

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Análise do perfil das quimiocinas em pacientes com Câncer de Mama,
correlacionadas a fatores clínicos

Clara Maria Faria Silva

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Dezembro - 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Análise do perfil das quimiocinas em pacientes com Câncer de Mama,
correlacionadas a fatores clínicos

Clara Maria Faria Silva

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Dr^a. Bruna Cristina Borges

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Dezembro - 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Análise do perfil das quimiocinas em pacientes com Câncer de Mama,
correlacionadas a fatores clínicos.

Clara Maria Faria Silva

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva
Instituto de Ciências Biomédicas

Dr^a. Bruna Cristina Borges
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em 17/12/2020

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Dezembro - 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Análise do perfil das quimiocinas em pacientes com Câncer de Mama,
correlacionadas a fatores clínicos.

Clara Maria Faria Silva

Aprovado pela Banca Examinadora em: 11/12 /2020 Nota: 80 pontos



Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Uberlândia, 11 de dezembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Observando e analisando todo o trabalho para chegar aqui, devo agradecimentos para pessoas que foram importantes durante todo este processo.

Primeiramente, agradeço minha família que me apoiou durante todo o curso de biotecnologia, e ao longo de todo o processo da monografia.

Aos meus amigos que estiveram comigo desde 2017 me incentivando, apoiando e colaborando para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva que me acolheu em seu laboratório desde 2018, contribuindo e colaborando para o meu crescimento e desenvolvimento no meio acadêmico. Além de estar me orientando desde antes de todo o processo da monografia.

A minha co-orientadora Dr^a. Bruna Cristina Borges, que desde quando entrei no laboratório LAB.BIOS me ensinou e ajudou em tudo o que eu precisava. Além de me auxiliar com esta monografia desde o início, com a disciplina TCC I.

Ao futuro mestre Paulo Henrique Rosa da Silva, o qual me ensinou e acompanhou durante todo o processo de experimentos e análises estatísticas.

Ao Hospital do Câncer de Uberlândia e seus pacientes, por permitirem o desenvolvimento desta pesquisa e ofertar os dados e amostras utilizados.

Por último, e não menos importante, a todos aqueles que de alguma maneira diretamente ou indiretamente me ajudaram e estiveram ao meu lado durante esta jornada.

A todos meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O câncer de mama ocasiona inúmeros quadros clínicos e está relacionado a diversos fatores, dentre eles estão as quimiocinas, moléculas mediadoras dos processos inflamatórios. O objetivo foi analisar as quimiocinas (CCL2, CCL11, CXCL8, CXCL10 e CXCL11), e correlacioná-las com fatores (receptor de estrógeno e progesterona, HER2, estadiamento, subtipo molecular e proteína Ki-67) que compõem o quadro clínico dos pacientes com câncer de mama. Analisou-se o soro de 60 pacientes utilizando a metodologia LEGENDplex e citometria de fluxo, posteriormente desenvolveu-se a análise estatística. Observou-se maior produção de CCL11 e CXCL11 em pacientes progesterona negativos do que pacientes progesterona positivos, encontrou-se correlação entre o receptor de progesterona e proteína Ki-67 com as quimiocinas CCL11 e CXCL11. A concentração de CXCL8 está associada ao estadiamento, e pacientes do grupamento *Low* para CXCL8 possuem 2,28 vezes risco de estar no grupo de pacientes com estágio avançado do câncer, comparado com os pacientes do grupo *High*. Concluindo, existe uma nítida relação entre CCL11 e CXCL11 e receptor de progesterona, a quimiocina CXCL8 tem potencial de tornar-se biomarcador para estadiamento em pacientes com câncer de mama.

Palavras-Chave: Quimiocina, Câncer de mama e Quadro Clínico.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Justificativa | 8 |
| 2. OBJETIVOS | 9 |
| 2.1 Objetivo geral | 9 |
| 2.2 Objetivos específicos | 9 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 9 |
| 3.1 Obtenção das amostras de soro das pacientes | 9 |
| 3.1.1 Preparação das alíquotas de soro das pacientes | 10 |
| 3.2 Legend plex | 10 |
| 3.3 Citometria de fluxo | 13 |
| 3.4. Análise estatística | 13 |
| 4. RESULTADOS | 15 |
| 4.1 Informações gerais | 15 |
| 4.2 Informações descritivas (Mann-Whitney e Kruskal Wallis) | 16 |
| 4.3 Resultados dos <i>Heat Map</i> e das medianas | 19 |
| 4.4 Resultados do teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman | 23 |
| 4.5 Resultado do teste qui-quadrado de Pearson | 26 |
| 5. DISCUSSÃO | 29 |
| 5.1 Discussão das informações gerais | 29 |
| 5.2 Discussão das informações descritivas (Mann-Whitney e Kruskal Wallis) | 31 |
| 5.3 Discussão dos <i>Heat Map</i> e das medianas | 32 |
| 5.4 Discussão do teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman | 34 |
| 5.5 Discussão dos testes de qui-quadrado de Pearson | 35 |
| 6. CONCLUSÃO | 36 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |

LISTA DE TABELA

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1 | Informações Gerais (Idade e IMC)..... | 15 |
| Tabela 2 | Informações Gerais (Sexo, Hábito de Fumar e Menopausa)..... | 16 |
| Tabela 3 | Resultado descritivo das quimiocinas para receptor de estrógeno..... | 16 |
| Tabela 4 | Resultado descritivo das quimiocina para receptor de progesterona..... | 17 |
| Tabela 5 | Resultado descritivo das quimiocina para proteína HER2..... | 18 |
| Tabela 6 | Resultado descritivo das quimiocina para estadiamento..... | 18 |
| Tabela 7 | Resultado descritivo das quimiocina para subtipo molecular..... | 19 |
| Tabela 8 | Resultado das medianas para subtipo molecular..... | 23 |
| Tabela 9 | Resultado do teste de correlação de Spearman..... | 26 |
| Tabela 10 | Resultado do teste de qui-quadrado para o receptor de estrógeno..... | 27 |
| Tabela 11 | Resultado do teste de qui-quadrado para o receptor de progesterona..... | 27 |
| Tabela 12 | Resultado do teste de qui-quadrado para estadiamento..... | 28 |
| Tabela 13 | Resultado do Teste de qui-quadrado para o subtipo molecular..... | 29 |

LISTA DE FIGURA

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Classificação BI-RADS..... | 3 |
| Figura 2 | Resumo do Procedimento de ensaio para placa de filtro Legend Plex..... | 12 |
| Figura 3 | <i>Heat Map</i> do receptor de estrógeno..... | 20 |
| Figura 4 | <i>Heat Map</i> do receptor progesterona..... | 20 |
| Figura 5 | <i>Heat Map</i> da proteína HER2..... | 21 |
| Figura 6 | <i>Heat Map</i> do estadiamento..... | 21 |
| Figura 7 | <i>Heat Map</i> do subtipo molecular..... | 23 |
| Figura 8 | Gráfico da correlação entre CCL2 com o receptor de estrógeno..... | 24 |
| Figura 9 | Gráficos das correlações entre CCL11 e CXCL11 com o receptor de progesterona..... | 24 |
| Figura 10 | Gráficos das correlações entre CCL2, CCL11 e CXCL11 com a proteína Ki-67..... | 25 |

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

| | |
|--------|--|
| CCL2 | Ligante 2 da quimiocina com motivo CC ou (MCP-1) |
| CCL11 | Quimiocina 11 com motivo CC ou (Eotaxin) |
| CXCL8 | Quimiocina 8 do motivo CXC ou Interleucina 8 (IL-8) |
| CXCL10 | Quimiocina 10 do motivo CXC ou (IP-10) |
| CXCL11 | Quimiocina 11 do motivo CXC ou (I-TAC) |
| ER | Receptor de Estrógeno |
| HER2 | Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. |
| PR | Receptor de Progesterona |

1. INTRODUÇÃO

Na sociedade atual, o câncer é uma das doenças de maior presença, não só no Brasil quanto no mundo. Além disso, é uma doença capaz de ocasionar uma ampla variação de quadros, uma vez que, o mesmo pode prejudicar diferentes órgãos e tecidos, tanto em seres humanos quanto em animais. Devido a isso e demais fatores a Organização Mundial da Saúde lançou em 2020 um relatório chamado “Relatório OMS sobre o câncer: estabelecendo prioridades, investindo com sabedoria e prestando assistência a todos.”, no qual inúmeros aspectos sobre essa doença são abordados.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer, o câncer é “um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos.” (INCA, 2019). Tais células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, e são por meio delas que ocorre a formação de tumores, os quais por sua vez, podem espalhar-se para outras regiões do corpo, evento conhecido como metástase.

De acordo com os dados da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. Já o câncer de mama é o segundo mais presente na população com uma média 2,09 milhões de casos por ano, sendo que 627 mil casos foram a óbito. Logo, o câncer de mama é um dos cânceres mais comuns e um dos principais tipos de câncer em mulheres que mais ocasiona mortes (OPAS,2018; OMS, 2018).

Além disso, o câncer de mama é considerado uma doença clinicamente heterogênea. Este conceito de heterogeneidade é explicado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2019) como “A heterogeneidade deste câncer pode ser observada pelas variadas manifestações clínicas e morfológicas, diferentes assinaturas genéticas e consequentes diferenças nas respostas terapêuticas”. O câncer de mama por ser uma doença clinicamente heterogênea,

possui várias formas de ser categorizado, porém uma classificação muito utilizada é a classificação molecular: a qual é dividida em quatro categorias, de acordo com a presença ou ausência de proteínas chamadas receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona) e da proteína HER2. (FEMAMA, 2019).

Com isso o câncer da mama pode ser dividido em: Luminal A, tumores que apresentam receptores de estrógeno e progesterona positivos, contudo não apresentam a expressão da proteína HER2 e possuem crescimento mais lento das células; Luminal B: também possuem receptores de estrogênio e progesterona positivos, não expressam a proteína HER2 e apresentam um nível mais acelerado de proliferação celular; HER2: não apresentam expressão dos receptores hormonais, mas têm a expressão da proteína HER2; por fim, o triplo negativo: em que as células tumorais não possuem nem expressam os receptores hormonais, nem a proteína HER2, sendo negativo para estrogênio, progesterona e HER2 (FEMAMA, 2019).

O diagnóstico de câncer de mama pode ser estabelecido por meio de uma biópsia da área suspeita que deve ser analisada por um especialista e laudada como câncer (Instituto Oncoguia, 2017). A realização desta biópsia, no entanto, ocorre devido alguma alteração suspeita, a qual pode ser observada no exame físico ou na mamografia. Segundo o Instituto Oncoguia (2017), quando o paciente ou o médico encontram alterações no exame físico, são solicitados exames adicionais como mamografia, ou ultrassom das mamas, onde o ultrassom das mamas pode servir como complemento à mamografia, pois ajuda a diferenciar cistos de nódulos.

A ressonância magnética, usada como forma de diagnóstico, é recomendada para o rastreamento apenas em populações de alto risco, como pacientes com um histórico familiar confirmado ou suspeita, pacientes predispostos geneticamente ao câncer ou pacientes que já tiveram um primeiro câncer de mama. (Hospital Sirio-Libanês.,2019). Mamografia, ultrassom e ressonância magnética podem ser laudados com referência a uma classificação denominada

Bi-RADS, logo quando a mamografia ou ultrassom encontram alterações suspeitas, é recomendada uma biópsia. A classificação Bi-RADS é feita de acordo com a Figura 1.

| Categoria | Definições |
|-----------|--|
| 1 | Negativo |
| 0 | Necessita avaliação adicional |
| 2 | Achados benignos |
| 3 | Achados provavelmente benignos |
| 4A | Baixa suspeição de malignidade |
| 4B | Intermediária suspeição de malignidade |
| 4C | Moderada suspeição de malignidade |
| 5 | Altamente sugestivo de malignidade |

Figura 1: Classificação BI-RADS. Tabela que demonstra as categorias e suas definições da classificação BI-RADS. Fonte: Nascimento, José H. R.; et all. Acurácia dos achados mamográficos do câncer de mama: correlação da classificação BI-RADS e achados histológicos. 2010.

De acordo com Devita Centro Oncológico, atualmente não basta dizer que se trata de câncer de mama, uma vez que se tem uma imensa variedade de tipos e dentro destes, existem muitas características tumorais, as quais são utilizadas para determinar de maneira distinta todas as fases do tratamento do câncer, desde planejamento da cirurgia, até a quimioterapia e radioterapia.

Uma das coisas que se deve levar em questão para desenvolver o tratamento é a categorização do estadiamento do câncer de mama, o qual possui 5 estádios de acordo com o Hospital do Câncer de Barretos (2012):

- Estádio 0: Quando a doença está restrita ao local onde começou;
- Estádio 1: O câncer está na fase de metástase locoregional, mas possui no máximo 2cm de tamanho;
- Estádio 2: O tumor está na fase de metástase locoregional, mas possui entre 2cm e 5cm de tamanho e acometimentos de linfonodos auxiliares pouco comprometidas na axila;

- Estádio 3: A doença está na fase de metástase locoregional, mas possui tamanho maior que 5cm ou acometimentos de linfonodos auxiliares muito comprometidas na axila.
- Estádio 4: Quando a doença está no processo de metástase em outras partes do corpo.

Porém, no desenvolvimento deste estudo se adotou uma classificação de estadiamento diferente, a qual é dividida entre duas categorias: a inicial, que engloba o estágio 0, estágio 1 e estágio 2, e a categoria avançada nela se tem o tumor em estágio 3 e estágio 4.

As modalidades de tratamento do câncer de mama podem ser divididas em duas: a primeira modalidade é o tratamento local, que consiste em fazer cirurgia e o tratamento com radioterapia, além de reconstrução mamária, a segunda modalidade consiste no tratamento sistêmico, o qual envolve a quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (INCA, 2020). Além disso, os tratamentos são ligados ao estágio em que o paciente se encontra, quando o estágio é o I ou o II, o procedimento habitual consiste de cirurgia, que pode ser conservadora, com retirada apenas do tumor; ou mastectomia, com retirada da mama e reconstrução mamária (Moran, 2014). Após a cirurgia, o tratamento complementar com radioterapia pode ser indicado em algumas situações e a reconstrução mamária nos casos de mastectomia.

