pós-menopausa (12). Recente revisão sistemática analisou a relação entre o câncer de mama com o risco de morte por DCV em uma população de 1.217.910 mulheres, participantes de 14 estudos. A prevalência de morte por DCV em mulheres com câncer de mama variou de 1,6% a 10,4% independente da idade e estágio oncológico. As mulheres com câncer de mama apresentaram maior risco de mortalidade por DCV do que as mulheres da população

em geral (13). Em mulheres na pós-menopausa com câncer de mama inicial, o risco aumenta sensivelmente, com a taxa de mortalidade em 10 anos por DCV semelhante à taxa pelo próprio câncer (10,14).

O alto risco de DCV em mulheres com câncer de mama não se deve apenas aos maus hábitos no estilo de vida como dieta inadequada, sedentarismo e consequente ganho de peso. O tratamento oncológico também contribui no aumento desse risco com efeitos cardiotóxicos e ateromatosos secundários (13,15,16). Algumas terapias de câncer de mama podem aumentar o risco de disfunção cardíaca como a quimioterapia com antraciclina e trastuzumab; e a radioterapia do hemitórax esquerdo (15). Efeitos cardiovasculares secundários a aterosclerose coronariana podem ocorrer a partir de cinco anos após a exposição da radioterapia torácica do lado esquerdo e a persistência do risco permanece até 30 anos (16). A hormonioterapia com inibidores da aromatase também aumentam o risco de desenvolvimento da doença aterosclerótica periférica (15).

Baseado nesses dados, o objetivo do presente estudo foi avaliar os fatores de risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama comparadas às mulheres sem câncer.

MÉTODOS

Desenho do Estudo e Seleção da Amostra

Trata-se de estudo clínico de corte transversal e comparativo. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas no Ambulatório de Oncologia do município de Rio Claro/SP e no Ambulatório de Climatério & Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)-UNESP, no período de 2016 a 2017. O cálculo do

tamanho amostral foi embasado nos estudos de Melichar *et al.* (17) e Nahas *et al.* (18) que demonstraram diferenças na incidência de aterosclerose subclínica em mulheres com e sem câncer de mama, respectivamente, com redução de 27% em relação às pacientes sem câncer. Considerando a diferença entre os valores e corrigindo a estimativa para os efeitos dos erros do tipo I (5%) e do tipo II (20%) atribuídos ao estudo, estimou-se tamanho amostral de no mínimo 92 pacientes com câncer de mama.

Foram incluídas no grupo de estudo mulheres com: (1) data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade ≥ 45 anos; (2) diagnóstico histológico de câncer de mama; (3) ter completado tratamentos cirúrgico, radioterápico e quimioterápico (quando indicado); (4) estádios I, II ou III; (5) não etilista e não drogaditas; e (6) sem antecedente pessoal de DCV (angina, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral). Foram excluídas aquelas com idade superior a 75 anos e dados incompletos. O grupo controle foi constituído de mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade ≥ 45 anos, sem câncer de mama (comprovado por mamografia do último ano), e sem antecedente pessoal de DCV. Os grupos foram pareados pela idade, tempo de menopausa e índice de massa corpórea (IMC), na proporção de um caso para dois controles (1:2), a partir de um banco de dados. Foram incluídas 96 mulheres tratadas de câncer de mama e 192 mulheres sem câncer de mama. Para todas as pacientes selecionadas foram esclarecidos os objetivos e procedimentos a que seriam submetidas, e solicitadas às assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMB- UNESP.

Metodologia

Inicialmente, no dia da consulta, foram coletados por meio de entrevista individual, os seguintes dados: idade, idade e tempo de menopausa, paridade, tabagismo, uso de terapia hormonal (TH), antecedentes familiares de DCV, antecedentes pessoais de hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes, dislipidemias, e frequência de atividade física semanal. Foram definidas como tabagistas as pacientes com o hábito de fumar diariamente, não importando o número de cigarros fumados. Foram consideradas ativas as mulheres que praticavam exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada, pelo menos 30 minutos, de três a cinco vezes na semana (90-150min/sem) ou exercícios de resistência três dias por semana. Foram consideradas com síndrome metabólica (SM) as mulheres que apresentaram três ou mais critérios diagnósticos propostos pelo *US National Cholesterol Education Program / Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATP III) (19): circunferência da cintura > 88 cm; triglicerídios ≥ 150 mg/dL; HDL colesterol < 50 mg/dL; pressão arterial sanguínea $\geq 130/85$ mmHg; glicose ≥ 100 mg/dL ou sob terapia.

Foram obtidos os seguintes dados para avaliação antropométrica: peso, altura, índice de massa corpórea ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$) e circunferência da cintura (CC). Foram empregados os critérios da *World Health Organization* de 2002 para classificação das pacientes, conforme o IMC: menor que $24,9 \text{ kg/m}^2$ - normal, de $25-29,9 \text{ kg/m}^2$ - sobrepeso, e maior ou igual 30 kg/m^2 como obesidade. Para a medida da CC foi empregado o ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca, com a paciente em posição ortostática; sendo considerada aumentada para mulheres, acima de 88 cm (19).

Análise Bioquímica

Foi realizada avaliação do perfil lipídico e glicídico pela mensuração do colesterol total (CT), HDL, LDL, triglicerídeos (TG), glicose e insulina. As mensurações de triglicerídeos, colesterol total, HDL e glicose foram processadas pelo analisador bioquímico automático RAXT (*Technicon*[®], USA), quantificadas pelo método colorimétrico, utilizando-se reagentes comerciais específicos (*Sera-Pak*[®], Bayer, USA). O LDL foi obtido, subtraindo-se o valor do CT, da soma do HDL e do TG dividido por cinco (20). Os valores considerados ótimos foram: CT <200 mg/dL, HDL >50mg/dL, LDL <100 mg/dL, TG <150 mg/dL e glicose <100mg/dL (19). A insulina foi quantificada pelo Sistema Immulite[®] (*DPC*[®],USA), que emprega imunoensaio, em fase sólida, por quimioluminescência, para uso em analisador automático, designado para leitura quantitativa. A taxa de normalidade segundo o método empregado foi de 6,0 a 27,0 µIU/ml. Para a avaliação da resistência insulínica (RI) foi utilizado método baseado em medida estática com dois constituintes plasmáticos (insulina e glicose de jejum). O HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistant*) foi calculado pela fórmula: $\text{Insulina } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glicose de jejum (mg/dl)} / 405$. Valores que indicam RI foi definido como HOMA-IR > 2,7 (21).

Para determinação das concentrações plasmáticas das *Heat Shock Protein* (HSP) 60 e 70 foram empregados os imunoensaios (*Assay Designs*[®], Stressgen, USA) pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), em fase sólida, com duração de 5 horas, obedecendo às recomendações do fabricante dos kits, conforme descritos previamente (22). A sensibilidade analítica para as diferentes determinações foi de HSP60 de 3.12 ng/ml e HSP70 de 0.09 ng/ml. O coeficiente de variação intra e interensaio foram inferiores a 10% segundo descrição dos Kits. Todas as dosagens

foram realizadas em único momento, para minimizar variações interensaios, por único pesquisador biomédico especializado (Orsatti CL).

Ecografia das Artérias Carótida

As artérias carótidas direita e esquerda foram examinadas com *scanner duplex*, utilizando transdutor linear de 7.0 MHz pelo aparelho Logiq 7 (GE[®], Waukesha, Wisconsin, USA), com ecocardiograma acoplado. As artérias carótidas foram avaliadas próximas a bifurcação a partir do plano longitudinal para a mensuração da espessura do complexo médio-intimal (CMI), que é definido como a largura incluindo a interface lúmen-íntima/média-adventícia, por meio da ultrassonografia (23). As medidas foram realizadas durante o período diastólico final (correspondente à onda R do eletrocardiograma), a dois centímetros proximais do bulbo carotídeo, com a paciente em decúbito dorsal inclinando a cabeça 45° no sentido contrário ao da artéria avaliada (24). Esta medida foi realizada em três ciclos cardíacos consecutivos, em ambas as carótidas sendo considerada para avaliação final da espessura a média das seis medidas. O exame foi realizado por um único radiologista especialista. Doença aterosclerótica subclínica foi definida pela presença de placa aterosclerótica e/ou espessamento do CMI maior que 1,0 mm, ponto de corte indicador de eventos clínicos cardiovasculares (25).

Anatomopatológico e Imunohistoquímica

A partir da análise dos prontuários foram obtidos os seguintes dados: diagnóstico histopatológico do câncer de mama, grau, *status* de receptor hormonal (receptor de estrogênio, RE; receptor de progesterona, RP), receptor do fator de

crescimento epidérmico humano-2, HER2 e a atividade proliferativa epitelial (Ki67), estágio do tumor, tratamentos realizados (cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia) e o tempo de seguimento. O diâmetro do tumor foi obtido dos laudos histopatológicos e, graduados em grau I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (indiferenciado), utilizando como critérios os aspectos arquiteturais, o grau de diferenciação nuclear e o índice mitótico (26). O estadiamento patológico do tumor foi definido de acordo com a 6ª edição do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, sistema TNM (tamanho do tumor, *status* linfonodal, metástase) (27).

O perfil do receptor hormonal e a atividade proliferativa epitelial foram avaliados por métodos padrão, utilizando imunohistoquímica (IHQ) para receptores de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e o índice de proliferação celular (Ki-67). A IHQ com anticorpos para ER, PR, HER2, Ki-67 foi realizada de acordo com os métodos complexos de estreptavidina-biotina-peroxidase (DakoCytomation®, Glostrup, Dinamarca). De acordo com o perfil de IHQ, os tumores foram agrupados em quatro subtipos: 1- Luminal A: RE positivo, RP positivo, HER-2 negativo e Ki-67 <14%; 2- Luminal B: RE positivo, RP positivo ou negativo, HER-2 positivo ou negativo, Ki-67 ≥14%; 3- Não - luminal HER-2: RE e RP negativos e HER-2 positivo; 4- Triplo-negativo: RE, RP e HER-2 negativos (28). Os receptores de estrogênio e progesterona foram considerados positivos quando houve marcação nuclear em mais de 1% das células tumorais (29). O Ki67 foi considerado positivo se mais de 14% das células tumorais estivessem marcadas (28). O HER2 foi considerado positivo se a IHC fosse 3+ (marcação completa de membrana) ou se a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), realizada

sistematicamente em todos os tumores de IHC 2+, apresentasse amplificação genômica HER2 (30).