Ainda sobre o tratamento de pacientes no estágio I ou II, o tratamento sistêmico será determinado de acordo com o risco de recorrência, o qual é ligado com a idade do paciente, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, grau de diferenciação, assim como das características tumorais que ditarão a terapia mais apropriada (INCA,2020). Esta última baseia-se principalmente na mensuração dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona. (HAMMOND, M. E.et al. 2010).

Os tratamentos relacionados ao estágio III, são os tratamentos sistêmicos, onde na maioria das vezes, a quimioterapia é a modalidade terapêutica inicial. Após resposta adequada,

segue-se com o tratamento local, como cirurgia e radioterapia (CORTAZAR, P. et al. 2014). Já quando se trata dos tratamentos do estágio IV é fundamental que a decisão terapêutica busque o equilíbrio entre a resposta tumoral e o possível prolongamento da sobrevida, levando-se em consideração os potenciais efeitos colaterais decorrentes do tratamento (CARDOSO, F. et al. 2014). A modalidade principal nesse estágio é sistêmica, sendo o tratamento local reservado para indicações restritas.

Após contemplar todo este macro cenário, observa-se agora o microcenário, ou seja, o que está ocorrendo no corpo do paciente com câncer de mama. Sendo assim, uma circunstância que está muito relacionada com o quadro de câncer é a inflamação da região afetada, logo, a resposta inflamatória representa um componente fundamental do microambiente tumoral, sendo responsável por mediar a rede de comunicação biológica e o fluxo de sinalização molecular, que caracterizam o tecido neoplásico. Com isso, as células influenciadas pela inflamação, interagem de forma autócrina e parácrina para “controlar, delinear e remodelar o crescimento tumoral, que é impulsionado por um mecanismo dinâmico de produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas remodeladoras da matriz extracelular, criando um sistema de influência multidirecional” (FIGUEIREDO, 2019).

No meio deste fluxo de sinalização molecular, existem inúmeras agentes desempenhando suas funções para conter ou estimular a multiplicação celular, tais fatores podem ser denominados de agentes proto-oncogênes e agentes oncogênes, pois quando ativados, os proto-oncogenes tornam-se oncogenes, sendo responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas. (INCA,2019). Neste cenário é importante como forma de diagnóstico e prognóstico do paciente ter fatores capazes de serem utilizados como medidores desta proliferação, uma vez que, como dito anteriormente é fundamental saber o tamanho do tumor para se prescrever o melhor tratamento. Um dos fatores mais utilizados é explicado no parágrafo a seguir.

Uma forma de se fazer esta marcação de proliferação celular é por meio da quantificação da proteína Ki-67, a qual “é uma proteína nuclear que não é expressa nas células em repouso (G0), mas pode ser detectada na fase G1 e M do ciclo celular” (BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; e SENA, M. C. F., 2011). Além disso, estudos já foram feitos relacionando esta proteína com o câncer de mama. Pois as classificações imuno-histoquímicas incluem a avaliação de sua expressão, que é determinante para a diferenciação entre os subtipos luminal A e luminal B, da classificação molecular (Cirqueira MB, et al; 2011).

Existe uma relação entre inflamação e câncer, se faz necessário outra associação, uma vez que, o processo inflamatório gera e recruta inúmeras moléculas, dentre elas um grupo pode ser destacado, as chamadas quimiocinas, as quais “formam uma grande família de pequenas citocinas, e seus receptores são capazes de controlar a migração e residência de todas as células do sistema imune” (PALOMINO, D.C.T. e MARTI, L.C., 2015).

As quimiocinas são geralmente categorizadas em dois grupos as pró-inflamatórias e as não inflamatórias (homeostáticas). Isso porque os papéis e funções entre estes grupos se alteram, pois, as quimiocinas só podem ser categorizadas como pró-inflamatórias se elas ocasionarem e intensificarem o processo de inflação (PALOMINO, D.C.T. e MARTI, L.C., 2015). Já as quimiocinas homeostáticas são aquelas que estão envolvidas no controle da migração das células do sistema imune no decorrer do desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos (PALOMINO, D.C.T. e MARTI, L.C., 2015).

Desta forma, as quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8 são classificadas como pró-inflamatórias, enquanto a CXCL12 e a CXCL13 são homeostáticas. As quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CXCL16 têm dupla função, inflamatória e homeostática, ou seja, dependendo do cenário em que elas se encontram elas podem agir de forma a incentivar o processo inflamatório ou conter a inflamação, enquanto a CXCL4 está relacionada ao plasma ou às plaquetas. Além disso, as quimiocinas CCL2, CCL3,

CCL4, CCL5, CCL11 e CCL13 são classificadas como pró-inflamatórias, enquanto as quimiocinas CCL18, CCL19, CCL21, CCL25 e CCL27 são homeostáticas. As quimiocinas CCL1, CCL17, CCL20 e CCL22 têm dupla função inflamatória e homeostática, enquanto as quimiocinas CCL14, CCL15, CCL16 e CCL23 estão relacionadas ao plasma ou às plaquetas (PALOMINO, D.C.T. e MARTI, L.C., 2015).

Estudos apontam diversas relações entre as quimiocinas com o cenário tumoral. Por exemplo, o microambiente tumoral é essencial para o crescimento, disseminação e metástase do câncer e sabe-se que neste microambiente existe um alto número de macrófagos, estes macrófagos intratumorais correlaciona com mau prognóstico e a infiltração de macrófagos no câncer de mama se correlaciona com alta expressão do CCL2 de monócitos (Bonapace, L., et.al; 2014). Com isso a quimiocina CCL2 foi proposta como alvo para o câncer de mama metastático porque a alta expressão do CCL2 se correlaciona com uma diminuição na sobrevida de pacientes com câncer de mama (Bonapace, L., et.al; 2014).

Além deste exemplo, estudos apontam que fibroblastos ativados por células co-cultivadas de câncer de mama produzem níveis mais altos de algumas quimiocinas como CCL11 e CXCL14, acelerando o crescimento de células de câncer de mama e induzindo metástase e resistência a medicamentos. (Liu Y., 2017). De acordo com pesquisas, foi observado que a quimiocina CXCL8 em câncer de mama está associada a uma baixa sobrevida livre de recorrência em pacientes com tumores HER2 (-), ou seja, está ligada a um mau prognóstico (Cho Y.A., Sung M.K., Yeon J.Y., Ro J., Kim J., 2013).

Quando se trata da quimiocina CXCL10, estudos identificaram um papel crítico para a sinalização autócrina CXCL10 / CXCR3 na promoção do crescimento, motilidade e metástase de células tumorais. Além disso, uma análise demonstrou que a co-expressão de CXCL10 e CXCR3 previu um aumento do potencial metastático e foi associada à progressão precoce da doença metastática e baixa sobrevida geral (Wightman SC, et al., 2015).

Por fim, a quimiocina CXCL11 é altamente expressa em diferentes tumores sólidos e controla o crescimento do tumor, metástase e infiltração de linfócitos. Além disso, estudos apontam que a CXCL11 promove a progressão do tumor pelo uso tendencioso dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CXCR7 (Puchert M, Obst J., 2020). Além de todas estas funções desenvolvidas no organismo, as quimiocinas de modo geral estão sendo alvo de análise para serem utilizadas como biomarcadores para diversas doenças: o câncer de ovário (Paula, S.O.C, 2015), depressão (FREITAS, T. H, 2017) e até no câncer de mama (Lages, E. L, 2014).

Neste trabalho analisamos as amostras de pacientes com câncer de mama, em relação a expressão das quimiocinas: CCL2, CCL11, CXCL8, CXCL10 e CXCL11 as quais como dito anteriormente tem uma relação com o quadro de inflamação e dupla função e estão ligado ao cenário tumoral. Além disso, analisamos parâmetros ligados ao quadro clínico dos pacientes sendo eles: proteína Ki-67, receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator epidérmico humano tipo 2 (HER2), subtipo molecular (luminal A, luminal B, triplo negativo e HER2) e estadiamento (inicial e avançado).

1.1 Justificativa

O estudo é relevante, pois como o assunto abordado tem grande impacto na vida de muitas pessoas ao redor do mundo e descobertas nesta área de conhecimento serve como auxílio a medidas que interferem diretamente nas vidas de pacientes com esta doença. Além disso, sabe-se que existe uma relação entre as moléculas citadas (quimiocinas), com os tratamentos descritos, o prognóstico dos pacientes e como biomarcador. Por isso, este trabalho procurará elucidar mais a relação entre os fatores clínicos e as quimiocinas alvo, com isso conseguir trazer resultados possíveis de serem utilizados na prática para o auxílio do prognóstico e tratamento direcionado do câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de quimiocinas em pacientes com câncer de mama e correlacioná-las com os fatores que compõem o quadro clínico (ER, PR, HER2, estadiamento, subtipo molecular e proteína Ki-67).

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar as amostras de sangue de pacientes com câncer de mama com alvo nas quimiocinas por meio da utilização do kit Legend Plex e da citometria de fluxo.
2. Caracterizar a população dos pacientes utilizados no estudo, obtendo as informações gerais (número de pacientes, sexo dos pacientes, idade, hábito de fumar, índice de massa corporal e fase da menopausa) por meio do cálculo da média e desvio padrão.
3. Identificar e correlacionar as análises de cada quimiocina do painel pré-definido nº 740003 (BioLegend, San Diego, EUA) com o quadro clínico dos pacientes com câncer de mama (ER, PR, HER2, estadiamento, subtipo molecular e proteína Ki-67).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de soro das pacientes

Este projeto conta com a aprovação e liberação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (38930314.5.0000.5565), sendo este; 1.230.380/2015, o número do parecer. Com isso, os pacientes que concordaram em participar da pesquisa, por meio do termo que leram e assinaram, o qual se encontra anexado a este estudo (ANEXO 1), foram encaminhados para o posto de coleta de sangue do hospital do câncer, sendo coletado 12 mL de sangue venoso periférico, em tubo de coleta descartável com anticoagulante EDTA. Posteriormente à coleta, os tubos foram acondicionados sob refrigeração adequada para posterior manuseio.

Além de se obter as amostras de sangue periférico também foi obtido informações dos prontuários que os pacientes possuem no Hospital do Câncer de Uberlândia. Informações como por exemplo: idade, sexo, se fuma ou não, IMC, se já teve menopausa, qual a classificação do subtipo molecular, a quantificação da proteína Ki-67, se o paciente é receptor de estrógeno positivo ou negativo, HER2 positivo ou negativo, dentre outros componentes do quadro clínico.

3.1.1 Preparação das alíquotas de soro das pacientes

As amostras foram processadas do seguinte modo: primeiramente 100 µL do sangue foi lavado com PBS (Tampão fosfato-salino) a 0,3% BSA (albumina de soro bovino) e bloqueado com PBS a 5% BSA por 10 minutos. Após este processo as amostras foram armazenadas no ultra freezer, na temperatura de -80°C. Para a preparação das alíquotas as amostras foram descongeladas, misturadas e centrifugadas a 1.000 rpm, durante 10 minutos, para separar o plasma e algumas partículas, obtendo assim o soro dos pacientes. Com isso foram separadas alíquotas de 100µL do soro de cada um dos 60 pacientes escolhidos randomicamente.

3.2 Legend plex

Para desenvolver esta etapa, foi utilizado o Kit Human Proinflammatory Chemokine, o qual conta com a tecnologia legend plex (BioLegend, San Diego, EUA) sendo usado para identificar e quantificar as quimiocinas pró inflamatórias: CCL2, CCL11, CXCL8, CXCL10, CXCL11.

Com as alíquotas das amostras feitas, a primeira parte do processo foi preparar as esferas (*beads*), as quais foram diluídas em 1x na solução tampão que vem no kit, em uma proporção de 1:1. Para isso, agitou-se as esferas em um sonicador por 1 minuto e depois no vortex durante 30 segundos, antes de usar. Depois de ter feito isso, calculou-se o volume final de esferas a ser usado.

Além disso, o tampão de lavagem, foi feito utilizando 25 ml do tampão do kit mais 475 ml de água deionizada. Este tampão de lavagem foi deixado à temperatura ambiente e misturado

de forma eficiente. Em seguida, preparou-se a Matrix a ser usada durante o experimento, a qual foi feita adicionando 5 ml da solução tampão teste do kit, no frasco da Matrix, deixado em repouso por 15 minutos e depois misturá-los usando o vortex.

Após executada esta etapa foi preparada a curva padrão. Para isso, fez-se a reconstituição do painel padrão de inflamação liofilizado, o qual vem no kit. Para isso, teve-se que misturar a este painel 250 μ L de tampão e deixado em repouso por 10 minutos. Em seguida, foi transferido esta solução para microtubos rotulados. Com estas pré etapas prontas foi desenvolvida a diluição das amostras em 2x com o tampão de ensaio na proporção de 1:1.

Depois de todas estas etapas, foi desenvolvida a montagem da placa, foi colocado nos poços da curva padrão 25 μ L de Matrix, 25 μ L de cada padrão e 25 μ L de esferas (as quais anteriormente foram colocadas no vortex por 30 segundos). Já nos poços das amostras adicionou-se 25 μ L de tampão de ensaio, 25 μ L das amostras diluídas e 25 μ L das esferas que passaram previamente pelo vortex por 30 segundos.

Após a montagem da placa, a mesma foi selada utilizando um plástico específico o qual vem com o kit, sem colocar pressão positiva e enrolada em papel alumínio. Com isso, a placa foi colocada em um agitador, com uma agitação contínua de 800 rpm durante duas horas. Decorrido este tempo a placa passou por uma centrifuga por 5 minutos a 1050 rpm usando um rotor de balde giratório com adaptador para microplaca.

Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e secou a placa apenas uma única vez com papel, e para drenar o líquido restante dos poços foi utilizado uma pipeta, tomando cuidado com o pellet formado. Logo após, foi feita a adição de 25 μ L de anticorpos de detecção em cada poço, e selou-se novamente a placa sem fazer pressão positiva e enrolou-se a mesma em papel alumínio. Colocando-a em um prato no agitador e a prendendo, foi executada a agitação por uma hora a 800 rpm.

Depois da centrifugação se adicionou 25 µL de estreptavidina ligada ao fluorocromo PE (SA-PE), após esta etapa a placa foi selada de novo, e enrolada no papel alumínio, colocada no agitador a 800 rpm durante 30 minutos. Em seguida, passou-se novamente pela centrífuga de placas em uma rotação de 1050 rpm por um tempo de 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, a placa secada uma vez utilizando um papel, o líquido restante drenado permitindo que apenas o pellet ficasse na placa. Com isso, foi colocado em cada poço 150 µL de tampão de lavagem (1x), e as esferas foram ressuspensas usando uma pipeta.

Representação esquemática das etapas descritas nos parágrafos acima (Figura 2):

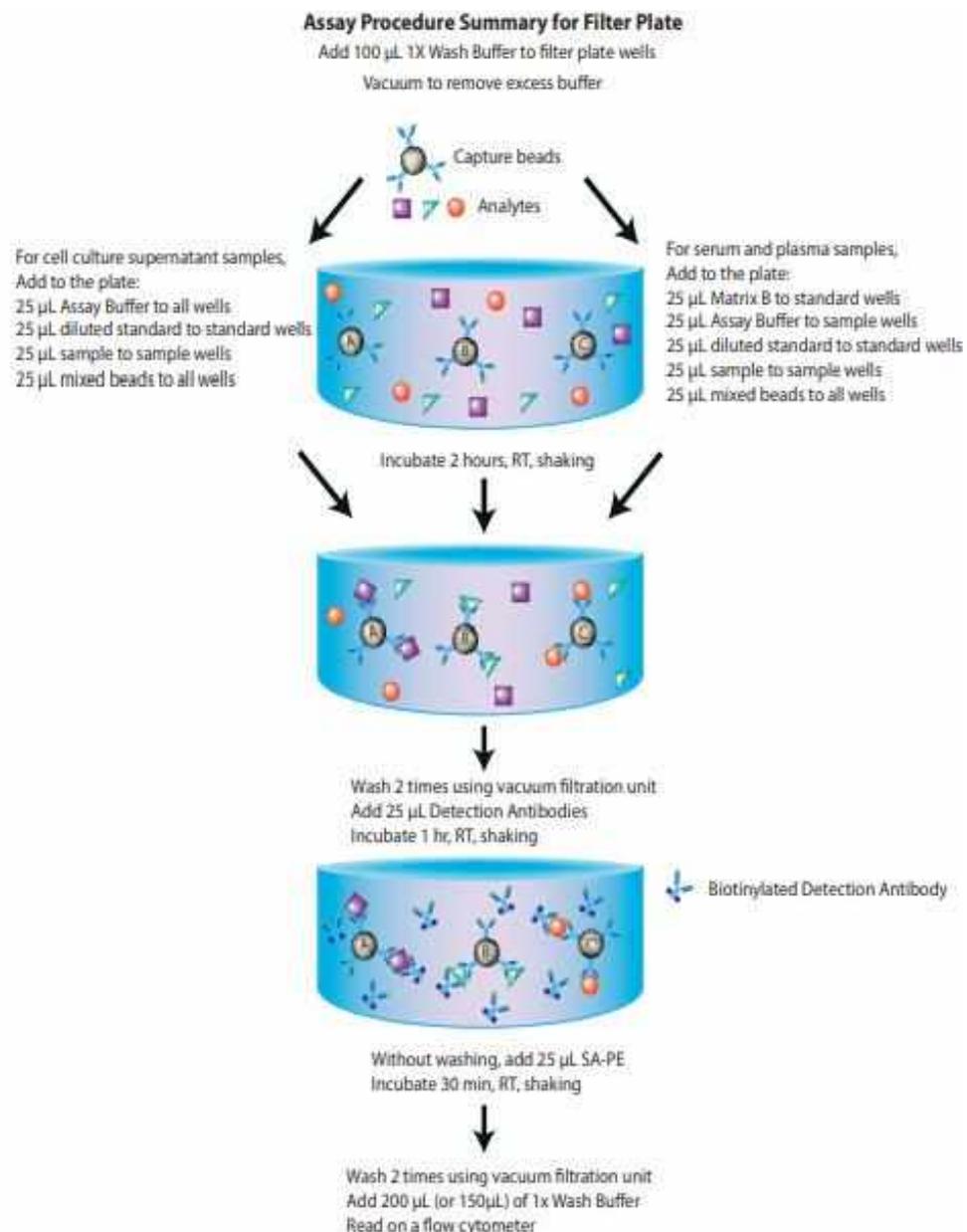


Figura 2: Resumo do Procedimento de ensaio para placa de filtro Legend Plex. Esquema do ensaio Legend Plex desenvolvido pela empresa BioLegend, San Diego, EUA. Obtida por meio do manual do Kit Human Proinflammatory Chemokine, painel nº 740003, p. 25.

3.3 Citometria de fluxo

Depois de todo o processo acima, as amostras e a curva padrão, foram passadas para tubos os quais foram encaminhados para fazer a leitura no citômetro de fluxo (Cytotflex, Beckman Coulter), com o objetivo de determinar a concentração dos analitos alvo. Uma vez que, cada um dos dois conjuntos das esferas (*beads*), está conjugado com um anticorpo específico em sua superfície, elas servem como esferas de captura. Além disso, as esferas são diferenciadas por tamanho e intensidade de fluorescência interna no citômetro de fluxo, populações analito específicas foram segregadas e o sinal fluorescente de PE pode ser quantificado pelo uso do citômetro. Com isso, distintas pelo tamanho e fluorescência interna, permite-se a detecção das quimiocinas alvo deste estudo.

3.4. Análise estatística

Por meio dos dados e gráficos obtidos utilizando a citometria de fluxo, foi feita a análise estatística de cada amostra em relação a cada quimiocina pró inflamatória pré-definidas pelo painel nº 740003 (BioLegend, San Diego, EUA). A análise estatística foi feita utilizando o software IBM SPSS Statistics 20, já as figuras foram feitas com o uso do software GraphPad Prism 8.

O primeiro passo da análise foi para descobrir se os dados obtidos seriam ou não paramétricos, em outras palavras se eles seguiam a distribuição da curva gaussiana. Sendo assim, foi feita a análise dos histogramas e do gráfico normal Q-Q Plot. Logo depois, os dados foram submetidos ao boxplot para se identificar e poder ser retirado os outliers dos dados, utilizando um $G = 3$.

Com o intuito de obter informações de caráter básico sobre as amostras, e sobre as relações das quimiocinas com as variáveis foram feitos *Heat Map*, por meio deles é possível observar e analisar os níveis das quimiocinas das variáveis, e entre os grupos das mesmas. Além

disso, com estes *Heat Map* também é possível obter a mediana dos níveis quantificados das quimiocinas alvo e compará-las entre as variáveis e os subgrupos das mesmas.

Desenvolvido todos estes testes os dados estavam prontos para serem analisados por testes de cunho não paramétrico. Com isso, o primeiro teste que foi empregado com o objetivo de obter resultados foi o teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman, ele foi executado para saber se as quimiocinas analisadas possuíam algum tipo de correlação com as variáveis utilizadas neste estudo.

Uma vez que os dados não seguem uma distribuição normal, eles são considerados não paramétricos, deste modo teve-se que ser utilizado uma correlação para dados não paramétricos. O teste de correlação de Spearman pode ser analisado do seguinte modo, o coeficiente, pode ter um valor entre +1 e -1 onde: Um valor de +1 significa uma associação de classificação positiva perfeita, já um valor de 0 significa que não há associação de classificação, um valor de -1 significa uma associação negativa perfeita entre os intervalos. Por fim, se o valor se aproxima de 0, a associação entre os dois intervalos é mais fraca.

Em seguida, foi desenvolvido os testes de Mann-Whitney para aquelas variáveis que possuíam dois subgrupos (ER, PR, HER2, estadiamento) e Kruskal-Wallis para a variável que possui mais de dois subgrupos (subtipo molecular). O intuito de ter feito estes testes era para saber se tem diferença significativa entre a dosagem de cada quimiocina dependendo do subgrupo da variável. Para este teste os resultados que ficaram abaixo de um $p = 0,05$ foram considerados significativos.

Logo, foi executado o teste do qui-quadrado de Pearson o qual foi desenvolvido com o intuito de um teste de independência, ou seja, avalia-se observações não pareadas em duas variáveis e as expressa em uma tabela de contingência. Para desenvolver este teste foi feito primeiramente uma divisão dentro de cada quimiocina em *Low* e *High*, ou seja, com o uso da mediana aqueles valores quantificados de quimiocina que estiveram acima da mediana foram

colocados no grupo de altos produtores (*High*), já aqueles valores que ficaram abaixo da mediana foram enquadrados no grupo de baixos produtores (*Low*).

Além dessa divisão, se manteve a divisão usada nos testes anteriores, sendo assim aquelas variáveis que eram divididas em dois grupos foi dividida em quatro e a variável que era dividida em quatro grupos foi para oito. E como foi dito, com o uso do teste qui-quadrado foi possível obter os valores em porcentagens de cada grupo em relação ao total e ao mesmo tempo se estas diferenças entre os grupos são significativas ou não, ou seja, se o $p < 0,05$.

Além disso, para a situação em que o teste de qui-quadrado deu um resultado significativo, as informações e valores obtidos foram submetidas em um teste de Risco Relativo, para saber em que proporção ocorre este risco entre os grupos estudados.

4. RESULTADOS

4.1 Informações gerais

Foram analisadas ao todo 60 amostras de pacientes do sexo feminino. Com um intervalo de idade entre 34 e 83 anos, com uma idade média de $56,2 \pm 11,9$ (Tabela 1). Sendo que 13,3% das pacientes são fumantes, 65% das pacientes não fumam, e 21,7% eram ex-fumantes (Tabela 2). Outro ponto analisado foi a menopausa, já que ela interfere em toda questão hormonal das mulheres e como já mencionado, algumas variáveis analisadas são ou estão diretamente relacionadas aos hormônios. Sendo assim, foi visto que 73,3% das pacientes estavam na menopausa, os outros 26,7% ainda não chegaram nesta fase (Tabela 2).

Outra característica analisada foi o índice de massa corporal (IMC). Pois pacientes com câncer geralmente possui variações neste índice quando comparados a maioria da população saudável. Valores obtidos foram entre 15 e 263, com um valor médio de $31,7 \pm 33,3$. (Tabela 1)

Tabela 1: Informações Gerais (Idade e IMC).

| Informações Gerais | N | Mínimo | Máximo | Média | Desvio Padrão |
|--------------------|----|--------|--------|-------|---------------|
| Idade | 60 | 34 | 83 | 56,20 | 11,912 |
| IMC | 52 | 15 | 263 | 31,07 | 33,298 |

Tabela 2: Informações Gerais (Sexo, Hábito de Fumar e Menopausa).

| Informações Gerais | | N | Porcentagem |
|--------------------|-------------|----|-------------|
| Sexo | Feminino | 60 | 100% |
| | Masculino | 0 | 0% |
| Hábito de fumar | Sim | 8 | 13,3% |
| | Não | 39 | 65,0% |
| | Ex-fumante | 13 | 21,7% |
| Menopausa | Tiveram | 44 | 73,3% |
| | Não tiveram | 16 | 26,7% |

4.2 Informações descritivas (Mann-Whitney e Kruskal Wallis)

Para se ter as informações descritivas das variáveis que foram utilizadas neste estudo, foi feita a média dos níveis de quimiocina de cada grupo, e uma comparação estatística entre os postos dos valores de cada grupo, para isso foi utilizado o teste Mann-Whitney para comparar os dois subgrupos de uma variável, e o Kruskal Wallis na comparação entre mais de dois subgrupos.

A primeira variável analisada foi o receptor de estrógeno (Tabela 3) demonstrando que não existe diferença significativa entre as quimiocinas estudadas comparadas entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 3: Resultado descritivo das quimiocinas para receptor de estrógeno.

| Receptor de Estrógeno | N | Mediana | | Mann-Whitney | p |
|-----------------------|----|-------------|---------|--------------|-------|
| | | Estatística | Range | | |
| CCL2 ER+ | 43 | 208,51 | 272,90 | 219,000 | 0,066 |
| CCL2 ER- | 15 | 239,23 | 83,3 | | |
| CCL11 ER+ | 42 | 183,54 | 243,01 | 208,000 | 0,104 |
| CCL11 ER- | 14 | 212,00 | 169,84 | | |
| CXCL8 ER+ | 36 | 329,25 | 2237,21 | 242,000 | 0,829 |
| CXCL8 ER- | 14 | 247,73 | 836,63 | | |
| CXCL10 ER+ | 25 | 61,06 | 14,58 | 73,000 | 0,257 |
| CXCL10 ER- | 8 | 65,68 | 7,70 | | |
| CXCL11 ER+ | 36 | 99,61 | 634,62 | 144,000 | 0,175 |
| CXCL11 ER- | 11 | 285,60 | 287,39 | | |

A próxima variável utilizada foi o receptor de progesterona, o qual é subdividido nos grupos de pacientes com receptor de progesterona positivo e pacientes com receptor de progesterona negativo. Dentre o grupo das cinco quimiocinas duas possuem diferença significativa de produção entre os subgrupos do receptor de progesterona, ou seja, quando comparado os níveis de produção destas duas quimiocinas entre aqueles que são positivo e negativo possuem uma produção significativamente distinta ($p < 0,05$). As duas quimiocinas que possuem esta diferença de produção são CCL11 ($p = 0,017$) e CXCL11 ($p = 0,029$). (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado descritivo das quimiocina para receptor de progesterona.

| Receptor de Progesterona | N | Mediana | | Mann-Whitney | p |
|--------------------------|----|-------------|---------|--------------|-------|
| | | Estatística | Range | | |
| CCL2 PR+ | 37 | 210,75 | 246,00 | 298,000 | 0,143 |
| CCL2 PR- | 21 | 227,30 | 182,04 | | |
| CCL11 PR+ | 36 | 165,80 | 243,01 | 221,000 | 0,017 |
| CCL11 PR- | 20 | 212,00 | 169,84 | | |
| CXCL8 PR+ | 29 | 289,45 | 1162,90 | 263,000 | 0,415 |
| CXCL8 PR- | 21 | 329,01 | 2206,96 | | |
| CXCL10 PR+ | 21 | 60,51 | 14,59 | 104,000 | 0,410 |
| CXCL10 PR- | 12 | 60,13 | 8,27 | | |
| CXCL11 PR+ | 29 | 87,98 | 631,31 | 161,000 | 0,029 |
| CXCL11 PR- | 18 | 289,36 | 597,68 | | |

As outras variáveis que foram submetidas a este teste foram a proteína HER2 e o estadiamento. Para analisar a proteína HER2, as pacientes foram subdivididas em grupo HER2+ e grupo HER2-. Já o estadiamento também pode ser categorizado em dois grupos, inicial e avançado. Todavia, essas análises não demonstraram resultados estatisticamente significantes. A Tabela 5 contém os dados do teste para a proteína HER2 e a Tabela 6 os resultados do teste para o estadiamento.