Análise Estatística

A partir dos dados foram construídas tabelas das variáveis clínicas e dos parâmetros avaliados segundo grupo de mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama (n=96) e sem câncer (n=192). As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição pelo Teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo Teste de Levene. Para análise dos dados foi calculado média e desvio-padrão para variáveis quantitativas e, frequência e porcentagem, para variáveis qualitativas. Para comparação entre os grupos em relação às características quantitativas foi empregado o Teste *t-student* e a distribuição Gama (variáveis assimétricas). Na associação entre a frequência das características categóricas foi empregado o Teste do Qui-quadrado. Foi realizada análise multivariada por regressão logística binária, considerando-se intervalo de confiança (IC) de 95%, com cálculo da respectiva odds ratio (OR), para examinar a associação entre o câncer de mama (variável independente) e os fatores de risco cardiovascular (tabagismo, SM, hipertensão, diabetes, obesidade, CC elevada, HDL baixo, hipertrigliceridemia, CMI elevada e presença de placa ateromatosa como variáveis dependentes), sendo ajustada para idade, tempo de menopausa e IMC (variáveis confundidoras). Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente. As análises foram realizadas utilizando-se o programa *Statistical Analyses System (SAS)*, versão 9.4.

RESULTADOS

As características clínicas, antropométricas e bioquímicas das mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama (n=96) e sem a doença (controle, n=192), foram submetidas à comparação estatística, e estão representadas nas Tabelas 1 e 2. Na Tabela 1 verificou-se que os grupos foram homogêneos para as seguintes variáveis: idade, tempo de menopausa, índice de massa corpórea (IMC), circunferência da cintura (CC), e nos valores de colesterol total, HDL, LDL, insulina, HOMA-IR ($p>0.05$). Observou-se diferença estatisticamente significativa quanto à paridade, pressão arterial sistólica e diastólica, e nos valores de triglicerídeos, glicose e HSP 60 e 70. As pacientes tratadas de câncer de mama apresentaram menor paridade quando comparadas ao controle (média de 1.9 vs 2.7 filhos, respectivamente) ($p<0.001$). Em relação à pressão arterial, as pacientes tratadas de câncer de mama tiveram valores médios mais elevados da sistólica e diastólica ($p<0.001$). Na avaliação bioquímica, valores médios de triglicerídeos e glicose mostraram-se superiores em mulheres tratadas de câncer de mama ($p<0.05$). Observou-se que as pacientes no grupo câncer de mama apresentaram valores mais altos de HSP 60 e mais baixos de HSP 70 quando comparado ao controle (Tabela 1).

Na associação dos fatores de risco cardiovascular, não houve diferença entre os grupos quanto o tabagismo, uso de TH, sedentarismo, hipertensão, história familiar de IAM, obesidade, resistência à insulina (HOMA-IR) e nos valores de colesterol total, HDL e LDL (Tabela 2). Foi observada maior ocorrência de diabetes e síndrome metabólica entre as mulheres tratadas de câncer mama quando comparadas ao controle (19,8% vs 6,8% e 54,2% vs 30,7%, respectivamente) ($p<0.05$). Assim como, maior porcentagem de mulheres tratadas de câncer de mama apresentava valores acima dos desejáveis de

triglicerídeos e glicose ($p < 0,05$) (Tabela 2). Na avaliação da aterosclerose subclínica - medida do complexo médio-intimal das artérias carótidas superior a 1 mm - não foi observada diferença significativa entre os grupos, apenas uma tendência a maior ocorrência no grupo câncer de mama quando comparado ao controle (26,0% vs 18,7%, respectivamente, $p = 0,062$). Entretanto, quando analisada a presença de placas nas artérias carótidas, pacientes tratadas de câncer de mama apresentaram maior ocorrência quando comparadas ao grupo controle (19,8% vs 9,4%, respectivamente) ($p = 0,013$) (Tabela 2).

Na análise de risco ajustado para idade, tempo de menopausa e IMC, as mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram risco significativamente aumentado para síndrome metabólica (OR=4.21; IC 95% 2.28-7.76), presença de placa aterosclerótica (OR=2.61; IC 95% 1.19-5.72), diabetes (OR=4.42; IC 95% 1.86-10.49), hipertrigliceridemia (OR=2.32; IC 95% 1.33-4.0) e circunferência da cintura elevada (OR=11.22; IC 95% 4.0 – 31.65) quando comparadas as mulheres sem câncer de mama (Tabela 3). Os demais fatores de risco cardiovascular avaliados não apresentaram diferenças entre os grupos.

Na avaliação das características anatomopatológicas do câncer de mama, encontrou-se que 46.9% das mulheres apresentavam tumores menores que 2cm, 42.7% estavam no estágio I (doença inicial), 87.5% foram submetidas a cirurgia conservadora, 35.4% com linfonodos axilares positivos, RE e RP eram positivos em 84.4% e 76.0% respectivamente, HER2 foi negativo em 84.4% e Ki67 estava acima de 14% em 67.7% dos casos. Na distribuição dos subtipos moleculares do câncer de mama, 34.4% dos tumores eram luminal A, 37.5% luminal B, 15.6% não-luminal HER2 e 12.5% triplo negativo (Tabela 4). Em relação os tratamentos realizados, todas as

pacientes foram submetidas à radioterapia, 54.2% realizaram quimioterapia, 57.3% faziam uso de tamoxifeno e 19.8% de inibidor de aromatase. O tempo médio de seguimento foi de 4.6 ± 2.0 anos (dados não demonstrados).

Tabela 1. Comparação das características clínicas e laboratoriais entre as 96 mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama e as 192 mulheres na pós-menopausa.

| Parâmetros | CA de mama (n=96) | Controle (n=192) | Valor p^* |
|--------------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| Idade, anos | 59.8 (9.0) | 58.59 (8.2) | 0.158 ^a |
| Idade da menopausa, anos | 48.3 (4.1) | 49.0 (3.5) | 0.742 ^a |
| Tempo de menopausa, anos | 11.5 (8.3) | 10.0 (7.4) | 0.320 ^b |
| Paridade, nº de filhos | 1.9 (1.1) | 2.7 (1.8) | <.0001 ^b |
| IMC, kg/m ² | 27.7 (5.5) | 28.8 (4.5) | 0.696 ^a |
| CC, cm | 96.6 (13.1) | 94.4 (12.6) | 0.074 ^a |
| PAS, mmHg | 134.1 (12.0) | 131.0 (16.4) | 0.001 ^a |
| PAD, mmHg | 87.7 (10.2) | 80.5 (10.9) | <.0001 ^a |
| Colesterol Total, mg/dL | 197.3 (41.0) | 203.8 (38.5) | 0.188 ^a |
| HDL, mg/dL | 52.6 (12.0) | 52.8 (12.7) | 0.906 ^a |
| LDL, mg/dL | 114.6 (30.7) | 118.9 (36.4) | 0.328 ^a |
| Triglicerídeos, mg/dL | 154.8 (68.3) | 131.5 (64.3) | 0.003 ^b |
| Glicose, mg/dL | 110.6 (43.9) | 94.5 (15.6) | <.0001 ^b |
| Insulina, µUI/mL | 10.1 (6.1) | 10.6 (6.2) | 0.465 ^b |
| HOMA-IR | 2.8 (2.6) | 2.6 (1.9) | 0.058 ^b |
| HSP 60 | 35.0 (17.6) | 10.8 (5.7) | <.0001 ^b |
| HSP 70 | 0.5 (1.7) | 1.3 (1.2) | <.0001 ^b |

Valores expressos em média (desvio padrão). IMC, índice de massa corporal; CC, circunferência da cintura; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; HDL, *high-density lipoprotein*; LDL, *low-density lipoprotein*; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HSP, *heat shock protein*.

* Diferença significativa se $P < 0,05$ (^aTeste *t-Student* ou ^bTeste de Distribuição Gama).

Tabela 2. Associação entre os fatores de risco cardiovascular entre as 96 mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama e as 192 mulheres na pós-menopausa.

| Características | CA Mama (n=96) | Controle (n=192) | Valor de p* |
|--|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| Tabagismo, n (%) | 14 (14.6) | 34 (17.7) | 0.178 |
| Uso de TH, n (%) | 12 (12.5) | 33 (17.2) | 0.302 |
| Sedentarismo, n (%) | 84 (87.5) | 155 (79.1) | 0.149 |
| Hipertensão, n (%) | 41 (42.7) | 88 (45.8) | 0.615 |
| Diabetes, n (%) | 19 (19.8) | 13 (6.8) | 0.001 |
| Síndrome Metabólica, n (%) | 52 (54.2) | 59 (30.7) | 0.0001 |
| HF de IAM, n (%) | 9 (9.3) | 17 (8.8) | 0.274 |
| IMC \geq 30kg/m ² , n (%) | 38 (39.6) | 68 (35.4) | 0.489 |
| CC \geq 88cm, n (%) | 76 (79.2) | 133 (69.3) | 0.076 |
| CT \geq 200mg/dL, n (%) | 46 (47.9) | 98 (51.0) | 0.617 |
| HDL < 50 mg/dL, n (%) | 44 (45.8) | 81 (42.2) | 0.556 |
| LDL \geq 100 mg/dL, n (%) | 63 (65.6) | 130 (67.7) | 0.851 |
| TG \geq 150 mg/dL, n (%) | 43 (44.8) | 52 (27.1) | 0.002 |
| Glicose \geq 100 mg/dL, n (%) | 40 (41.7) | 49 (25.5) | 0.005 |
| HOMA-IR >2.7, n (%) | 37 (38.5) | 59 (32.1) | 0.278 |
| CMI > 1mm, n (%) | 25 (26.0) | 36 (18.7) | 0.062 |
| Placa Ateromatosa, n (%) | 19 (19.8) | 18 (9.4) | 0.013 |

Valores expressos em número e porcentagem entre parênteses. TH, terapia hormonal; HF, história familiar; IAM, infarto agudo do miocárdio; IMC, índice de massa corporal; CC, circunferência da cintura; CT, colesterol total; HDL, *high-density lipoprotein*; LDL, *low-density lipoprotein*; TG, triglicerídeos; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; CMI, Complexo Médio-Intimal. *Diferença significativa $p < 0,05$ (Teste do Qui-Quadrado).

Tabela 3- Análise de risco dos fatores de risco para doença cardiovascular entre as mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama (n=96) comparadas às mulheres sem câncer de mama (n=192).

| Variáveis* | Odds ratio (OR) | IC 95% | Valor de p** |
|---------------------------------|------------------------|---------------|---------------------|
| Síndrome Metabólica | 4.21 | 2.28-7.76 | <.0001 |
| Diabetes | 4.42 | 1.86-10.49 | <.0001 |
| Placa ateromatosa | 2.61 | 1.19-5.72 | 0.016 |
| Triglicerídeos \geq 150 mg/dL | 2.32 | 1.33-4.0 | 0.003 |
| CC \geq 88cm | 11.22 | 4.0-31.65 | <.0001 |

IC, intervalo de confiança; CC, circunferência da cintura.

* Apresentados apenas os resultados estatisticamente significativos; demais variáveis analisadas não houve significância.

** $p < 0.05$ (regressão logística).

Tabela 4. Características oncológicas das 96 mulheres tratadas de câncer de mama.

| Variáveis | Número (%) |
|---------------------------------|------------|
| Tamanho do tumor | |
| ≤ 2 | 45 (46.9) |
| 2-5 | 29 (30.2) |
| ≥ 5 | 22 (22.9) |
| Grau | |
| Baixo | 24 (25.0) |
| Intermediário | 48 (50.0) |
| Alto | 24 (25.0) |
| Estádio do Tumor (TNM) | |
| I | 41 (42.7) |
| II | 37 (38.5) |
| III | 18 (18.8) |
| Linfonodos, n (%) | |
| Negativo | 62 (64.6) |
| Positivo | 36 (35.4) |
| Receptor de Estrogênio, n (%) | |
| Positivo | 81 (84.4) |
| Negativo | 15 (15.6) |
| Receptor de Progesterona, n (%) | |
| Positivo | 73 (76.0) |
| Negativo | 23 (24.0) |

| | |
|-------------------------|-----------|
| HER2, n (%) | |
| Positivo | 15 (15.6) |
| Negativo | 81 (84.4) |
| Ki-67, n (%) | |
| < 14% | 31 (32.3) |
| ≥ 14% | 65 (67.7) |
| Subtipo, n (%) | |
| Luminal A | 33 (34.4) |
| Luminal B | 36 (37.5) |
| não-luminal HER2 | 15 (15.6) |
| Triplo negativo | 12 (12.5) |
| Tipo de Cirurgia, n (%) | |
| Conservadora | 84 (87.5) |
| Mastectomia | 12 (12.5) |
| Quimioterapia, n (%) | |
| Sim | 52 (54.2) |
| Não | 44 (45.8) |
| Radioterapia, n (%) | |
| Sim | 96 (100) |
| Não | 0 (0.0) |
| Hormonioterapia, n (%) | |
| Tamoxifeno | 55 (57.3) |
| Inibidor da Aromatase | 19 (19.8) |
| Não | 22 (22.9) |

Valores expressos em número e porcentagem entre parênteses. Estádio do Tumor, estágio I (T1N0M0), estágio II (IIA/T0N1M0, T1N1M0 e T2N0M0; e IIB/ T2N1M0 e T3N0M0), estágio III

(IIIA/T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 e T3N2M0; IIIB/T4N0M0, T4N1M0 e T4N2M0; IIIC/T qualquer N3M0); HER2, receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2; Ki67, atividade proliferativa epitelial.

DISCUSSÃO

A presente pesquisa demonstrou a associação entre o câncer de mama e o risco aumentado para DCV em mulheres na pós-menopausa. Por se tratar de um estudo comparativo com grupo controle, foi possível determinar que as mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram maior risco para o desenvolvimento da doença aterosclerótica (OR-2.4), síndrome metabólica (OR-4.2), diabetes (OR-4.42), hipertrigliceridemia (OR-2.3) e obesidade abdominal (OR-11.2), importantes fatores de risco cardiovascular. Na avaliação das HSP, mulheres com câncer de mama apresentaram maiores valores da HSP 60 e menores da HSP 70, corroborando para o entendimento de que essas mulheres estão expostas a maior risco de mortalidade por DCV quando comparas às mulheres na mesma faixa etária sem câncer de mama.

As HSP apresentam funções de protetoras e guardiãs moleculares contra danos celulares provocados em respostas a diversos estímulos, auxiliando as células a combater possíveis agentes agressores ao organismo (31). Sua expressão é regulada por vários fatores, incluindo infecção, hipóxia, estresse oxidativo e inflamação (32). Estudos sugerem o envolvimento das HSP no desenvolvimento da DCV (33,34,35). As HSP60 e 70 são proteínas encontradas nas mitocôndrias e citoplasma, respectivamente, expressas pelas células normais com função de proteção contra o estresse induzido (32,36,37). A relação das HSP60 e HSP70 com a doença cardiovascular é antagônica, sendo a presença da HSP 60 no ambiente extracelular

considerada como um fator de risco para a DCV e a HSP 70 como fator protetor (36). A HSP60 está aumentada no soro de pacientes com doença aterosclerótica (33,34), em indivíduos com DCV manifesta (38) e relacionada com a presença da síndrome metabólica em mulheres na pós-menopausa (18). Por outro lado, estudos observaram que valores plasmáticos elevados de HSP70 protegeriam contra o desenvolvimento da DCV (39,40,41), associada especificamente como fator de proteção na gênese da placa de ateroma (36).

No presente estudo, mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram valores séricos significativamente maiores de HSP 60 e menores de HSP 70, quando comparadas às mulheres sem câncer de mama. Gunaldi *et al.* estudaram o valor preditivo do nível sérico da HSP 70 em pacientes com câncer de mama. O desenho do estudo incluiu 45 mulheres com câncer de mama inicial, sem nenhum tratamento oncológico, pareadas por idade e índice de massa corpórea com 16 mulheres saudáveis. Os autores encontraram níveis significativamente maiores de HSP 70 no grupo com câncer de mama (5.98 ± 2.05 vs. 1.49 ± 0.47 ng/ml). O estudo concluiu que a HSP 70 pode ser utilizada em conjunto com outros testes diagnósticos de câncer de mama, para auxiliar a identificar pacientes com risco aumentado para a doença (42). Diferentemente do nosso estudo, as pacientes estudadas por Gunaldi *et al* foram avaliadas no momento do diagnóstico do câncer de mama, enquanto as nossas mulheres haviam tratado da doença, com tempo de seguimento médio de $4,2 \pm 2,0$ anos. Isso poderia sugerir que o estilo de vida adotado após o diagnóstico do câncer de mama, associado à toxicidade do tratamento oncológico, pode associar-se a um perfil metabólico inflamatório. No presente estudo, os valores encontrados das HSP 60 e 70, associados a maior prevalência de aterosclerose subclínica e síndrome metabólica no

grupo com câncer de mama, demonstraram que mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama têm risco aumentado para DCV.

Aterosclerose é definida como processo crônico, progressivo e sistêmico, consequente à resposta inflamatória e fibroproliferativa causada por agressão a superfície endotelial das artérias (43). É, portanto, doença generalizada da parede arterial, caracterizada por remodelamento que pode permanecer silenciosa por muito tempo, ou manifestar-se como evento vascular agudo, tornando-se clinicamente aparente (44). Recentes consensos reconhecem que a medida do CMI carotídeo por ultrassonografia em modo B pode fornecer uma avaliação independente do risco coronariano (45). Em nosso estudo, na avaliação ultrassonográfica das artérias carótidas, as mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram maior ocorrência de placa ateromatosa quando comparadas ao grupo controle (19,8% vs 9,4%, respectivamente). Esses dados estão em concordância com o estudo de Melichar *et al.*, que investigando a espessura do CMI em 192 mulheres tratadas de câncer de mama, encontraram placa ateromatosa em 18% dos casos, porém sem comparação com grupo controle (17).

A placa ateromatosa ocorre em resposta a danos e reparações cíclicas na camada íntima das artérias, em resposta a lesões mecânicas (fluxo sanguíneo), a fatores de risco metabólicos clássicos (diabetes, hipertensão, dislipidemia) e por qualquer estímulo prejudicial ao endotélio seguido de eventos reparadores. Ciclos repetidos de dano/reparação da íntima seriam seguidos pelo aparecimento do núcleo inicial da placa ateromatosa, constituído por células amorfas, lipídicas e necróticas cercadas por uma cápsula (46). A avaliação da placa carotídea medida através de

ultrassonografia carotídea tridimensional mostra-se promissora na melhoria da predição de risco de DCV (47). A identificação precoce da aterosclerose subclínica pode levar a modificações de estilo de vida mais agressivas e a tratamentos para prevenir manifestações clínicas da doença, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou insuficiência renal (44).