Tabela 5: Resultado descritivo das quimiocina para proteína HER2.

| Proteína HER2 | N | Média | | Mann-Whitney | p |
|------------------|----|-------------|---------|--------------|-------|
| | | Estatística | Range | | |
| CCL2 HER2+ | 7 | 274,44 | 155,141 | 120,000 | 0,163 |
| CCL2 HER2- | 51 | 208,51 | 272,895 | | |
| CCL11 HER2+ | 7 | 307,09 | 180,38 | 110,000 | 0,128 |
| CCL11 HER2- | 49 | 185,86 | 243,01 | | |
| CXCL8 HER2+ | 7 | 566,25 | 179,73 | 127,000 | 0,511 |
| CXCL8 HER2- | 43 | 289,45 | 2237,21 | | |
| CXCL10 HER2+ | 3 | 61,06 | 7,38 | 41,000 | 0,802 |
| CXCL10 HER2- | 30 | 62,03 | 14,59 | | |
| CXCL11 HER2+ | 7 | 255,74 | 145,44 | 116,000 | 0,473 |
| CXCL11 HER2- | 40 | 124,19 | 634,63 | | |

Tabela 6: Resultado descritivo das quimiocina para estadiamento.

| Estadiamento | N | Mediana | | Mann-Whitney | p |
|-----------------|----|-------------|---------|--------------|-------|
| | | Estatística | Range | | |
| CCL2 INICIAL | 36 | 219,75 | 261,55 | 336,000 | 0,915 |
| CCL2 AVANÇADO | 19 | 227,30 | 246,00 | | |
| CCL11 INICIAL | 33 | 198,95 | 243,01 | 302,000 | 0,827 |
| CCL11 AVANÇADO | 19 | 181,22 | 161,99 | | |
| CXCL8 INICIAL | 30 | 396,17 | 2237,21 | 175,000 | 0,134 |
| CXCL8 AVANÇADO | 16 | 156,06 | 887,45 | | |
| CXCL10 INICIAL | 21 | 62,75 | 11,48 | 103,000 | 0,933 |
| CXCL10 AVANÇADO | 10 | 81,41 | 13,73 | | |
| CXCL11 INICIAL | 30 | 155,62 | 634,63 | 166,000 | 0,443 |
| CXCL11 AVANÇADO | 13 | 81,41 | 175,09 | | |

Em relação ao subtipo molecular, os pacientes foram divididos em luminal A, luminal B, triplo negativo e HER2. Os grupos foram comparados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e os resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultado descritivo das quimiocina para subtipo molecular.

| Quimiocinas | Subtipo Molecular | Mediana | | Kruskal-Wallis | Sig. |
|-------------|-------------------|-------------|---------|----------------|-------|
| | | Estatística | Range | | |
| CCL2 | Luminal A | 167,29 | 155,33 | 1,755 | 0,625 |
| | Luminal B | 229,79 | 272,90 | | |
| | Triplo-Negativo | 215,59 | 73,69 | | |
| | HER2 | 204,65 | 155,14 | | |
| CCL11 | Luminal A | 165,80 | 141,45 | 4,122 | 0,249 |
| | Luminal B | 212,64 | 200,62 | | |
| | Triplo-Negativo | 209,38 | 128,82 | | |
| | HER2 | 255,30 | 223,68 | | |
| CXCL8 | Luminal A | 368,47 | 1122,24 | 0,223 | 0,974 |
| | Luminal B | 300,29 | 2231,57 | | |
| | Triplo-Negativo | 264,20 | 836,63 | | |
| | HER2 | 228,79 | 190,49 | | |
| CXCL10 | Luminal A | 60,95 | 8,33 | 0,876 | 0,831 |
| | Luminal B | 61,88 | 13,73 | | |
| | Triplo-Negativo | 62,75 | 8,27 | | |
| | HER2 | 61,06 | 8,64 | | |
| CXCL11 | Luminal A | 5746 | 595,94 | 4,380 | 0,223 |
| | Luminal B | 141,16 | 633,56 | | |
| | Triplo-Negativo | 292,70 | 287,39 | | |
| | HER2 | 108,77 | 145,80 | | |

Além destes dados descritivos apresentados também foi analisado as medianas juntamente com os *Heat Map* das variáveis e de seus subgrupos. Estas medianas e os *Heat Map* estão descritos na seção seguinte.

4.3 Resultados dos *Heat Map* e das medianas

Os primeiros *Heat Map* obtidos foram dos receptores de estrógeno (Figura 3) e progesterona (Figura 4), cujos resultados foram similares. Uma destas semelhanças são as escalas as quais ficaram idênticas quando considerado o intervalo quantificado. Além disso, as quimiocinas CCL2, CCL11, CXCL10 e CXCL11 foram semelhantes nos dois *Heat Map*, já a quimiocina CXCL8 teve um comportamento inverso aos demais. Além disso, em ambos os cenários se observam quando comparadas as medianas uma produção maior da quimiocina CXCL8 e uma produção menor da CXCL10.

Por meio da criação de ambos *Heat Map* foi possível obter os valores das medianas, e com isso construir as tabelas que se encontram ao lado direito da Figura 3 e da Figura 4.

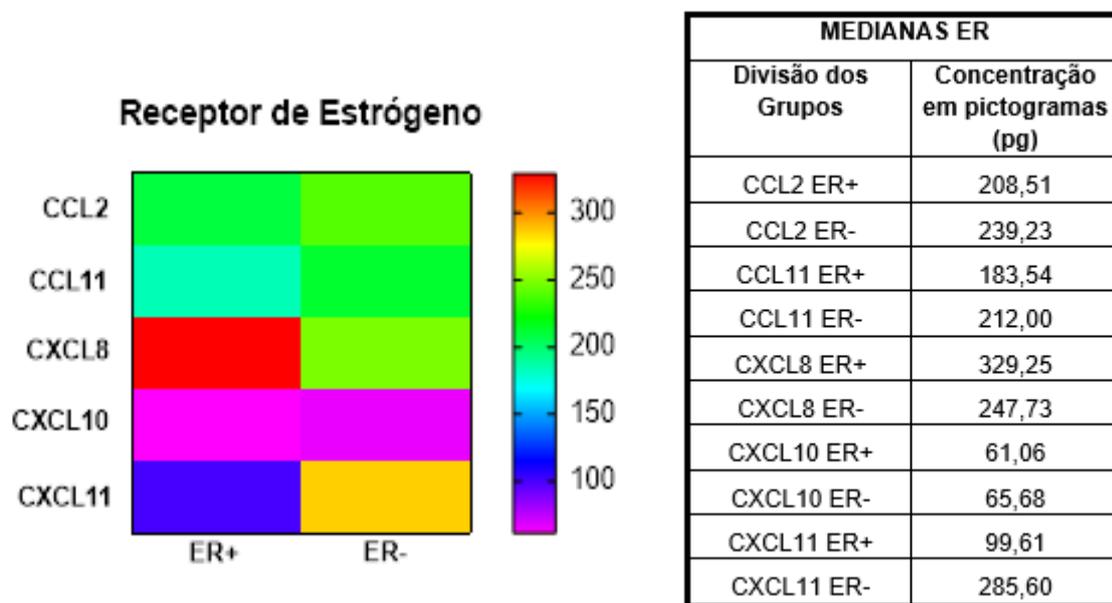


Figura 3: Heat Map do receptor de estrógeno. A escala apresentada ao lado do mapa de calor está na unidade de medida de picogramas (pg). Nos eixos X é a classificação do receptor de estrógeno. Já no eixo Y se encontram as quimiocinas.

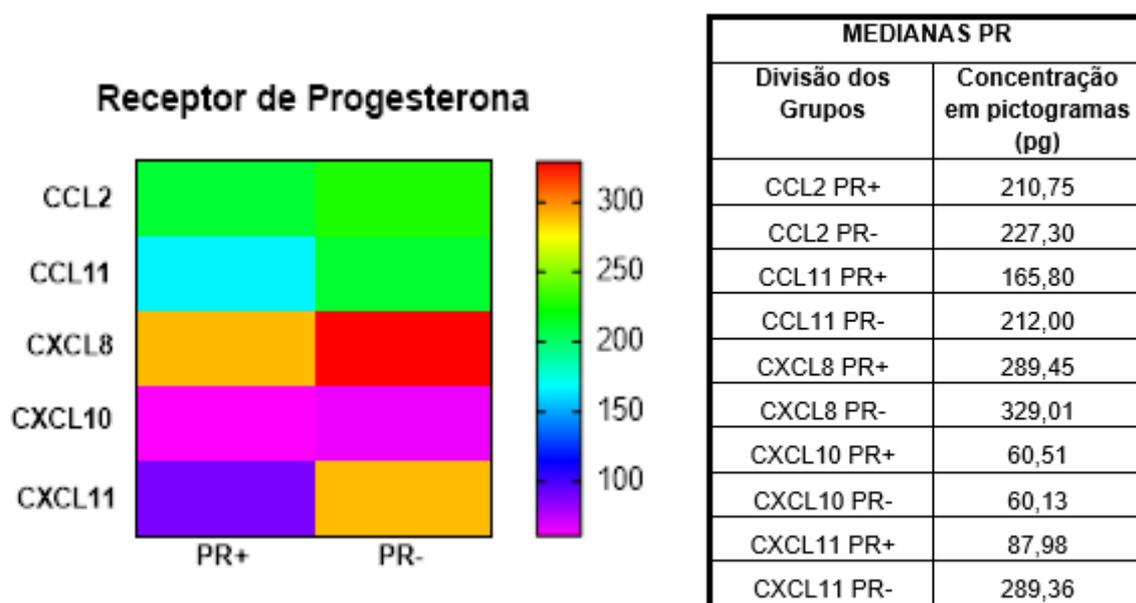


Figura 4: Heat Map do receptor progesterona. A escala apresentada ao lado do mapa de calor está na unidade de medida de picogramas (pg). Nos eixos X é a classificação do receptor de progesterona. Já no eixo Y se encontram as quimiocinas.

Quando se trata do *Heat Map* da proteína HER2 (Figura 5) todo o cenário que vimos até agora se inverte, pois, a maioria das quimiocinas agora são mais produzidas nos pacientes HER2+. Porém, algo que foi observado nas Figura 3 e Figura 4 e que se manteve constante na Figura 5 é que a quimiocina com maior mediana foi a CXCL8 e a de menor produção foi a CXCL10.

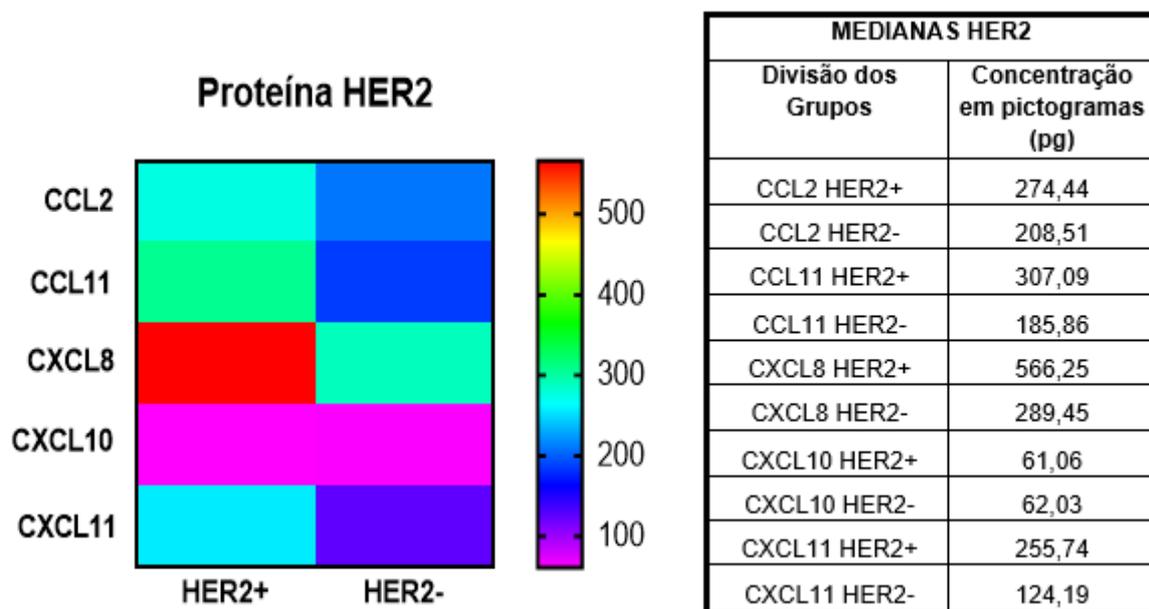


Figura 5: Heat Map da proteína HER2. A escala apresentada ao lado do mapa de calor está na unidade de medida de picogramas (pg). No eixo X são a classificação da proteína HER2. Já no eixo Y se encontram as quimiocinas. Do lado direito do Heat Map se encontra a tabela com os resultados das medianas obtidas.