Entre os fatores de risco cardiovascular, no presente estudo foi observada maior ocorrência de síndrome metabólica entre as mulheres tratadas de câncer mama quando comparadas ao controle (54.2% vs 30.7%, respectivamente). A síndrome metabólica (SM) associa-se com o aumento no risco de desenvolvimento da DCV e diabetes tipo II. É definida como um conjunto de fatores de riscos metabólicos que incluem obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão arterial e disglícemia (48). Mulheres tratadas de câncer de mama têm adicional aumento do risco de SM resultante do excesso de adiposidade e efeito dos tratamentos (6,49,50,51). Semelhante aos nossos resultados, Buttros *et al.* demonstraram que pacientes na pós-menopausa tratadas de câncer de mama (n=208) apresentaram aumento do risco de desenvolver SM (OR=1,66; IC 95% 1,04–2,68), disglícemia (OR=1,05; IC95% 1,09–3,03) e hipertensão arterial (OR=1,71; IC95% 1,02–2,89) quando comparadas às mulheres de mesma faixa etária sem a doença. A SM esteve presente em 50% das pacientes tratadas de câncer de mama e em 37,5% no grupo controle (6).

Recente estudo avaliou a prevalência de critérios que compõem a SM (circunferência da cintura, diabetes, pressão arterial e níveis séricos de colesterol) em 8.641 mulheres (média de idade de 62.9 anos) com câncer de mama inicial. Após o seguimento de 11.3 anos, 28% das mulheres faleceram pelo câncer de mama e 21% por DCV. O estudo associou a obesidade abdominal (circunferência da cintura > 88cm)

como fator de risco para morte por câncer de mama; e todos os critérios integrantes da SM como fatores de risco para morte por DCV (14). No presente estudo, mulheres com câncer de mama apresentaram valores médios elevados de pressão arterial, além de risco 11.2 vezes maior de apresentar obesidade abdominal, 4.42 vezes de diabetes e 2.3 vezes de hipertrigliceridemia, quando comparadas ao grupo controle.

Idade, tabagismo, obesidade, diabetes, dislipidemia e história familiar estão associadas com aumento do risco de desenvolvimento da DCV (52-9). No presente estudo, o diabetes e a hipertrigliceridemia foram mais prevalentes entre as mulheres tratadas de câncer de mama quando comparadas a mulheres sem câncer (19,8% vs 6,8% e 44,8% vs 27,1%, respectivamente). Em concordância com nosso resultado, estudo demonstrou que aproximadamente 16% das pacientes com câncer de mama apresentavam diabetes (52). Diabetes e câncer de mama são doenças crônicas bastante prevalentes entre as mulheres (53). A coexistência de diabetes e câncer de mama pode alterar os regimes de tratamento e a toxicidade da quimioterapia, afetando negativamente o prognóstico (53). Estudo retrospectivo com 4.000 mulheres tratadas de câncer de mama demonstrou que essa população é menos monitorizada em relação ao perfil bioquímico e na detecção de DCV quando comparada a população geral. O estudo enfatiza que a detecção precoce da DCV e o uso da medicação ideal associada à mudança do estilo de vida, modificam o risco cardiovascular, além de melhorar o prognóstico e sobrevida da doença oncológica (54). Estudo recente comparou 4.955 mulheres com câncer de mama e diabetes comparadas a 9.910 mulheres com câncer de mama sem diabetes. O estudo demonstrou que as mulheres com diabetes apresentaram maior taxa de mortalidade geral quando comparadas às

mulheres sem diabetes (OR 1.42, 95%, IC 1.3-1.55 vs OR 1.24, IC 1.05-1.46, respectivamente) (55).

Em recente publicação, a *American Heart Association* (AHA) demonstrou grande preocupação com a saúde cardiovascular em mulheres com câncer de mama. Além do estilo de vida pouco saudável adotado pela maioria das mulheres após o diagnóstico do câncer de mama, o documento associa os tratamentos oncológicos ao alto risco de cardiotoxicidade e posterior repercussão cardiovascular (15). O uso de alguns esquemas com antraciclinas, trastuzumab e radioterapia do hemitórax esquerdo, utilizadas isoladamente ou em conjunto, e em doses específicas, são comprovadamente cardiopatóxicas (13,15,16,56). As alterações cardíacas podem variar de disfunção de ventrículo esquerdo, hipertensão, arritmias, isquemia miocárdica, doença valvar, doença tromboembólica, hipertensão pulmonar e pericardite. A disfunção sistólica do ventrículo esquerdo é o efeito colateral mais comumente relatado (15). No presente estudo não houve correlação dos tratamentos oncológicos com os fatores de risco cardiovasculares estudados. O tempo de seguimento da população com câncer de mama ($4,2 \pm 2,0$ anos) pode ter sido pequeno para a identificação de tais alterações. A ecocardiografia é indicada para o diagnóstico de alterações cardíacas subclínicas (15) e não foi realizada no presente estudo, uma vez que o objetivo da pesquisa não incluía o diagnóstico de alterações em órgão alvo.

A presente pesquisa apresenta limitação quanto ao desenho do estudo, pois embora os resultados tenham sido ajustados para alguns potenciais confundidores, por se tratar de um estudo transversal, não é possível provar uma relação causal entre o câncer de mama e o risco de DCV. Entretanto, o ponto forte da nossa pesquisa foi ser

um estudo controlado com a presença de um grupo considerável de mulheres saudáveis, sem DCV e pareadas pela idade, tempo de menopausa e IMC, importantes fatores influenciadores do risco de DCV. Os resultados encontrados demonstram que as mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram importantes fatores de risco cardiovascular.

Na atual pesquisa, aproximadamente 80% das mulheres com câncer de mama estavam no estágio oncológico I e II (42.7% e 38.5%, respectivamente), sendo 85% dos tumores com receptores hormonais positivos, podendo ser consideradas como pacientes com prognóstico oncológico favorável. O alto risco cardiovascular encontrado nessas pacientes pode ser mais preocupante que o próprio risco oncológico no médio-longo prazo. Assim, mulheres com diagnóstico de câncer de mama devem ser amparadas por equipes multidisciplinares, incluindo a abordagem cardiológica desde o momento do diagnóstico do câncer de mama, inclusive no seguimento oncológico das pacientes. Equipes de cardio-oncologia foram inseridas na rotina de serviços oncológicos pelas principais sociedades de cardiologia do mundo, demonstrando a grande preocupação na relação do câncer de mama com a DCV (15).

Em conclusão, mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram maior risco para síndrome metabólica, diabetes, doença aterosclerótica, hipertrigliceridemia e obesidade abdominal, importantes fatores de risco para DCV, quando comparadas as mulheres na pós-menopausa sem câncer de mama.

REFERÊNCIAS

1. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2018. Atlanta: American Cancer Society; 2018.

2. Tabár L, Vitak B, Chen TH, Yen AMF, Cohen A, Tot T, et al. Swedish two-county trial: impact of mammographic screening on breast cancer mortality during 3 decades. *Radiology*. 2011;260:658-63.
3. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med*. 2017;377:1836-46.
4. Gironés R, Torregrosa D, Díaz-Beveridge R. Co morbidity, disability and geriatric syndromes in elderly breast cancer survivors. Results of a single-center experience. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;73:236-45.
5. Patterson RE, Flatt SW, Saquib N, Rock SL, Caan BJ, Parker BA, et al. Medical comorbidity predict mortality in women with a history of early stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122:859-65.
6. Buttros DA, Nahas EA, Vespoli HL, Uemura G, Almeida BR, Nahas Neto J. Risk of metabolic syndrome in postmenopausal breast cancer survivors. *Menopause*. 2013;20:448-54.
7. Poloni PF, Vespoli HL, Almeida Filho BS, Bueloni-Dias F, Nahas Neto J, Nahas EAP. Low bone mineral density is associated with breast cancer in postmenopausal women: a case–control study. *Climacteric*. 2017;20:491-7.
8. Bouchardy C, Rapiti E, Blagojevic S, Vlastos AT, Vlastos G. Older female cancer patients: importance, causes, and consequences of undertreatment. *J Clin Oncol*. 2007;25:1858-69.
9. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation*. 2007;115:1481-501.
10. Bardia A, Arieas ET, Zhang Z, Defilippis A, Tarpinian K, Jeter S, et al. Comparison of breast cancer recurrence risk and cardiovascular disease incidence risk among postmenopausal women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;131:907-14.
11. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, Bellastella G, Maiorino MI, Rafaniello C, et al. Metabolic syndrome and postmenopausal breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Menopause*. 2013;20:1301-9.

12. Gurka MJ, Vishnu A, Santen RJ, DeBoer MD. Progression of metabolic syndrome severity during the menopausal transition. *J Am Heart Assoc.* 2016;5:1-15.
13. Gernaat SAM, Ho PJ, Rijnberg N, Emaus MJ, Baak LM, Hartman M, et al. Risk of death from cardiovascular disease following breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;164:537-55.
14. Simon MS, Beebe-Dimmer JL, Hastert TA, Manson JE, Cespedes Feliciano EM, Neuhaus ML, et al. Cardiometabolic risk factors and survival after breast cancer in the women's health initiative. *Cancer.* 2018:1-10. doi:10.1002/cncr.31230. (Igual a ref. 53)
15. Mehta L, Watson KE, Barac A, Beckie TM, Bittner V, Cruz-Flores S, et al. Cardiovascular disease and breast cancer: where these entities intersect. A scientific statement from the american heart association. *Circulation.* 2018;137(11). doi:10.1002/cncr.31230.
16. Iliescu C, Grines CL, Herrmann J, Yang EH, Cilingiroglu M, Charitakis K, et al. SCAI expert consensus statement: evaluation, management, and special considerations of cardio-oncology patients in the cardiac catheterization laboratory. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2016;87:895-9.
17. Melichar B, Kalábová H, Ungermann L, Krčmová L, Hyšpler R, Kašparová M, et al. Carotid intima-media thickness and laboratory parameters of atherosclerosis risk in patients with breast cancer. *Anticancer Res.* 2012;32:4077-84.
18. Nahas EA, Nahas Neto J, Orsatti CL, Tardivo AP, Uemura G, Peraçoli MT, et al. The 60 – and 70 kDa heat-shock proteins and their correlation with cardiovascular risk factors in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Cell Stress Chaperones.* 2014;19:559-68.
19. NCEP Expert Panel on the Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP). Adult treatment panel III (ATP III). *JAMA.* 2001;285:2444-9.
20. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.

21. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixture population IR in the brazilian metabolic syndrome study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;72:219–20
22. Kim YS, Koh JM, Lee YS, Kim BJ, Lee SH, Lee KU, et al. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors. *Bone.* 2009;45:68-76.
23. Polak JF. Carotid intima-media thickness: an early marker of cardiovascular disease. *Ultrasound Q.* 2009;25:55-61.
24. Mercuri M, Tang R, Phillips RM, Bond MG. Ultrasound protocol and quality control procedures in the european lacidipine study atherosclerosis. *Blood Press Suppl.* 1996;4:20-3.
25. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Riswall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic and meta-analysis. *Circulation.* 2007;115:459-67.
26. Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol.* 1993;46:189-90.
27. American Joint Committee on Cancer. *Cancer staging manual.* 6th ed. Chicago: Springer; 2002. p. 227-8.
28. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes– dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22:1736-47.
29. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:907-22.
30. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol.* 2003;199:418-23.

31. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1113:28-39.
32. Niizeki T, Takeishi Y, Watanabe T, Nitobe J, Miyashita T, Miyamoto T, et al. Relation of serum heat shock protein 60 level to severity and prognosis in chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2008;102:606-10. (igual a ref. 38)
33. Zhang X, He M, Cheng I, Chen Y, Zhou L, Zeng H, et al. Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk coronary disease in Chinese. *Circulation.* 2008;118:2687-93.
34. Shamaei-Tousi A, Halcox JP, Henderson B. Stressing the obvious? Cell stress and cell stress proteins in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74:19-28.
35. Ellins E, Shamaei-Tousi A, Steptoe A, Donald A, O'Meagher S, Halcox J, et al. The relationship between carotid stiffness and circulating levels of heat shock protein 60 in middle-aged men and women. *J Hypertens.* 2008;26:2389-92.
36. Pockley AG, Henderson B. Extracellular cell stress (heat shock) proteins-immune responses and disease: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1738):1-15.
37. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8:411-6.
38. Shamaei-Tousi A, Stephens JW, Bin R, Cooper JA, Steptoe A, Coates AR, et al. Association between plasma levels of heat shock protein 60 and cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J.* 2006;27:1565-70.
39. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, Csako G, Rott D, Zalles-Ganley A, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1055-9.
40. Pockley AG, de Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegård J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens.* 2002;20:1815-20.
41. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegård J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension.* 2003;42:235-8.

42. Gunaldi M, Afsar CU, Okuturlar Y, Gedikbasi A, Kocoglu H, Kural A, et al. Elevated serum levels of heat shock protein 70 are associated with breast cancer. *J Exp Med*. 2015;236:97-102.
43. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006;37:1923-32.
44. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135:e146-603.
45. Smith SC Jr, Greenland P, Grundy SM. Prevention conference V: beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: executive summary. *Circulation*. 2000;101:111-6.
46. Rognoni A, Cavallino C, Veia A, Bacchini S, Rosso R, Facchini M, et al. Pathophysiology of atherosclerotic plaque development. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2015;13:10-3.
47. Baber U, Mehran R, Sartori S, Schoos MM, Sillesen H, Muntendam P, et al. Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults: the Biolmage study. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:1065-74.
48. Schneider JG, Tompkins C, Blumenthal RS, Mora S. The metabolic syndrome in women. *Cardiol Rev*. 2006;14:286-91.
49. Thomson CA, Thompson PA, Wright-Bea J, Nardi E, Frey GR, Stopeck A. Metabolic syndrome and elevated C-reactive protein in breast cancer survivors on adjuvant hormone therapy. *J Womens Health*. 2009;18:2041-7.
50. Healy LA, Ryan AM, Carroll P, Ennis D, Crowley V, Boyle T, et al. Metabolic syndrome, central obesity and insulin resistance are associated with adverse pathological features in postmenopausal breast cancer. *Clin Oncol*. 2010;22:281-8.
51. Porto LA, Lora KJ, Soares JC, Costa LO. Metabolic syndrome is an independent risk factor for breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2011;284:1271-6.
52. Long A, Long B, Koyfman A. Non-traditional risk factors for atherosclerotic disease: a review for emergency physicians. *Am J Emerg Med*. 2018;36:494-7.

53. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. Invasive breast cancer version 1.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14:324-54.
54. Eagle KA, Ginsburg GS, Musunuru K, Aird WC, Baladan RS, Bennett SK, et al. Identifying patients at high risk of a cardiovascular event in the near future: current status and future directions: report of a national heart, lung, and blood institute working group. *Circulation*. 2010;121:1447-54.
55. Lega IC, Austin PC, Fischer HD, Fung K, Krzyzanowska MK, Amir E, et al. The impact of diabetes on breast cancer treatments and outcomes: a population-based study. *Diabetes Care*. 2018. doi: 10.2337/dc17-2012.
56. Pereira EB, Gemignani T, Sposito AC, Matos-Souza JR, Nadruz W Jr. Low-density lipoprotein cholesterol and radiotherapy-induced carotid atherosclerosis in subjects with head and neck cancer. *Radiat Oncol*. 2014; 9:134.

5. Conclusões

1. Comparadas às mulheres na pós-menopausa sem câncer, as mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram maior risco para síndrome metabólica, diabetes, doença aterosclerótica, hipertrigliceridemia e obesidade abdominal, importantes fatores de risco para doença cardiovascular.
2. Mulheres tratadas de câncer de mama apresentaram valores elevados de HSP 60 e diminuídos de HSP 70 quando comparadas às mulheres sem câncer.

6. Referências

1. International Agency for Research on Cancer. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide [Internet]. Lyon: IARC; 2012 [citado 14 Fev 2018]. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018-2019: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2018.
3. American Cancer Society. Breast cancer facts & figures 2018. Atlanta: American Cancer Society, Inc.; 2018.
4. Tabár L, Vitak B, Chen TH, Yen AMF, Cohen A, Tot T, et al. Swedish two-county trial: impact of mammographic screening on breast cancer mortality during 3 decades. *Radiology*. 2011;260:658-63.
5. Moss SM, Wale C, Smith R, Evans A, Cuckle H, Duffy SW. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality in the UK Age trial at 17 years' follow-up: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:1123-32.
6. Urban LA, Chala LF, Bauab SP, Schaefer MB, Santos RP, Maranhão NMA, et al. Recomendações do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, da Sociedade Brasileira de Mastologia e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia para rastreamento do câncer de mama por métodos de imagem. *Radiol Bras*. 2017;50:244-9.
7. Amaral P, Luz L, Cardoso F, Freitas R. Distribuição espacial de equipamentos de mamografia no Brasil. *Rev Bras Estud Urbanos Reg*. 2017;19:326-41.
8. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med*. 2017;377:1836-46.
9. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365:1687-717.

10. The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;378:771-84.
11. The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet*. 2015;386:1341-52.
12. Kostev K, Kalder M. 20-year risk of breast cancer recurrence. *Breast Cancer Res Treat*. 2018. doi: 10.1007/s10549-017-4636-3
13. Ganz PA. Survivorship: adult cancer survivors. *Prim Care*. 2009;36:721-41.
14. Gironés R, Torregrosa D, Díaz-Beveridge R. Co morbidity, disability and geriatric syndromes in elderly breast cancer survivors. Results of a single-center experience. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;73:236-45.
15. Buttros D, Nahas EA, Vespoli HL, Uemura G, Almeida BR, Nahas Neto J. Risk of metabolic syndrome in postmenopausal breast cancer survivors. *Menopause*. 2013;20:448-54.
16. Poloni PF, Vespoli HL, Almeida-Filho BS, Bueloni-Dias F, Nahas Neto J, Nahas EAP. Low bone mineral density is associated with breast cancer in postmenopausal women: a case-control study. *Climacteric*. 2017;20:491-7.
17. Rao AV, Demark-Wahnefried W. The older cancer survivor. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;60:131-43.
18. Mosher CE, Sloane R, Morey MC, Snyder DC, Cohen HJ, Miller PE, et al. Associations between lifestyle factors and quality of life among older long-term breast, prostate, and colorectal cancer survivors. *Cancer*. 2009;115:4001-9.
19. Rose DP, Komninou D, Stephenson GD. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obes Rev*. 2004;5:153-65.
20. Gallicchio L, Calhoun C, Riseberg D, Helzlsouer K. Cardiovascular health among black and white breast cancer patients initiating aromatase inhibitor therapy. *Breast J*. 2017;23:206-9.
21. Mosca L, Banka CL, Benjamin EJ, Berra K, Bushnell C, Dolor RJ, et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women: 2007 update. *Circulation*. 2007;115:1481-501.