O próximo Heat Map desenvolvido foi o do estadiamento (Figura 6), o qual, ao contrário das demais variáveis analisadas até agora não é tão majoritariamente observado uma maior produção de quimiocinas em um grupamento específico. Uma vez que, dentre as cinco quimiocinas estudadas três (CCL11, CXCL8 e CXCL11) se encontram mais produzidas em estágio inicial e as outras duas (CCL2 e CXCL10) se encontram mais produzidas no estágio avançado do câncer. Isso pode ser evidenciado tanto no valor de sua mediana quanto nas cores do Heat Map.

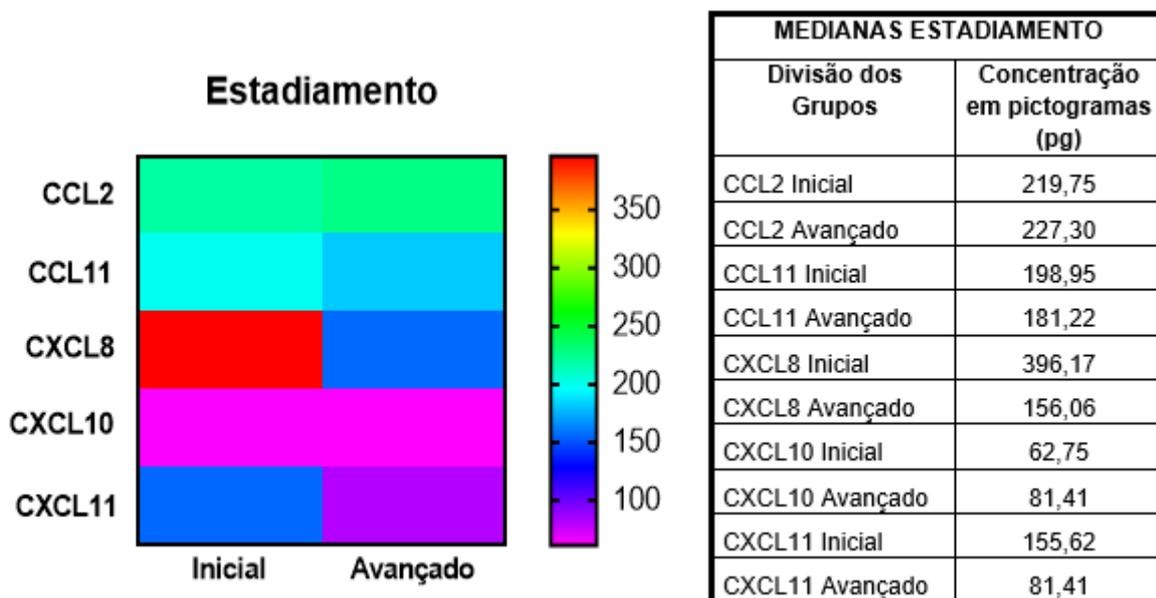


Figura 6: Heat Map do estadiamento. A escala apresentada ao lado do mapa de calor está na unidade de medida de picogramas (pg). No eixo X são a classificação do estadiamento. Já no eixo Y se encontram as quimiocinas. Do lado direito do *Heat Map* se encontra a tabela com os resultados das medianas obtidas.

O último *Heat Map* feito foi o do subtipo molecular (Figura 7). Como dito nas seções anteriores o subtipo molecular possui 4 classificações, sendo elas: luminal A (LA), luminal B (LB), triplo-negativo (TN) e HER2 (H). A partir disso, é possível fazer a comparação entre os 4 grupos e entre as quimiocinas.

A CCL2 foi menos produzida em pacientes luminais A, uma vez que, a sua mediana foi de 167,29 pg, já o luminal B foi o que mais produziu CCL2 possuindo uma mediana de 229,79 pg. Quando se analisa a quimiocina CCL11, também se observa que os pacientes luminais A produziram menos do que os demais, isso pode ser visto pelo valor da mediana ser 165,80 pg. Já o grupo que mais produziu a quimiocina CCL11 é o HER2, com uma mediana de 255,30 pg.

Para a quimiocina CXCL8 o grupo de menor produção foi o HER2 com uma diferença bem pouca do triplo-negativo, pois o nível do HER2 foi de 228,79 pg e o do triplo negativo foi 264,20 pg. Já o que mais produz foi o grupo luminal A, que possui um nível de produção de 368,47 pg. A quimiocina CXCL10 não apresentou diferença significativa entre os grupos. A última quimiocina a ser analisada é a CXCL11 onde o grupo que menos a produz foi o luminal A com um nível de 57,46 pg, e o grupo que mais produz CXCL11 foi o triplo-negativo com um nível de 292,70 pg.

Além disso, foi possível saber para qual grupo a quimiocina foi mais e menos produzida. No grupo luminal A as quimiocinas CXCL10 e CXCL11 foram as menos produzidas, já a mais produzida é o CXCL8. Para o grupo luminal B a quimiocina menos produzida é a CXCL10 e a mais produzida foi a CXCL8. Quando se analisa o grupo triplo-negativo a quimiocina menos produzida foi a CXCL10 e a mais produzida foi a CXCL11. Por fim, no grupo HER2 a quimiocina menos produzida foi a CXCL10 assim como nos demais grupos, e a mais produzida foi a CCL11. Tudo o que foi dito nos parágrafos anteriores está na Figura 6 e Tabela 8.

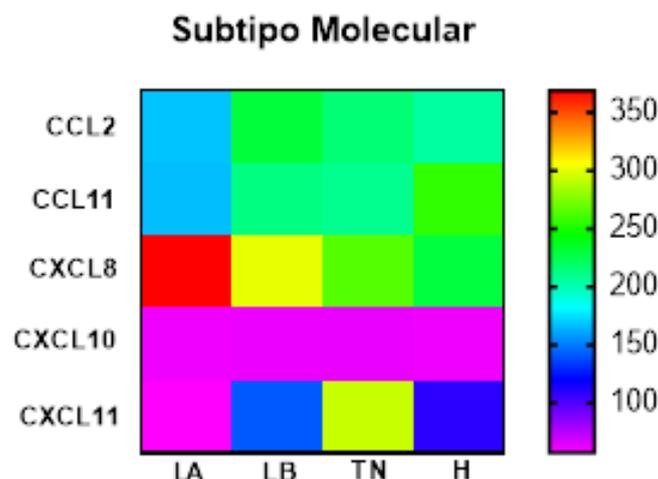


Figura 7: Heat Map do subtipo molecular. A escala apresentada ao lado do mapa de calor está na unidade de medida de picogramas (pg). As abreviações no eixo X são: Luminal A (LA), Luminal B (LB), Triplo-Negativo (TN) e HER2 (H). Já no eixo Y se encontram as quimiocinas.

Tabela 8: Resultado das medianas para subtipo molecular.

| VALOR DAS MEDIANAS SUBTIPO MOLECULAR | | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| QUIMIOCINAS | LA Concentração em (pg) | LB Concentração em (pg) | TN Concentração em (pg) | HER2 Concentração em (pg) |
| CCL2 | 167,29 | 229,79 | 215,59 | 204,65 |
| CCL11 | 165,80 | 212,64 | 209,38 | 255,30 |
| CXCL8 | 368,47 | 300,29 | 264,20 | 228,79 |
| CXCL10 | 60,95 | 61,88 | 62,75 | 61,06 |
| CXCL11 | 57,46 | 141,16 | 292,70 | 108,77 |

4.4 Resultados do teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman

Este teste foi desenvolvido para observar a possível existência de uma correlação entre as cinco quimiocinas alvo com as seis variáveis escolhidas como panorama do caso clínico dos pacientes com câncer de mama. A primeira variável utilizada na correlação com as quimiocinas foi o receptor de estrógeno. Todas as correlações foram do tipo fraca, porém a correlação entre a quimiocina CCL2 e o receptor de estrógeno, representado pelo gráfico (Figura 8) foi a que possuiu a melhor correlação e mostrou uma tendência a ser significativa ($p = 0,066$). (Tabela 9)

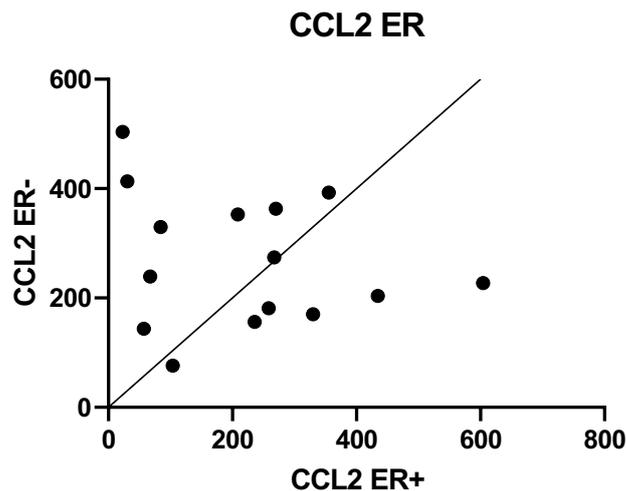


Figura 8: Gráfico da correlação entre CCL2 com o receptor de estrógeno. Gráfico que mostra a correlação entre a produção da quimiocina CCL2 pelos pacientes receptores de estrógeno positivo e pacientes receptores de estrógeno negativo.

A segunda variável analisada foi o receptor de progesterona, e como resultado obteve-se que duas dentre as cinco quimiocinas tiveram resultados significativos ($p < 0,05$). As quimiocinas que possuem uma correlação significativa com o receptor de progesterona foram as quimiocinas CCL11 e CXCL11 com um ($p=0,016$) e ($p=0,027$) respectivamente, o gráfico que mostra a correlação é representado pela Figura 9. Já as três quimiocinas restantes apresentaram uma correlação fraca com esta variável. (Tabela 9)

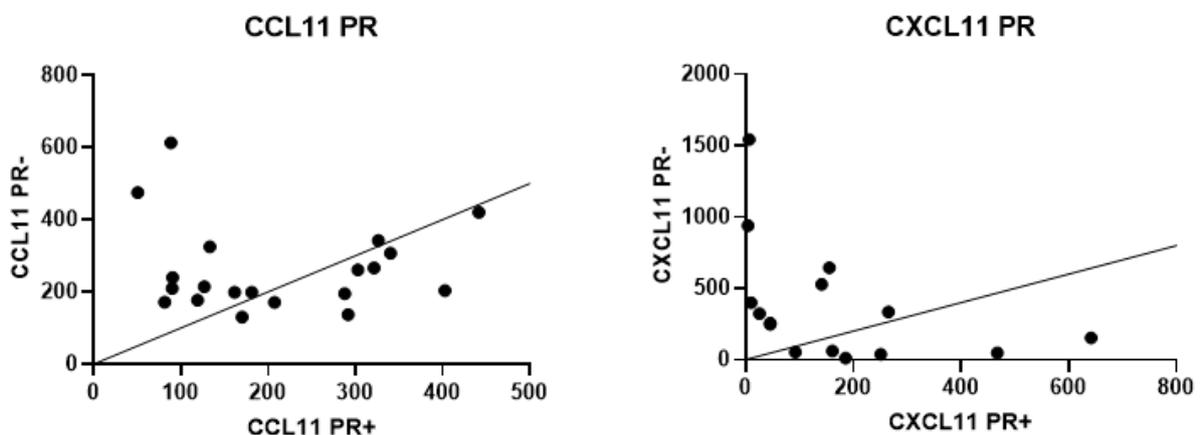


Figura 9: Gráficos das correlações entre CCL11 e CXCL11 com o receptor de progesterona. Gráfico da esquerda mostra a correlação entre a produção da quimiocina CCL11 entre pacientes PR+ e PR-. Gráfico da direita mostra a correlação entre a produção da quimiocina CXCL11 entre pacientes PR+ e PR-.

Outra variável observada foi a de subtipo molecular, esta por sua vez, teve um resultado similar ao que aconteceu com a correlação do receptor de estrógeno, ou seja, nenhuma das quimiocinas apresentaram uma correlação significante. Contudo, a quimiocina CCL11 se aproxima de um resultado significativo, uma vez que, seu valor foi de 0,053. (Tabela 9)

A quarta variável analisada foi a proteína Ki-67, na correlação com as quimiocinas foi a variável que demonstrou a maior quantidade de resultados significativos ou que tenderam a ser significativos. Já que duas dentre as cinco quimiocinas apresentaram uma correlação significativa, tendo um $p=0,049$ para a CCL11, e $p=0,020$ para a CXCL11. Além disso a CCL2 quase chegou a dar um resultado significativo tendo um $p=0,052$. (Tabela 9). Os gráficos que representam as correlações entre as quimiocinas CCL2, CCL11 e CXCL11 com a proteína Ki-67, estão na Figura 10.

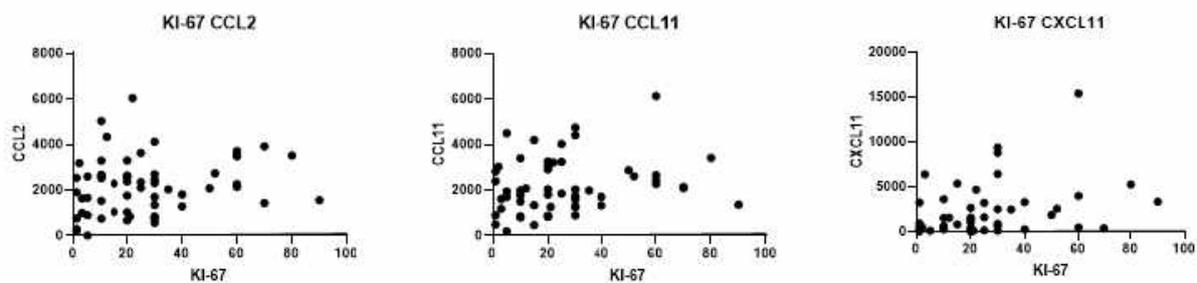


Figura 10: Gráficos das correlações entre CCL2, CCL11 e CXCL11 com a proteína Ki-67. Gráfico da esquerda mostra a correlação entre a quimiocina CCL2 com a proteína Ki-67, o gráfico do meio mostra a correlação entre a quimiocina CCL11 com a proteína Ki-67, e o gráfico da direita mostra a correlação entre a quimiocina CXCL11 com a proteína Ki-67.

Para as variáveis proteína HER2 e estadiamento não teve casos de correlações significativas e/ou que chegaram próximas a isso, porém, todas as quimiocinas apresentaram um quadro de correlação do tipo fraca. (Tabela 9)

Sendo assim, a Tabela 9 possui a seguinte estrutura, nas colunas se tem as quimiocinas, nas linhas se tem, as variáveis clínicas e essas, por sua vez, possuem a seguinte divisão: o coeficiente de correlação, o qual mostra o valor utilizado para saber se a associação é positiva, negativa, fraca ou não existe. O Sig. que é o nível de significância, ele mostra o valor de “p”, e

para ser considerado estatisticamente significativo o valor de p deve ser inferior a 0,05. Por fim o N que é o número de pacientes utilizados para fazer a correlação.

Tabela 9: Resultado do teste de correlação de Spearman.

| QUIMIOCINAS | | CCL2 | CCL11 | CXCL8 | CXCL10 | CXCL11 |
|--------------------------|----------------------------|--------------|--------------|--------|--------|--------------|
| Receptor de Estrógeno | Coefficiente de Correlação | 0,243 | 0,219 | -0,031 | 0,201 | 0,200 |
| | Sig. | 0,066 | 0,104 | 0,831 | 0,263 | 0,178 |
| | N | 58 | 56 | 50 | 33 | 47 |
| Receptor de Progesterona | Coefficiente de Correlação | 0,194 | 0,320 | 0,117 | 0,146 | 0,323 |
| | Sig. | 0,145 | 0,016 | 0,420 | 0,419 | 0,027 |
| | N | 58 | 56 | 50 | 33 | 47 |
| Proteína HER2 | Coefficiente de Correlação | -0,185 | -0,205 | -0,094 | 0,044 | -0,106 |
| | Sig. | 0,165 | 0,129 | 0,517 | 0,807 | 0,479 |
| | N | 58 | 56 | 50 | 33 | 47 |
| Subtipo Molecular | Coefficiente de Correlação | 0,166 | 0,260 | -0,067 | 0,027 | 0,192 |
| | Sig. | 0,213 | 0,053 | 0,644 | 0,881 | 0,195 |
| | N | 58 | 56 | 50 | 33 | 47 |
| Estadiamento | Coefficiente de Correlação | 0,014 | 0,031 | -0,223 | 0,015 | -0,118 |
| | Sig. | 0,917 | 0,829 | 0,135 | 0,934 | 0,450 |
| | N | 55 | 52 | 46 | 31 | 43 |
| Proteína Ki67 | Coefficiente de Correlação | 0,257 | 0,264 | -0,028 | 0,126 | 0,338 |
| | Sig. | 0,052 | 0,049 | 0,845 | 0,484 | 0,020 |
| | N | 58 | 56 | 50 | 33 | 47 |

4.5 Resultado do teste qui-quadrado de Pearson

Ao se aplicar o teste do qui-quadrado na variável receptor de estrógeno depois de subdividi-lo em quatro grupos se teve a Tabela 10. Com relação a todas quimiocinas tanto no grupo *Low* quanto no grupo *High* a maior porcentagem de pacientes se encontra no grupo de receptores de estrógeno positivo. Em muitos dos casos esta diferença de porcentagem chega a ser até três vezes a maior. Porém em nenhum dos casos se tem uma diferença significativa, o resultado que mais se aproxima a ser significativo é o da quimiocina CCL11 ($p=0,053$).

Tabela 10: Resultado do teste de qui-quadrado para o receptor de estrógeno.

| QUIMIOCINAS | | RECEPTOR DE ESTRÓGENO | | | | Qui-Quadrado | Sig. |
|-------------|------|-----------------------|-------|----------|-------|--------------|-------|
| | | Positivo | | Negativo | | | |
| | | N | N % | N | N % | | |
| CXCL8 | Low | 18 | 69,2% | 8 | 30,8% | 0,814 | 0,367 |
| | High | 27 | 79,4% | 7 | 20,6% | | |
| CXCL10 | Low | 15 | 88,2% | 2 | 11,8% | 2,216 | 0,137 |
| | High | 30 | 69,8% | 13 | 30,2% | | |
| CCL11 | Low | 25 | 86,2% | 4 | 13,8% | 3,760 | 0,053 |
| | High | 20 | 64,5% | 11 | 35,5% | | |
| CXCL11 | Low | 22 | 84,6% | 4 | 15,4% | 2,262 | 0,133 |
| | High | 23 | 67,6% | 11 | 32,4% | | |
| CCL2 | Low | 24 | 80,0% | 6 | 20,0% | 0,800 | 0,371 |
| | High | 21 | 70,0% | 9 | 30,0% | | |

Já ao se aplicar o teste para o receptor de progesterona observou-se resultados semelhantes ao receptor de estrógeno (Tabela 10). Para todas as quimiocinas não importando se o grupo é *Low* ou *High*, as amostras de receptores de progesterona positivo possuíram maior porcentagem do que o grupo de pacientes receptores de progesterona negativo. Porém, desta vez não foi apenas uma quimiocina que teve seu resultado próximo ao significativo e sim duas, sendo elas: CXCL10 com $p = 0,055$ e CCL11 com $p = 0,051$ (Tabela 11).

Tabela 11: Resultado do teste de qui-quadrado para o receptor de progesterona.

| QUIMIOCINAS | | RECEPTOR DE PROGESTERONA | | | | Qui-Quadrado | Sig. |
|-------------|------|--------------------------|-------|----------|-------|--------------|-------|
| | | Positivo | | Negativo | | | |
| | | N | N % | N | N % | | |
| CXCL8 | Low | 16 | 61,5% | 10 | 38,5% | 0,064 | 0,801 |
| | High | 22 | 64,7% | 12 | 35,3% | | |
| CXCL10 | Low | 14 | 82,4% | 3 | 17,6% | 3,695 | 0,055 |
| | High | 24 | 55,8% | 19 | 44,2% | | |
| CCL11 | Low | 22 | 75,9% | 7 | 24,1% | 3,794 | 0,051 |
| | High | 16 | 51,6% | 15 | 48,4% | | |
| CXCL11 | Low | 19 | 73,1% | 7 | 26,9% | 1,876 | 0,171 |
| | High | 19 | 55,9% | 15 | 44,1% | | |
| CCL2 | Low | 20 | 66,7% | 10 | 33,3% | 0,287 | 0,592 |
| | High | 18 | 60,0% | 12 | 40,0% | | |

A próxima variável foi o estadiamento, e independente do grupo *Low* ou *High* para a maioria das Quimiocinas, o estágio inicial apresenta maiores porcentagens do que o estágio avançado, a única exceção foi na quimiocina CXCL8 no grupo *Low* onde a porcentagem entre os grupos inicial e avançado foram iguais, ou seja, 50% cada. Diferente dos resultados obtidos,

a CXCL8 apresentou um resultado significativo ($p=0,028$) quando se comparado os grupos *Low* e *High* nas condições dos dois grupos do estadiamento (Tabela 12).

Tabela 12: Resultado do teste de qui-quadrado para estadiamento.

| QUIMIOCINAS | | ESTADIAMENTO | | | | | |
|-------------|------|--------------|-------|----------|-------|--------------|-------|
| | | Inicial | | Avançado | | Qui-Quadrado | Sig. |
| | | N | N % | N | N % | | |
| CXCL8 | Low | 12 | 50,0% | 12 | 50,0% | 4,839 | 0,028 |
| | High | 25 | 78,1% | 7 | 21,9% | | |
| CXCL10 | Low | 9 | 64,3% | 5 | 35,7% | 0,027 | 0,871 |
| | High | 28 | 66,7% | 14 | 33,3% | | |
| CCL11 | Low | 17 | 63,0% | 10 | 37,0% | 0,225 | 0,635 |
| | High | 20 | 69,0% | 9 | 31,0% | | |
| CXCL11 | Low | 21 | 66,7% | 8 | 33,3% | 0,007 | 0,935 |
| | High | 17 | 65,6% | 11 | 34,4% | | |
| CCL2 | Low | 18 | 66,7% | 9 | 33,3% | 0,008 | 0,928 |
| | High | 19 | 65,5% | 10 | 34,5% | | |

Sendo que o teste de qui-quadrado para a CXCL8 mostrou que a variável estadiamento está associada com a concentração da quimocina, foi avaliado o risco relativo, sendo que pacientes que se encontram dentro do grupamento *Low* para CXCL8 possuem 2,28 vezes o risco de estar no grupo de pacientes com estágio avançado do câncer de mama, comparado com os pacientes que estão no grupo *High*.

A última tabela obtida utilizando o teste do qui-quadrado foi a Tabela 13, a qual contém os resultados do subtipo molecular. Nesta tabela não se tem um padrão de qual grupo possui maior porcentagem do que outro, contudo, o grupo que se tem menor porcentagem é possível se observar, tal grupo independente de ser *Low* ou *High* e para todas as quimiocinas é o subtipo molecular HER2. Porém, no geral não se teve um resultado significativo ou que tenha ficado próximo a isso.

Tabela 13: Resultado do teste de qui-quadrado para o subtipo molecular.

| QUIMIOTERAPIAS | | Subtipo Molecular | | | | | | | | Qui-Quadrado | Sig. |
|----------------|------|-------------------|-------|-----------|-------|-----------------|-------|------|-------|--------------|-------|
| | | Luminal A | | Luminal B | | Triplo-negativo | | HER2 | | | |
| | | N | N % | N | N % | N | N % | N | N % | | |
| CXCL8 | Low | 5 | 19,2% | 10 | 38,5% | 6 | 23,1% | 5 | 19,2% | 3,842 | 0,279 |
| | High | 14 | 41,2% | 10 | 29,4% | 7 | 20,6% | 3 | 8,8% | | |
| CXCL10 | Low | 7 | 41,2% | 5 | 29,4% | 2 | 11,8% | 3 | 17,6% | 2,191 | 0,534 |
| | High | 12 | 27,9% | 15 | 34,9% | 11 | 25,6% | 5 | 11,6% | | |
| CCL11 | Low | 11 | 37,9% | 10 | 34,5% | 5 | 17,2% | 3 | 10,3% | 1,601 | 0,659 |
| | High | 8 | 25,8% | 10 | 32,3% | 8 | 25,8% | 5 | 16,1% | | |
| CCL2 | Low | 11 | 36,7% | 9 | 30,0% | 6 | 20,0% | 4 | 13,3% | 0,751 | 0,860 |
| | High | 8 | 26,7% | 11 | 36,7% | 7 | 23,3% | 4 | 13,3% | | |
| CXCL11 | Low | 9 | 34,6% | 9 | 34,6% | 3 | 11,5% | 5 | 19,2% | 3,518 | 0,318 |
| | High | 10 | 29,4% | 11 | 32,4% | 10 | 29,4% | 3 | 8,8% | | |

A variável proteína HER2 não foi submetida ao teste de qui-quadrado pois o N dos grupos foi inferior a 5 pacientes.

5. DISCUSSÃO

5.1 Discussão das informações gerais

As informações gerais obtidas foram para caracterizar o grupo de pacientes utilizados no desenvolvimento da pesquisa. Com isso, soube-se que nosso estudo é composto unicamente por pacientes do sexo feminino, o que é muito compreensivo em estudos como este, pois sabe-se que o câncer de mama nos homens representa apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2020). E segundo a American Cancer Society (2020), “O câncer de mama é cerca de 100 vezes menos comum entre homens brancos do que entre mulheres brancas. Cerca de 70 vezes menos comum entre homens negros do que entre mulheres negras. ”.

Segundo Andrade W.P. em 2016, por volta de 80% dos casos de câncer de mama são diagnosticados quando a mulher está na faixa de 50 anos. O que explica a média de idade da população do presente estudo. Uma vez que, mesmo tendo um intervalo grande entre a menor com a maior idade, vimos que a média do grupo de pacientes está por volta de 56 anos.

De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention, o tabagismo é um fator predisponente para câncer, alguns tipos são: o câncer de pulmão, de esôfago, pâncreas, fígado,

orofaringe, dentre outros (CDC, 2020). Além disso, no caso do câncer de mama segundo a Breastcancer.org em 2020, “Fumar causa uma série de doenças e está associado a um risco maior de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa”. Por isso, foi visto a porcentagem de pacientes fumantes, não fumantes e ex-fumantes, obtendo como resultado 13,3% das pacientes são fumantes, 65% das pacientes não fumam, e 21,7% eram ex-fumantes

A fundação Susan G. Komen For the Cure, por meio da série de publicações Facts for Life (2009/2010), afirma que “a exposição a hormônios, especificamente o estrogênio, aumenta o risco de uma mulher desenvolver câncer de mama”. As mulheres durante a sua vida são expostas aos hormônios, desde a primeira menstruação até o início da menopausa. Além disso, de acordo com fundação Susan G. Komen For the Cure (2009/2010), “Estudos recentes mostraram que os hormônios pós menopausa, especialmente estrogênio e progesterona combinados, pode aumentar o risco para câncer de mama”. Com isso, a fase da menopausa foi um outro fator observado no grupo de pacientes, observando que 73,3% das pacientes já tinham chegado na menopausa, os outros 26,7% ainda não chegaram nesta fase.