22. Bird BR, Swain SM. Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. *Clin Cancer Res.* 2008;14:14-24.
23. Borger JH, Hoening MJ, Boersma LJ, Snijders-Keilholz A, Aleman BM, Lintzen E, et al. Cardiotoxic effects of tangential breast irradiation in early breast cancer patients: the role of irradiated heart volume. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;69:1131-8.
24. McGale P, Darby SC, Hall P, Adolfsson J, Bengtsson NO, Bennet AM, et al. Incidence of heart disease in 35,000 women treated with radiotherapy for breast cancer in Denmark and Sweden. *Radiother Oncol.* 2011;100:167-5.
25. Pinder MC, Duan Z, Goodwin JS, Hortobagyi GN, Giordano SH. Congestive heart failure in older women treated with adjuvant anthracycline chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:3808-15.
26. Mehta L, Watson KE, Barac A, Beckie TM, Bittner V, Cruz-Flores S, et al. Cardiovascular disease and breast cancer: where these entities intersect. A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2018;137:e1-37. doi: <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000556>
27. van Dalen EC, Caron HN, Dickinson HO, Kremer LC. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;15:CD003917.
28. Sardar P, Kundu A, Chatterjee S, Nohria A, Nairooz R, Bangalore S, et al. Long-term cardiovascular mortality after radiotherapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Cardiol.* 2017;40:73-81.
29. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2404-11.
30. Mesch VR, Boero LE, Siseles NO, Royer M, Prada M, Sayegh F, et al. Metabolic syndrome throughout the menopausal transition: influence of age and menopausal status. *Climacteric.* 2006;9:40-8.
31. Nahas EAP, Padoani NP, Nahas Neto J, Orsatti FL, Tardivo AP, Dias R. Metabolic syndrome and its associated risk factors in Brazilian postmenopausal women. *Climacteric.* 2009;12:431-8.
32. Rock CL, Flatt SW, Newman V, Caan BJ, Haan MN, Stefanick ML, et al. Factors associated with weight gain in women after diagnosis of breast cancer.

- Women's Health Eating and Living Study Group. *J Am Diet Assoc.* 1999;99:1212-21.
33. Healy LA, Ryan AM, Carroll P, Ennis D, Crowley V, Boyle T, et al. Metabolic syndrome, central obesity and insulin resistance are associated with adverse pathological features in postmenopausal breast cancer. *Clin Oncol.* 2010;22:281-8.
 34. Thomson CA, Thompson PA, Wright-Bea J, Nardi E, Frey GR, Stopeck A. Metabolic syndrome and elevated C-reactive protein in breast cancer survivors on adjuvant hormone therapy. *J Women Health.* 2009;18:2041-7.
 35. Esposito K, Chiodini P, Capuano A, Bellastella G, Maiorino MI, Rafaniello C, et al. Metabolic syndrome and postmenopausal breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Menopause.* 2013;20:1301-9.
 36. Chelebowoski RT, Aiello E, McTierman A. Weight loss in breast cancer patient management. *J Clin Oncol.* 2002;20:1128-43.
 37. Irwin ML, Crumley D, McTiernan A, Bernstein L, Baumgartner R, Gilliland FD, et al. Physical activity levels before and after a diagnosis of breast carcinoma. The Health, Eating, Activity, and Lifestyle (HEAL) Study. *Cancer.* 2003;97:1746-57.
 38. Nichols HB, Trentham-Dietz A, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Holmes MD, Bersch AJ, et al. Body mass index before and after breast cancer diagnosis: associations with all-cause, breast cancer, and cardiovascular disease mortality. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:1403-9.
 39. Ligibel JA, Campbell N, Partridge A, Chen WY, Salinardi T, Chen H, et al. Impact of a mixed strength and endurance exercise intervention on insulin levels in breast cancer survivors. *J Clin Oncol.* 2008;26:907-12.
 40. Ewer MS, Gluck S. A woman's Heart. The impact of adjuvant endocrine therapy on cardiovascular health. *Cancer.* 2009;115:1813-26.
 41. Carpenter CL, Ross RK, Paganini-Hill A, Bernstein L. Effect of family history, obesity and exercise on breast cancer risk among postmenopausal women. *Int J Cancer.* 2003;106:96-102.
 42. Zheng J, Tabung FK, Zhang J, Liese AD, Shivappa N, Ockene JK, et al. Association between post-cancer diagnosis dietary inflammatory potential and mortality

- among invasive breast cancer survivors in the Women's Health Initiative. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0569
43. Seewaldt VL, Goldenberg V, Jones LW, Peace C, Broadwater G, Scott V, et al. Overweight and obese perimenopausal and postmenopausal women exhibit increased abnormal mammary epithelial cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16:613-6.
 44. Pan H, Gray RG, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effect of obesity in premenopausal ER+ early breast cancer: EBCTCG data on 80,000 patients in 70 trials. *J Clin Oncol.* 2014;32(15 Suppl):503.
 45. Cui Y, Whiteman MK, Glaws JA. Body mass index and stage of breast cancer at diagnosis. *Int J Cancer.* 2002;98:279-83.
 46. Berclaz G, Li S, Price KN, Coates AS, Castiglione-Gertsch M, Rudenstam CM, et al. Body mass index as a prognostic feature in operable breast cancer: the International Breast Cancer Study Group experience. *Ann Oncol.* 2004;15:875-84.
 47. Ziegler RG. Anthropometry and breast cancer. *J Nutr.* 1997;127:924S–8S.
 48. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity and mortality from cancer in a prospective studied cohort of US adults. *N Engl J Med.* 2003;348:1625-38.
 49. Pichard C, Plu-Bureau G, Neves-E Castro M, Gompel A. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas.* 2008;60:19-30.
 50. Ibarra-Drendall C, Dietze EC, Seewaldt VL. Metabolic syndrome and breast cancer risk: is there a role for metformin? *Curr Breast Cancer Rep.* 2011;3:142-50.
 51. Campagnoli C, Pasanini P, Peris C, Berrino F. Insuline-like growth factor I and breast cancer: epidemiological and clinical data. In: Pasqualini JR, editors. *Breast cancer: prognosis, treatment and prevention.* 2nd ed. New York: Informa Healthcare; 2008. p. 323–42.
 52. Key T, Appleyby P, Reeves G, Roddam A, Group TEHaBCC. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol.* 2010;11:530–42.

53. Papa V, Pezzino V, Costantino A, Belfiore A, Giuffrida D, Frittitta L, et al. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. *J Clin Invest.* 1990;86:1503-10.
54. Brand JS, van der Tweel I, Grobbee DE, Emmelot-Vonk MH, van der Schouw YT. Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Epidemiol.* 2011;40:189-207.
55. Ellins E, Shamaei-Tousi A, Steptoe A, Donald A, O’Meagher S, Halcox J, et al. The relationship between carotid stiffness and circulating levels of heat shock protein 60 in middle-aged men and women. *J Hypertens.* 2008;26:2389-92.
56. Gernaat S, Ho PJ, Rijnberg N, Emaus MJ, Baak LM, Hartman M, et al. Risk of death from cardiovascular disease following breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;164:537-55.
57. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G. Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8:411-6.
58. Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:55–63.
59. Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:45–51.
60. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1113:28-39.
61. Niizeki T, Takeishi Y, Watanabe T, Nitobe J, Miyashita T, Miyamoto T, et al. Relation of serum heat shock protein 60 level to severity and prognosis in chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2008;102:606-10.
62. Gupta S, Knowlton AA. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. *Circulation.* 2002;106:2727–33.
63. Kalmar B, Greensmith L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:310-8.
64. Lu X, Kakkar V. The role of heat shock protein (HSP) in atherosclerosis: pathophysiology and clinical opportunities. *Curr Med Chem.* 2010;17:957-73.

65. Moseley PI. Heat shock protein and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol.* 1997;83:1413-7.
66. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR signaling. *J Clin Invest.* 2006;116:2022-32.
67. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-95.
68. Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegard J. Circulating HSP 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension.* 2000;36:303-7.
69. Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation.* 2000;102:14-20.
70. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:361-403.
71. Zhang X, He M, Cheng I, Chen Y, Zhou L, Zeng H, et al. Elevated heat shock protein 60 levels are associated with higher risk coronary disease in Chinese. *Circulation.* 2008;118:2687-93.
72. Shamaei-Tsousi A, Halcox JP, Henderson B. Stressing the obvious? Cell stress and cell stress proteins in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2007;74:19-28.
73. Ellins E, Shamaei-Tousi A, Steptoe A, Donald A, O'Meagher S, Halcox J, et al. The relationship between carotid stiffness and circulating levels of heat shock protein 60 in middle-aged men and women. *J Hypertens.* 2008;26:2389-92.
74. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest.* 1999;103:571-7.
75. Liao DF, Jin Z-G, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275:189-96.
76. Niizeki T, Takeishi Y, Watanabe T, Nitobe J, Miyashita T, Miyamoto T, et al. Relation of serum heat shock protein 60 level to severity and prognosis in

- chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2008;102:606-10.
77. Pockley AG, Shepherd J, Corton JM. Detection of heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal individuals. *Immunol Invest.* 1998;27:367-78.
 78. Pockley AG, Bulmer J, Hanks BM, Wright BH. Identification of human heat shock protein 60 (Hsp60) and anti-Hsp60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. *Cell Stress Chaperones.* 1999;4:29–35.
 79. Zhu J, Quyyumi AA, Rott D, Csako G, Wu H, Halcox J, et al. Antibodies to human heat-shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation.* 2001;103:1071-5.
 80. Zhu J, Quyyumi AA, Wu H, Csako G, Rott D, Zalles-Ganley A, et al. Increased serum levels of heat shock protein 70 are associated with low risk of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1055-9.
 81. Kervinen H, Huittinen T, Vaarala O, Leinonen M, Saikku P, Manninen V, et al. Antibodies to human heat shock protein 60, hypertension and dyslipidemia. A study of joint effects on coronary risk. *Atherosclerosis.* 2003;169:339-44.
 82. Pershinka H, Mayr M, Millonig G, Mayerl C, Van der Zee R, Morrison SG, et al. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1060-5.
 83. Xiao Q, Mandal K, Schett G, Mayr M, Wick G, Oberhollenzer F, et al. Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Stroke.* 2005;36:2571-6.
 84. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:185-94.
 85. Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2002;23:130-5.
 86. Tsan MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C739-44.

87. Halcox JP, Deanfield J, Shamaei-Tsousi A, Henderson B, Steptoe A, Coates AR, et al. Circulating human heat shock protein 60 in the blood healthy teenagers: a novel determinant of endothelial dysfunction and early vascular injury? *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:e141-2.
88. Pockley AG, de Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegård J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens.* 2002;20:1815-20.
89. Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Daire U, Frostegard J. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension.* 2003;42:235-8.
90. Bielecka-Dabrowa A, Barylski M, Mikhailidis DP, Rysz J, Banch M. HSP 70 and atherosclerosis--protector or activator? *Expert Opin Ther Targets.* 2009;13:307-17.
91. Han Z, Trong QA, Parks S, Breslow JI. Two Hsp70 family members express in atherosclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:1256-61.
92. Zhu W, Roma P, Pellegatta F, Catapano AL. Oxidized-LDL induce the expression of heat shock protein 70 human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;200:389-94.
93. Zhu W, Roma P, Pirillo N, Pellegatta F, Catapano AL. Oxidized-LDL induces HSP 70 expression in human smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1995;372:1-5.
94. Matsumoto M, Dimayuga PC, Wang C, Kirzner J, Cercek M, Yano J, et al. Exogenous heat shock protein-70 inhibits cigarette smoke-induced intimal thickening. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295:R1320-7.
95. Dulin E, García-Barreno P, Guisasola MC. Extracellular heat shock protein 70 (HSPA1A) and classical vascular risk factors in general population. *Cell Stress Chaperones.* 2010;15:929-37.

96. Nahas EA, Nahas Neto J, Orsatti CL, Tardivo AP, Uemura G, Peraçoli MT, et al. The 60 – and 70 kDa heat-shock proteins and their correlation with cardiovascular risk factors in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19:559-68.
97. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SAW, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein Hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:570–74.
98. Blagosklonny MV. Re: Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:239-40.
99. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;34:1999–2009.
100. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression. profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415:530-6.
101. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10:86-103.
102. Ciocca DR, Stati AO, Amprino de Castro MM. Colocalization of estrogen and progesterone receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in paraffin sections of human breast and endometrial cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 1990;16:243-51.
103. Vargas-Roig LM, Fanelli MA, López LA, Gago FE, Tello O, Aznar JC, et al. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detect Prev*. 1997;21:441-51.
104. Muñoz de Toro MM, Luque EH. Lack of relationship between the expression of Hsp27 heat shock estrogen receptor-associated protein and estrogen receptor or progesterone receptor status in male breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997;60:277-84.
105. Tauchi K, Tsutsumi Y, Hori S, Yoshimura S, Osamura RY, Watanabe K. Expression of heat shock protein 70 and c-myc protein in human breast cancer: an immunohistochemical study. *Jpn J Clin Oncol*. 1991;21:256-63.

106. Takahashi S, Mikami T, Watanabe Y, Okazaki M, Okazaki Y, Okazaki A, et al. Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 1994;101:519-25.
107. Lazaris ACh, Chatzianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis BCh. Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;43:43–51.
108. Jameel A, Skilton RA, Cambell TA, Chander SK, Coombes RC, Luqmani YA. Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *Int J Cancer.* 1992;50:409-15.
109. Yano M, Naito Z, Yokoyama M, Shiraki Y, Ishiwata T, Inokuchi M, et al. Expression of Hsp90 and cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett.* 1999;137:45–51.
110. Thor A, Benz C, Moore D, Goldman E, Edgerton S, Landry J, et al. Stress response protein (srp- 27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histologic, and prognostic correlations. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83:170-8.
111. Damstrup L, Andersen J, Kufe DW, Hayes DF, Poulsen HS. Immunocytochemical determination of the estrogen regulated proteins Mr 24,000, Mr 52,000 and DF3 breast cancer associated antigen: clinical value in advanced breast cancer and correlation with estrogen receptor. *Ann Oncol.* 1992;3:71–7.
112. Love S, King RJB. A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1994;69:743-8.
113. Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Ciocca DR, Allred DC, Clark GM, Chamness GC, et al. The small heat shock protein HSP27 is not an independent prognostic marker in axillary lymph node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1199–206.
114. Conroy SE, Sasieni PD, Fentiman I, Latchman DS. Autoantibodies to the 90kDa heat shock protein and poor survival in breast cancer patients. *Eur J Cancer.* 1998;34:942-3.

115. Fanelli MA, Cuello Carrión FD, Dekker J, Schoemaker J, Ciocca DR. Serological detection of heat shock protein Hsp27 in normal and breast cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:791-5.
116. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SAW, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein Hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:570-4.
117. Elledge RM, Clark GM, Fuqua SAW, Yo YY, Allred DC. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Res.* 1994;54:3752-7.
118. Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remani S, et al. Genetic variation in the tumor necrosis factor- α promoter region and in the stress protein Hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer.* 2001;91:672-8.
119. Thanner F, Sutterlin MW, Kapp M, Rieger L, Kristen P, Dietl J, et al. Heat-shock protein 70 as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Anticancer Res.* 2003;23:1057-62.
120. Jameel A, Skilton RA, Cambell TA, Chander SK, Coombes RC, Luqmani YA. Clinical and biological significance of HSP89 α in human breast cancer. *Int J Cancer.* 1992;50:409-15.
121. Seymour L, Bezwoda WR, Meyer K. Tumor factors predicting for prognosis in metastatic breast cancer. The presence of P24 predicts for response to treatment and duration of survival. *Cancer.* 1990;66:2390-4.
122. Ciocca DR, Green S, Elledge RM, Clark GM, Pugh R, Ravdin P, et al. Heat shock proteins Hsp27 and Hsp70: lack of correlation with response to tamoxifen and clinical course of disease in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer (a Southwest Oncology Group study). *Clin Cancer Res.* 1998;5:1263-6.
123. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer.* 1998;79:468-75.
124. Gunaldi M, Afsar CU, Okuturlar Y, Gedikbasi A, Kocoglu H, Kural A, et al. Elevated serum levels of heat shock protein 70 are associated with breast cancer. *J Exp Med.* 2015;236:97-102.

125. Melichar B, Kalábová H, Ungermann L, Krčmová L, Hyšpler R, Kašparová M, et al. Carotid intima-media thickness and laboratory parameters of atherosclerosis risk in patients with breast cancer. 2012;32:4077-84.
126. Nahas EA, Nahas-Neto J, Orsatti CL, Sobreira ML, Tardivo AP, Witkin SS. Evaluation of clinical and inflammatory markers of subclinical carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Menopause*. 2014;21:982-9.
127. NCEP Expert Panel on the detection, evaluation, and treatment of high blood pressure in adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Adult Treatment Panel III (ATP III). *JAMA*. 2001;285:2444-9.
128. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499-502.
129. Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixture population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006;72:219–20
130. Kim YS, Koh JM, Lee YS, Kim BJ, Lee SH, Lee KU, et al. Increased circulating heat shock protein 60 induced by menopause, stimulates apoptosis of osteoblast-lineage cells via up-regulation of toll-like receptors. *Bone*. 2009;45:68-76.
131. Polak JF. Carotid intima-media thickness: An early marker of cardiovascular disease. *Ultrasound Q*. 2009;25:55-61.
132. Mercuri M, Tang R, Phillips RM, Bond MG. Ultrasound protocol and quality control procedures in the European Lacidipine Study Atherosclerosis. *Blood Press Suppl*. 1996;4:20-3.
133. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Riswall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic and meta-analysis. *Circulation*. 2007;115:459-67.
134. Elston EW, Ellis IO. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol*. 1993;46:189-90.
135. American Joint Committee on Cancer. *Cancer Staging Manual*. 6th ed. Chicago: American Joint Committee on Cancer; 2002. p. 227-8.

136. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes– dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer, 2011. *Ann Oncol.* 2011;22:1736–47.
137. Wells CA, Heryet A, Brochier J, Gatter KC, Mason DY. The immunocytochemical detection of axillary micrometastases in breast cancer. *Br J Cancer.* 1984;50:193-7.
138. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:907-22.
139. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138:241-56.
140. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, et al. Correlation between immunohistochemistry (HercepTest) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 in 426 breast carcinomas from 37 centres. *J Pathol.* 2003;199:418-23.

7. Anexos

7.1. Anexo I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Eu.....tendo sido informada, concordo em participar do estudo “Associação das HSP 60 e 70 com os fatores cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa tratadas de câncer de mama”, que será realizado sob a responsabilidade do Dr. Daniel Buttros e da Profa.Dra. Eliana Aguiar Petri Nahas.

Fui informada de que o objetivo da pesquisa é verificar se a presença no meu sangue das proteínas HSP 60 e 70 estão relacionadas com o risco de desenvolver doenças do coração em mulheres na pós-menopausa. Entendo que minha participação será de responder a um questionário, com duração de 10 minutos, passar por uma avaliação clínica com medidas de pressão arterial, peso, altura e medida da minha cintura, além da coleta de sangue para exames e realização de ultrassonografia das carótidas.

Estou ciente de que minhas respostas são confidenciais e que os dados serão divulgados nas publicações em revistas científicas, sem identificação da minha pessoa. Estou ciente que os pesquisadores responsáveis estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas, de que minha participação é voluntária e de que tenho o direito de receber informações adicionais sobre o estudo. Fui informada de que posso retirar-me deste estudo, sem prejuízos de cuidados médicos. Caso não me sinta satisfeita poderei entrar em contato com o médico responsável pela pesquisa.

Declaro ter lido e compreendido este consentimento, na qual me foram informados os dados importantes sobre este estudo. Foi-me oferecida ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram totalmente. Qualquer problema pode ligar para Comitê de Ética em Pesquisa (14) 38116143. Estou ciente de que este consentimento será produzido em duas vias de igual teor, de forma que uma será entregue a mim e outra será arquivada pelo pesquisador.

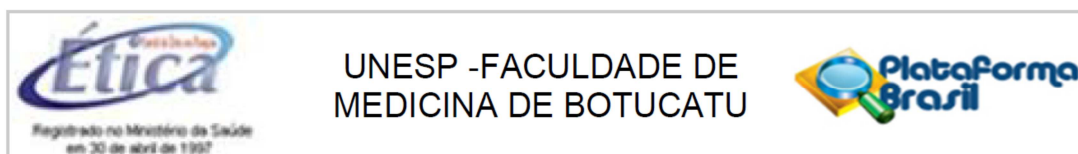
Rio Claro, ____/____/____

Assinatura da Participante

Assinatura do Pesquisador

Dr Daniel Buttros- e-mail: danielbuttros@hotmail.com

7.2. Anexo II – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMB.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DAS HSP 60 E 70 COM FATORES DE RISCO CARDIOVASCULARES EM MULHERES NA PÓS-MENOPAUSA TRATADAS DE CÂNCER DE MAMA.

Pesquisador: Daniel de Araújo Brito Buttros

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 59968716.1.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.782.545

Apresentação do Projeto:

Estratégias atuais anticâncer têm contribuído para o aumento na sobrevivência de pacientes oncológicos e em alguns casos o câncer torna-se uma doença crônica. Estudos indicam que as pacientes sobreviventes de câncer de mama são de elevado risco para outros cânceres, assim como para doenças cardiovasculares (DCV), osteoporose e diabetes; reconhecidamente uma população vulnerável. Assim, com o aumento da expectativa de vida das mulheres tratadas de câncer de mama, semelhantemente aquelas sem câncer, o risco de morte por DCV aumenta. A DCV, mormente a doença coronariana, apresenta risco que aumenta ao longo de toda a vida, com especial incremento em mulheres na pós-menopausa, quando ocupam o primeiro lugar como causa de mortalidade. Com a crescente eficácia no tratamento do câncer de mama, particularmente com uso de terapia antiestrogênica, observa-se aumento na população de sobreviventes do câncer de mama. Essas pacientes têm adicional aumento do risco de síndrome metabólica (SM), resultante do excesso de adiposidade e efeito dos tratamentos.

As proteínas de choque térmico (heat shock proteins - HSP) são proteínas plasmáticas e têm relação direta com o aumento da incidência das DCV, principalmente os subtipos HSP 60 e HSP 70.

Este estudo tem como objetivo investigar a associação das HSP 60 e 70 com o risco

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

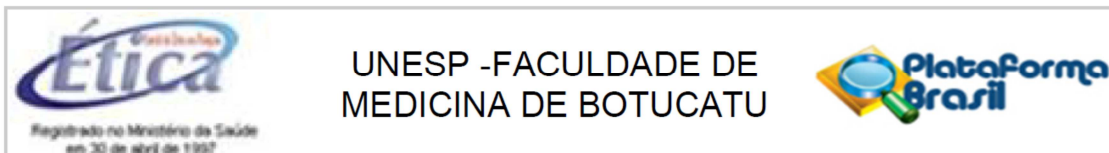
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.782.545

cardiovascular em mulheres na pós-menopausa com e sem câncer de mama.

Trata-se de estudo clínico, analítico, transversal e comparativo. A população será constituída de pacientes atendidas no ambulatório de oncologia da Santa Casa de Rio Claro/SP (grupo principal) e no Ambulatório de Climatério & Menopausa da Faculdade de Medicina de Botucatu (grupo controle). O cálculo do tamanho amostral é de 92 pacientes por grupo totalizando 184 pacientes. Serão incluídas no grupo principal mulheres com: data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade acima de 45 anos; diagnóstico histológico de câncer de mama; ter completado tratamentos cirúrgico, radioterápico e quimioterápico; sem antecedente pessoal de DCV (infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral). E serão excluídas aquelas com idade superior a 75 anos e dados incompletos. O grupo controle será constituído de mulheres com data da última menstruação há pelo menos 12 meses e idade acima de 45 anos; sem câncer; sem antecedente pessoal de DCV (infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral).

Ambos os grupos serão avaliados sob os seguintes aspectos: entrevista, exame físico (pressão arterial e circunferência abdominal), ecografia da camada íntima da artéria carótida e exames séricos (HSP 60, HSP 70, triglicérides, HDL, glicemia e insulina). Os dados do grupo principal referentes ao tratamento oncológico e características tumorais serão adquiridos por análise de prontuário.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a associação das HSP 60 e 70 com o risco cardiovascular em mulheres na pós-menopausa com e sem câncer de mama.

Objetivo Secundário:

Avaliar a relação das HSP 60 e 70 com os fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: as punções venosas poderão causar dor de leve a moderada intensidade, sangramento, hematoma, hiperemia local, infecção cutânea local.

Benefícios: avaliação do risco individual para desenvolvimento de doença cardiovascular de cada paciente incluída no estudo, com possibilidade de prevenção e tratamento das mesmas.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

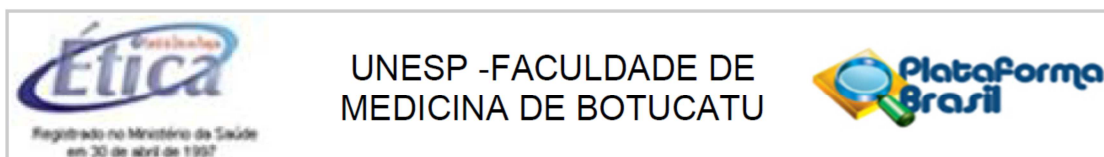
Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.782.545

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta título adequado, objetivos claros, critérios de inclusão e de exclusão bem definidos, metodologia bem descrita, avaliação de riscos e benefícios, apresentando relevância clínica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de Rosto: preenchida corretamente.
- Projeto completo de pesquisa e informações básicas do projeto: adequados. Após realizar a correção, o título cadastrado na Plataforma Brasil como Título da Pesquisa está igual ao título que consta no projeto, na anuência do EAP, na folha de rosto e no TCLE.
- Documento de Anuência do EAP: correto.
- TCLE: elaborado na forma de convite, explica os procedimentos de forma clara, explica riscos e benefícios, garante o sigilo das informações, apresentando nome, endereço, telefone, e-mail dos pesquisadores e nome, endereço, telefones e horários de funcionamento do CEP.
- Cronograma de execução: está adequado, programado para iniciar em 31/10/2016.

Recomendações:

Apresentar Relatório Final de Atividades.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação sem necessidade de envio à CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

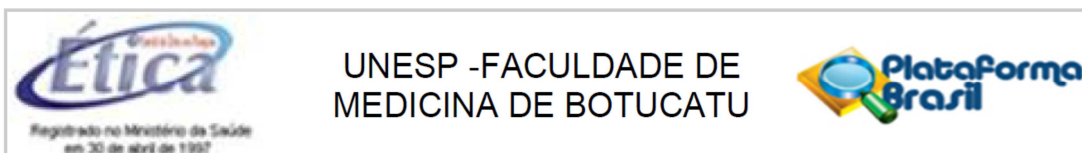
Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião EXTRAORDINÁRIA do CEP de 20 de Outubro de 2.016, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP, no entanto, solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado para análise o respectivo "Relatório Final de Atividades", o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

OBS: LEMBRAMOS QUE A PRESENTE PESQUISA SOMENTE PODERÁ SER INICIADA APÓS DIA 20/10/2016 – DATA DA APROVAÇÃO DO CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| | |
|---|--------------------------------------|
| Endereço: Chácara Butignolli , s/n | |
| Bairro: Rubião Junior | CEP: 18.618-970 |
| UF: SP | Município: BOTUCATU |
| Telefone: (14)3880-1608 | E-mail: capellup@fmb.unesp.br |



Continuação do Parecer: 1.782.545

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_782368.pdf | 11/10/2016 08:26:48 | | Aceito |
| Outros | carta_resposta.pdf | 11/10/2016 08:23:02 | Daniel de Araújo Brito Buttros | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_DETALHADO.docx | 11/10/2016 08:04:27 | Daniel de Araújo Brito Buttros | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 11/10/2016 08:04:12 | Daniel de Araújo Brito Buttros | Aceito |
| Outros | co_participante.pdf | 13/09/2016 15:24:05 | Daniel de Araújo Brito Buttros | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | autorizacao_instituicao.pdf | 13/09/2016 15:21:33 | Daniel de Araújo Brito Buttros | Aceito |
| Folha de Rosto | pagina_rosto.pdf | 13/09/2016 15:19:40 | Daniel de Araújo Brito Buttros | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 20 de Outubro de 2016

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
 (Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

7.3. Anexo III - Questionário.

Protocolo Saúde Cardiovascular x CA MAMA

Nome:.....

Idade:.....Raça: Caucasiana () não Caucasiana () Profissão.....

Grau de instrução: Fundamental () Médio () Superior ()

Estado Civil: Renda Familiar:.....

Antecedentes Pessoais

- Tabagismo: () não () sim tempo:.....cigarros/dia:.....

- Álcool (>2 doses/dia): () não ()sim tempo:.....

-Hipertensão: () Não () Sim Medicamento(s):.....

-Diabetes: () Não () Sim Medicamento(s):.....

-Dislipidemia : () Não () Sim. Medicamento(s):.....

-Doença da Tireóide () Não () Sim Medicamento(s):.....

- Medicação CA MAMA atual () Não () Sim Medicamento):.....

-Atividade física: () não ()sim Qual:.....

Freqüência (x/sem).....Tempo.....

Antecedentes Familiares

- Diabetes () Não () Sim Quem :.....

- Infarto () Não () Sim Quem:.....Qual a idade:.....

- AVC () Não () Sim Quem:.....Qual a idade:.....

- Trombose () Não () Sim Quem:.....Qual a idade:.....

- HAC: () Não () Sim Quem:.....

Medidas antropométricas:

PesoKg Altura.....cm IMC:.....kg/m²

Cintura:.....cm PA:.....

Medidas CMI (mm):

Dir: _____

Esq: _____