O último fator observado sobre as características gerais da população de estudo foi o índice de massa corporal (IMC), uma vez que, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer, sobrepeso, obesidade e o ganho de peso na fase adulta estão associados a cânceres no esôfago, estômago, pâncreas, vesícula biliar, fígado, intestino, rins, mama (mulheres na pós-menopausa), ovário, endométrio, mama (homens) e linfoma difuso de grandes células B. (INCA, 2019).

Porém, uma pesquisa feita em 2018, pelo The Premenopausal Breast Cancer Collaborative Group, utilizando voluntárias entre 18 e 24 anos com maior valor de IMC tiveram 4,2 vezes menos risco de desenvolver câncer de mama prematuramente do que mulheres do mesmo grupo que estavam abaixo do peso ideal, de acordo com a classificação oficial ($IMC \geq 35,0$ vs $< 17,0$), o que mostra uma certa disparidade com os resultados de IMC obtidos neste

estudo, pois todas as pacientes do nosso estudo possuíam IMC entre 15 e 263, com um valor médio de $31,7 \pm 33,3$.

5.2 Discussão das informações descritivas (Mann-Whitney e Kruskal Wallis)

O estrógeno já possui uma relação definida com a quimiocina CCL2 no cenário do câncer de mama. Isso é evidenciado por diversos autores, um deles é Han R (2018), o qual mostrou que a “exposição ao estrogênio facilitou a proliferação, invasão e metástase do câncer de mama dependente de hormônio e promoveu a angiogênese por meio do aumento da secreção de CCL2 *in vitro* e *in vivo*. ” Contudo, quando analisados os resultados do Mann-Whitney do receptor de estrógeno, não foi possível obter resultados com nível de significância aceitáveis, entretanto, resultado próximos ao aceitável ($p=0,066$) foi obtido para a quimiocina CCL2.

Estudos que trazem uma relação entre a progesterona ou o receptor de progesterona e as quimiocinas CCL11 e CXCL11 são amplamente estudados quando o assunto é câncer de ovário, (Paula, S.O.C, 2015) (Freitas, G.F., 2010). Porém, pouco se vê artigos relacionando a progesterona ou o receptor de progesterona e as quimiocinas CCL11 e CXCL11 quando o assunto é câncer de mama.

Contudo, sabe-se que o câncer de ovário exibe uma enorme heterogeneidade molecular, (Benhadjeba S, Edjekouane L, Sauvé K., Carmona L., Tremblay A., 2018) assim como o câncer de mama. Sendo assim, acredita-se que a relação tão bem desenvolvida no câncer de ovário entre o receptor de progesterona e as quimiocinas CCL11 e CXCL11, pode ser obtida também com o câncer de mama, uma vez que, quando analisados os resultados do Mann-Whitney do receptor progesterona foi possível obter resultados com nível de significância aceitáveis ($p<0,05$), com relação as quimiocinas CXCL11 e CCL11, significando que as dosagens dessas quimiocinas se diferenciam significativamente entre pacientes progesterona negativo e pacientes progesterona positivo.

Já os resultados de Mann-Whitney para o HER2 e estadiamento não foram significativos, o que causou surpresa uma vez que estudos mostram várias relações das quimiocinas utilizadas com tais variáveis. Um exemplo seria o estudo que indica que as quimiocinas estão em constante relação com a progressão de tumores, uma característica ligada ao estadiamento (Figueiredo, C.R., 2019).

Estudos que quantificaram determinadas quimiocinas em pacientes idosas com câncer de mama encontraram diferenças significativas na expressão de algumas quimiocinas entre os subtipos moleculares e mostraram um aumento nas concentrações séricas de IP10 (CXCL10) com maior significância nas pacientes com câncer de mama triplo negativo (Santoianni MS, Lima JTO, Melo VLBV, Batista LJB, et al., 2018). “Nosso estudo mostra elevadas concentrações de MCP1 (CCL2) nos subtipos LA, LB e HER2 quando comparado ao triplo negativo” (Santoianni MS, Lima JTO, Melo VLBV, Batista LJB, et al., 2018). Contrariando o estudo de Santoianni MS, 2018, os resultados do Kruskal Wallis dos subtipos moleculares não apresentaram diferença significativa para nenhuma quimiocina.

5.3 Discussão dos *Heat Map* e das medianas

Já se mostrou que o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o estrogênio regulam positivamente de forma aditiva a transcrição e a secreção da quimiocina angiogênica CXCL8 em células tumorais de mama. (Haim K, Weitzenfeld P, Meshel T, Ben-Baruch A, 2011). Isso explica o caso dos *Heat Map* e das medianas de produção de quimiocinas para a variável receptor de estrogênio, onde no geral as quimiocinas são mais produzidas no grupo de receptores negativo, com exceção da CXCL8, que no receptor de estrogênio é mais produzida pelos pacientes ER+. Além disso, se for comparar também as medianas das quimiocinas do receptor de estrogênio se observa que a menos produzida é a CXCL10 e mais produzida é a CXCL8.

Estudo feito por Ghoneim HM (2009) com objetivo avaliar o significado da interleucina 8 (CXCL-8), para o prognóstico, em extratos de carcinomas de mama por meio da relação entre

receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR), obteve como resultado a expressão de CXCL-8 sendo significativamente influenciada pelo fenótipo ER. Em contraste, não foi afetado pelo fenótipo PR, o que de certa forma corrobora com o *Heat Map* e mediana do receptor de estrogênio, porém não faz o mesmo com o *Heat Map* e mediana do receptor de progesterona onde ele apresenta as mesmas características do outro receptor, ou seja, pacientes PR- produzindo mais quimiocina, e a quimiocina CXCL8 sendo mais produzida do que as demais.

No estudo de Vazquez-martin A, Colomer R, Menendez J.A., (2007) níveis circulantes de IL-8 foram significativamente maiores em pacientes com câncer de mama HER2(+) em comparação com pacientes HER2(-). Isso corrobora com os resultados obtidos para a variável proteína HER2 quando analisado o *Heat Map* e as medianas obtidas, onde se observa que os pacientes do grupamento HER2+ produzem mais quimiocinas pró-inflamatórias do que o outro grupo. Também é possível ver que assim como as outras variáveis a quimiocina mais produzida é a CXCL8 e a menos produzida é a CXCL10.

Uma visão abrangente da progressão do câncer de mama sugere que o processo é influenciado por propriedades intrínsecas das células tumorais, bem como por fatores microambientais, como por exemplo as citocinas e as quimiocinas (Ben-Baruch A., 2002). Este processo de progressão está intimamente relacionado com o estadiamento da doença. Sendo assim, se tratando do *Heat Map* e das medianas da variável estadiamento, observou-se que as quimiocinas CCL11, CXCL8 e CXCL11 foram mais produzidas por pacientes em estágio inicial do câncer, já as quimiocinas CCL2 e CXCL10 foram mais produzidas em estágio mais avançado do câncer de mama.

Se tratando das medianas e do *Heat Map* do subtipo molecular observa-se que não é possível prever que um subtipo molecular produz mais quimiocinas do que o outro, o que é também comprovado por Santoianni MS, Lima JTO, Melo VLBV, Batista LJB, et al., 2018,

onde eles ao avaliar os níveis séricos de CXCL10, MIG, RANTES, CXCL8 e CCL2 em idosas com câncer de mama, não encontraram diferença significativa entre os grupos luminal A, luminal B e HER2+.

5.4 Discussão do teste de coeficiente de correlação de postos de Spearman

Este teste buscou correlações entre as variáveis analisadas com as cinco quimiocinas quantificadas. Quando se fez a correlação das variáveis, receptor de estrógeno e quimiocinas, foi observando que um dos resultados deu próximo a ser significativo, este resultado era da quimiocina CCL2 ($p=0,066$). Sendo assim, foi procurado na literatura uma possível relação entre estes fatores (CCL2 e receptor de estrógeno). Com isso, de acordo com Soria, G. e Ben-Baruch, A. (2008) investigações mostram que a expressão de CCL2 em carcinomas de mama foi correlacionada com a falta de receptores de estrógeno e expressão de receptores de progesterona, o que é indicativo de mau prognóstico.

Outro resultado próximo a ser significativo foi a quimiocina CCL11 com o subtipo molecular ($p=0,053$), esta relação é vista pela ligação entre CCL11 e o subtipo HER2. Segundo Dehqanzada, Z., et.all. (2007), análise de soros pós-vacinação de pacientes com câncer de mama que receberam uma vacina de peptídeo HER2/neu E75 mostrou que as quimiocinas pró-inflamatórias CCL11 e CCL2 aumentaram em resposta à vacinação.

Já a correlação feita entre o receptor de progesterona com as quimiocinas deram resultados significativos, por mais que a correlação seja do tipo fraca, existe uma relação significativa entre as quimiocinas CCL11 e CXCL11 com o receptor de progesterona, isso se torna interessante, pois no teste de Mann-Whitney para o receptor de progesterona foram as mesmas quimiocinas que possuíram resultados significantes.

Estudo recente demonstra que a CXCL11 e CCL11 está envolvida na progressão de vários cânceres. (Gao YJ, Liu L, Li S, Yuan GF, et all, 2018). Sendo assim, quando foi feita a correlação da proteína Ki-67 com as quimiocinas, além de apresentar um resultado próximo ao

significativo com a quimiocina CCL2, se obteve dois outros resultados com nível de significância aceitável, sendo a correlação com a quimiocina CCL11 e CXCL11.

5.5 Discussão dos testes de qui-quadrado de Pearson

Estudos apontam uma associação entre CCL11 e as características clínico-patológicas do câncer de mama e sugeriu que a expressão de CCL11 estava associada ao grau histológico, estágio do tumor e status do receptor de estrogênio (ER). (Wang R., Huang K., 2020). Com isso, em relação aos resultados obtidos com o teste de qui-quadrado de Pearson para os receptores de estrógeno notaram que a quimiocina CCL11 obteve um resultado próximo ao significativo ($p=0,053$).

Quando se tratando de câncer de mama, pesquisas sugerem que CXCL10 pode atuar afetando o microambiente tumoral, agindo sobre as próprias células tumorais e desempenhando um papel na invasão e progressão do tumor. (Mulligan A. M., Raitman I., 2013). Com isso, os resultados para o receptor de progesterona mostram que as quimiocinas CXCL10 ($p=0,055$) e CCL11 ($p=0,051$) chegaram próximo a serem significativos. Além de demonstrarem uma diferença considerável na produção destas quimiocinas quando comparado os pacientes do grupamento *Low* para o grupamento *High*.

O processo de angiogênese está ligado ao estadiamento, pois ele é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, (Damico F.M, 2007) os quais irão levar nutrientes ao tumor e desencadear estágios mais agressivos. De acordo com (Azenshtein E, Meshe T, Shina S., 2005) a secreção de CXCL8 faz parte dos fatores pró-malignidade que podem controlar a expressão de mediadores angiogênicos em locais de tumor de mama. Sendo assim, com relação ao teste de qui-quadrado do estadiamento, notou-se que existe uma maior porcentagem de pacientes no grupo inicial e esta porcentagem é maior independentemente do grupo ser *Low* ou *High*, porém se teve uma exceção que foi com a quimiocina CXCL8 e justamente ela deu um resultado significativo ($p=0,28$).

Com este resultado foi avaliado o risco relativo, mostrando que pacientes dentro do grupamento *Low* para CXCL8 possuem 2,28 vezes o risco de estar no grupo de pacientes com estágio avançado do câncer de mama, comparado com os pacientes que estão no grupo *High*. Este resultado é corroborado por (Marjon P.L., Bobrovnikova-Marjon E.K., Abcouwer S.F., 2004) onde é dito que a expressão de citocinas pró-angiogênicas, como fator de crescimento endotelial vascular e CXCL8, desempenha um papel importante no crescimento tumoral e no processo de metástase.

6. CONCLUSÃO

A relação entre câncer e sistema imune, mais precisamente o câncer de mama e as quimiocinas foi amplamente abordado ao longo de todo este estudo. Além disso, a utilização de uma técnica como o LEGENDplex possibilitou uma otimização de análise simultânea de quimiocinas. Com isso, e por intermédio de testes estatísticos concluímos que, pacientes PR- produzem significativamente mais quimiocina CCL11 e CXCL11 do que pacientes PR+, além disso, existe uma correlação significativa entre o próprio receptor de progesterona e da proteína Ki-67 com estas duas quimiocinas (CCL11 e CXCL11). Já em relação aos subtipos moleculares nenhuma relação direta com as quimiocinas foi encontrada.

Em resumo, a concentração da quimiocina CXCL8 está associada a variável estadiamento, e quando avaliado o risco relativo, observa-se que, pacientes que se encontram dentro do grupamento *Low* para CXCL8 possuem 2,28 vezes o risco de estar no grupo de pacientes com estágio avançado do câncer de mama, comparado com os pacientes que estão no grupo *High*. Conclui-se que a relação entre as quimiocinas (CCL11 e CXCL11) e o receptor de progesterona deve ser mais analisada, uma vez que, existe uma nítida interação entre eles. E que a quimiocina CXCL8 tem um grande potencial de se tornar um biomarcador utilizado para saber o estágio que o paciente se encontra no câncer de mama.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Cancer Society, **Key Statistics for Breast Cancer in Men**. 08/02/2020. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer-in-men/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 23 mai. 2020.

Andrade, Wesley Pereira. **Câncer de mama pode afetar mulheres jovens? manifestação precoce do tumor é frequentemente associada com mutações genéticas**. 2016. Disponível em:< <https://www.minhavidade.com.br/saude/materias/18079-cancer-de-mama-pode-afetar-mulheres-Jovens#:~:text=No%20geral%2C%20o%20risco%20aumenta,ocorrem%20abaixo%20dos%2040%20anos>>. Acesso em: 15 abr. 2020.

Antunes, D.M. **Efeito dos tratamentos com ácido acetilsalicílico e celecoxibe na expressão de citocinas e no comportamento de linhagens celulares e carcinoma epidermoide de boca**. 2015. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em:< <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23141/tde-25022016-163317/publico/DaniellaMoraesAntunesVersaoCorrigida.pdf>> Acesso em: 02 maio 2020.

Azenshtein, Elina; Meshel, Tsipi; Shina, Sima; Barak, Nely; Keydar, Iafa; Ben-Baruch, Adit. **The angiogenic factors CXCL8 and VEGF in breast cancer: regulation by an array of pro-malignancy factors**. *Cancer Letters*, [S.L.], v. 217, n. 1, p. 73-86, jan. 2005.

Ben-Baruch, A. **Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions**. *Breast Cancer Res* 5, 31 (2002).

Benhadjeba S., Edjekouane L., Sauvé K., Carmona E., Tremblay A. **Feedback control of the CXCR7/CXCL11 chemokine axis by estrogen receptor α in ovarian cancer** *Mol. Oncol.*, p. 1689-1705, 2018.

Bonapace, L. *et al.* **Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis**. *Nature*, vol. 515, p. 130–133 (2014). Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature13862/>>

Breastcancer (org.). **Smoking**. 2020. Disponível em: <https://www.breastcancer.org/risk/factors/smoking>. Acesso em: 17 maio 2020.

Buitrago F., Uemura G., Sena M.C.F., **Fatores prognósticos em câncer de mama**. *Com. Ciências Saúde - 22 Sup 1: S69-S82*, 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/fatores_prognosticos.pdf>

Centers For Disease Control And Prevention. U.s. Department Of Health & Human Services (org.). **Health Effects of Cigarette Smoking**. 2020. Disponível em: https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/. Acesso em: 19 abr. 2020.

Cirqueira, M. B. *et al.* **Subtipos moleculares do câncer de mama**. *FEMINA*, vol. 39, nº 10, out. 2011. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n10/a2965.pdf>>

Cortazar, P. *et al.* **Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis**. *Lancet*, v. 384, n. 9938, p. 164–172, jul. 2014.

Damico, F.M. **Angiogênese e doenças da retina.** Arq. Bras. Oftalmol. v.70 n.3 São Paulo maio/jun. 2007.

Dehqanzada, Z., Storrer, C., Hueman, M., Foley, R., Harris, K., Jama, Y., Peoples, G. (2007). **Assessing serum cytokine profiles in breast cancer patients receiving a HER2/neu vaccine using Luminex® technology.** Oncology Reports.

Devita Centro Oncológico, (Sorocaba-Sp) (org.). **Estou com câncer e agora?** 2017. Disponível em: <http://oncologiadevita.com.br/estou-com-cancer-e-agora/>. Acesso em: 26 jun. 2020.

Federação Brasileira de Instituições Filantrópicas de Apoio a Saúde da Mama (FEMAMA). **Tipos de Câncer de Mama.** Disponível em: <https://www.femama.org.br/2018/br/noticia/ti-pos-de-cancer-de-mama>. Acesso em: 07/07/2020.

Figueiredo, C. R. L. V. **O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização.** J. Bras. Patol. Med. Lab. vol.55 no.3 Rio de Janeiro Maio/junho 2019.

Freitas, Gustavo Ferreira. **Estudo da resposta imune humoral em mulheres com neoplasia ovariana.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2010.

Freitas, T. H. **Citocinas e quimiocinas como biomarcadores terapêuticos na depressão: revisão sistemática e meta-análise.** 2017. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

GAO, Yu Jie; LIU, De Lin; LI, Sheng; YUAN, Gao Feng; LI, Li; ZHU, Hong Yan; CAO, Gaun Yi. **Down-regulation of CXCL 11 inhibits colorectal cancer cell growth and epithelial-mesenchymal transition.** Oncotargets And Therapy, v. 11, p. 7333-7343, out. 2018.

Ghoneim H. M., Maher S., Abdel-Aty A., Saad A., Kazem A., Demian S. R. **Tumor-derived CCL-2 and CXCL-8 as possible prognostic markers of breast cancer: correlation with estrogen and progesterone receptor phenotyping.** Egyptian Journal of Immunology. p. 37–48, 2009.

Haim, Karin; Weitzenfeld, Polina; Meshel, Tsipi; Ben-Baruch, Adit. **Epidermal Growth Factor and Estrogen Act by Independent Pathways to Additively Promote the Release of the Angiogenic Chemokine CXCL8 by Breast Tumor Cells.** Neoplasia, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 230-243, mar. 2011.

Hammond, M. E. et al. **Guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists J Clin Oncol, v. 28, p. 2784–2795, 2010.

Han, R., Gu, S., Zhang, Y., Luo, A., Jing, X., Zhao, L., Zhang, L. (2018). **Estrogen promotes progression of hormone-dependent breast cancer through CCL2-CCR2 axis by upregulation of Twist via PI3K/AKT/NF-κB signaling.** Scientific Reports.

Hospital de Câncer de Barretos. **Tratamento do Câncer de Mama.** Disponível em: <https://www.hcancerbarretos.com.br/cancer-de-mama/92-paciente/tipos-de-cancer/cancer-de-mama/164-tratamento-do-cancer-de-mama>. Acesso em: 29/11/2019.

Hospital Sírio-Libanês. **Câncer de Mama**. Disponível em: < <https://www.hospitalsiriolibane.org.br/hospital/especialidades/centrooncologia/mama/Paginas/diagnosticos.aspx#:~:text=A%20resson%C3%A2ncia%20magn%C3%A9tica%20%C3%A9%20recomendada,um%20primeiro%20c%C3%A2ncer%20de%20mama>. (2019) Acesso em: 14/04/2020.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Câncer de mama**. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20de%20mama%20tamb%C3%A9m,total%20de%20casos%20da%20doen%C3%A7a>. Acesso em: 27/11/2019.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Como surge o câncer?** Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer>> Acesso em: 11/12/2020.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Conceito e Magnitude do câncer de mama**. Disponível em:<<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>>. Acesso em: 27/11/2019.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **O que é câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> Acesso em: 27/11/2019.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Tratamento para o câncer de mama**. Disponível em:< <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/acoes-de-controle/promocao-da-saude> >. Acesso em: 27/11/2019.

Instituto Oncoguia. **Diagnóstico do Câncer de Mama**. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/diagnostico>. Acesso em: 29/11/2019.

Lages, Elisa Lopes e. **Avaliação de biomarcadores inflamatórios moleculares em pacientes com câncer de mama**. 2014. 80 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2014.

Legendplex, **Human Proinflammatory Chemokine**. Mul-Analyte Flow Assay Kit legendplex, BioLegend. cat. n°. 740003. San Diego. Estados Unidos da América (EUA).

Liu, Y. *et al*. **Down-regulation of miR-29b in carcinoma associated fibroblasts promotes cell growth and metastasis of breast cancer**. *Oncotarget*, vol. 8, n. 24, p. 39559-39570, 16 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5503632/>>

Marjon, P.L., Bobrovnikova-Marjon, E.V., Abcouwer, S.F. **Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress**. *Mol Cancer* 3, 4 (2004).

Moran, M. S. *et al*. **Consensus guideline on margins for breast-conserving surgery with whole breast irradiation in stage I and II invasive breast cancer**. *Society of Surgical Oncology-American Society for Radiation Oncology Ann Surg Oncol*, v. 21, p. 704-716, 2014.

Mulligan AM, Raitman I, Feeley L, Pinnaduwege D, Nguyen LT, O'Malley FP, *et al*. **Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the ontario familial breast cancer registry**. *Clin Cancer Res* p. 336–346. 2013

Nascimento, José Hermes Ribas do; SILVA, Vinícius Duval da; MACIEL, Antônio Carlos. **Acurácia dos achados mamográficos do câncer de mama: correlação da classificação BI-RADS e achados histológicos.** Radiol Bras, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 91-96, Apr. 2010.

Organização Mundial de Saúde. **Relatório da OMS sobre câncer: estabelecendo prioridades, investindo com sabedoria e cuidando de todos.** Organização Mundial de Saúde. (2020). Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 03/02/2020.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), Organização Mundial de Saúde (OMS). **Folha Informativa - Câncer.** Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094.> Acesso em: 29/11/2019.

Palomino, D.C.T. e Marti, L.C. **Quimiocinas e Imunidade.** Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil. 18/08/2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/eins/v13n3/pt_1679-4508-eins-13-3-0469.pdf> Acesso em: 01/12/2019.

Paula, Sálua Oliveira Calil de. **Caracterização da resposta imune celular em mulheres com câncer de ovário.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/99213>>.

Puchert, Malte; Obst, Jessica; Koch, Christian; Zieger, Konstanze; Engele, Jürgen. **CXCL11 promotes tumor progression by the biased use of the chemokine receptors CXCR3 and CXCR7.** Cytokine, v. 125, p. 154809-154819, jan. 2020.

Santoianni MS, Lima JTO, Melo VLBV, Batista LJB, et al., **Análise dos níveis séricos de quimiocinas em mulheres idosas com câncer de mama.** Repositório Científico do IMIP (Hígia), Recife, p.1-15. 2018.

Soria, G., & Ben-Baruch, A. (2008). **The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer.** Cancer Letters, 271–285.

Susan G. Komen For the Cure. **Como os Hormônios Afetam o Câncer de Mama,** Facts For Life. Instituto Espaço de Vida. 2009/2010. Disponível em: <https://ww5.komen.org/uploadedFiles/Content_Binaries/translate/How%20Hormones%20Affect%20Breast%20Cancer_Portuguese.pdf>

The Premenopausal Breast Cancer Collaborative Group. **Association of Body Mass Index and Age with Subsequent Breast Cancer Risk in Premenopausal Women.** JAMA Oncol. Published online June 21, 2018.

Vazquez-Martin, A.; Colomer, R.; Menendez, J. A., **Protein array technology to detect HER2 (erbB-2) -induced 'cytokine signature' in breast cancer.** European Journal Of Cancer, v. 43, n. 7, p. 1117-1124, maio 2007.

Wang, Rong; Huang, Keliang. **CCL11 increases the proportion of CD4+CD25+ Foxp3+ Treg cells and the production of IL-2 and TGF- β by CD4+ T cells via the STAT5 signaling pathway.** Molecular Medicine Reports, p. 2522-2532, 1 abr. 2020.

Wightman, S. *et al.* **Oncogenic CXCL10 signalling drives metastasis development and poor clinical outcome.** Br J Cancer, vol. 113, p. 327–335 (2015). Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/bjc2015193>>

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Você está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “**Avaliação da imunocompetência local e sistêmica no prognóstico de pacientes com neoplasia de mama e estratégia de detecção precoce entre familiares de primeiro grau**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Rogério Agenor Araújo, Camila Piqui Nascimento, Eduarda da Costa Marinho, Etelvina Rocha Tolentino Mosca, Felipe Andrés Cordero da Luz, Thais Rezende Mendes, Patrícia Ferreira Ribeiro, Rafael Mathias Antonioli e Marcelo José Barbosa Silva.

Nesta pesquisa temos o objetivo de aprimorar a prevenção do câncer de mama através do uso dos indicadores de risco e protocolo de diagnóstico clínico com realização de mamografia digital e/ou ultrassonografia das mamas em familiares de primeiro grau de pacientes com essa neoplasia. Ademais, pretende-se avaliar as características da resposta imunológica das pacientes com câncer de mama antes e após o tratamento oncológico e a interface com os marcadores de imunohistoquímica do tumor e da axila, além de associar a evolução das pacientes frente ao tratamento sistêmico com a resposta imunológica.

Você irá responder individualmente a um questionário semiestruturado, sobre fatores de risco para câncer de mama, elaborado pelos pesquisadores. Posteriormente, você indicará familiares de primeiro grau do sexo feminino que tenham interesse em participar da pesquisa e responder ao mesmo questionário. Caso seja identificado risco aumentado para seu familiar desenvolver o câncer de mama, ele será convidado a comparecer ao ambulatório de alto risco para investigação diagnóstica e acompanhamento. Para análise de marcadores sorológicos e avaliação de imunocompetência, serão coletados 12mL de sangue periférico antes, ao término e após 3 meses do seu tratamento. Para análise da imunocompetência local, após sua permissão, você assinará um Termo de Responsabilidade de Retirada de Amostra Biológica do Laboratório de Patologia em que o estudo anatomopatológico da sua biópsia foi realizado. Após conclusão das análises do bloco de parafina, o mesmo será arquivado no laboratório de origem. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa.

O estudo apresenta como prováveis riscos a perda de identidade, nervosismo, receio e desconforto durante aplicação do questionário e realização do exame. Pretende-se, no entanto, minimizar ao máximo tais riscos, explicando detalhadamente os objetivos da pesquisa, o modo de realização do exame e possibilitando aos indivíduos a livre opção de participar. Para minimizar o risco de perda de identidade, os pesquisadores se comprometem a manter sigilo absoluto, segundo a Resolução 466/12, e a utilizar código numérico para identificação da amostra e do questionário. Pode haver leve hematoma ou desconforto no local da punção, portanto a coleta de sangue de pacientes será realizada em conjunto com os exames bioquímicos de rotina para minimizar esses riscos. O procedimento será realizado por profissional habilitado e capacitado. Os benefícios da pesquisa incluem auxílio na detecção precoce de câncer de mama em indivíduos com história familiar positiva. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou necessidade de se justificar. Em caso de dúvidas a respeito da realização da pesquisa, você poderá entrar em contato com: **Rogério Agenor Araújo** – 3291.6166 ou **Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos**: Av. Nicomedes Alves dos Santos, 4545. Gávea - Uberlândia/MG. CEP: 38411-106. Fone: 4009-9039. Email: cep@unitri.edu.br.

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido