

Curso Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Paulo Henrique Rosa da Silva

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Avaliação da relação entre parâmetros clínicos patológicos de pacientes portadoras de
câncer de mama frente à concentração de quimiocinas.

Paulo Henrique Rosa da Silva

Uberlândia

Julho-2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação da relação entre parâmetros clínicos patológicos de pacientes portadoras de câncer de mama frente à concentração de quimiocinas.

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Paulo Henrique Rosa da Silva
Nome do aluno

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva
Nome do orientador

Uberlândia
Julho-2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586
2021

Silva, Paulo Henrique Rosa da, 1994-
Avaliação da relação entre parâmetros clínicos
patológicos de pacientes portadoras de câncer de mama
frente à concentração de quimioterápicos. [recurso
eletrônico] / Paulo Henrique Rosa da Silva. - 2021.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.304>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Silva, Marcelo José Barbosa, 1976-
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III.
Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado nº 270 do PPIPA				
Data:	nove de julho de dois mil e vinte um	Hora de início:	13h30min	Hora de encerramento:	15h55min
Matrícula do Discente:	11912IPA002				
Nome do Discente:	Paulo Henrique Rosa da Silva				
Título do Trabalho:	"Avaliação da relação entre parâmetros clínicos patológicos de pacientes portadoras de câncer de mama frente à concentração de quimiocinas"				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunobiologia dos processos alérgicos, autoimunes e tumorais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação da correlação de linfócitos t cd4 e cd8 intra e peri tumorais com seu perfil de quimiorreceptores quando circulantes em pacientes com cancer de mama				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos Titulares: Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota - CPC/UFMG; Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva - ICBIM/UFU, Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva - ICBIM/UFU - (Presidente) orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente, o tempo de arguição, e o tempo de resposta, foram conforme as normas do programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Marcelo José Barbosa Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/07/2021, às 08:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luís Otávio de Miranda Cota, Usuário Externo**, em 15/07/2021, às 09:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Vieira da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/07/2021, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2906054** e o código CRC **46B75CCD**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Jose Barbosa Silva pela orientação, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, pelos ensinamentos, pelo apoio técnico e científico na realização desse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Idelsa Araújo da Silva e Pedro Luiz Rosa, meus irmãos, Shayenne Rosa e Pedro Henrique Rosa, por sempre me apoiarem e me incentivarem na minha trajetória acadêmica.

Agradeço aos colegas de laboratório, Clara Maria, Isadora Uehara, Bruna Borges, Victor Luigi, Luiz Ricardo, Diogo Rabelo e Rogério Agenor, pelo auxílio e dedicação na realização desse trabalho, e a todos outros colegas que ajudaram indiretamente, meus singelos agradecimentos.

Agradeço à Dra. Paola Vendramini pelo apoio na realização da parte experimental desse trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas e ao órgão de fomento Capes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráficos A e B das curvas de sobrevivência de pacientes em estadiamento inicial e avançado em função do ponto de corte dos valores das concentrações de MIP-3alfa.....32
- Figura 2:** Gráfico da curva de sobrevivência entre pacientes do subtipo molecular luminal B em função do ponto de corte que define altos e baixos valores das concentrações de MIG.....33
- Figura 3:** Gráfico da curva de sobrevivência das pacientes com subtipo triplo-negativo em função do ponto de corte das concentrações de MCP-1..... 34
- Figura 4:** Gráfico da curva de sobrevivência entre pacientes com grau 3 em função do ponto de corte das concentrações de MIP-1alfa.....35
- Figura 5:** Gráficos A e B das curvas de sobrevivência entre pacientes com receptor de estrógeno negativo em função do ponto de corte das concentrações de MCP-1 e MIG.....36
- Figura 6:** Gráficos A e B das curvas de sobrevivência de pacientes com e sem invasão linfovascular em função do ponto de corte dos valores das concentrações de MIP-1alfa.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teste de Correlação de Spearman entre as quimiocinas.....	25
Tabela 2: Teste de Kruskal-Wallis entre as quimiocinas e os quatro tipos moleculares...	26
Tabela 3: Teste de Kruskal-Wallis entre grau histológico e as quatro quimiocinas.....	27
Tabela 4: Teste de Mann-Whitney entre receptores positivos e negativos para estrogênio e as quimiocinas.....	28
Tabela 5: Teste de Mann-Whitney entre receptorer HER2 e as quimiocinas.....	29
Tabela 6: Teste de Mann-Whitney com variável agrupamento a menopausa.....	29
Tabela 7: Teste de Mann-Whitney, estadiamento clinico e quimiocinas.....	30
Tabela 8: Teste de Mann-Whitney entre mutação de p53 e quimiocinas.....	31
Tabela 9: Teste de qui-quadrado entre Low/High de MIG e p53.....	31
Tabela10: Tabela cruzada entre Low/High de MIG e p53.....	31

LISTA DE ABREVIACÕES

CCL: Quimiocina do tipo CC	VIF: Fator de inflamação de variância
CCL2: Ligante 2 da quimiocina CCL	%: Porcentagem
CCL3: Ligante 3 da quimiocina CCL	IC: Intervalo de confiança
CCL4: Ligante 4 da quimiocina CCL	ELISA: Ensaio imunoenzimático
CCL5: ligante 5 da quimiocina CCL	ELR-: Sem ácido glutâmico-leucina-arginina
CCL11: Ligante 11 da quimiocina CCL	ERL +: Ácido glutâmico-leucina-arginina
CCL17: Ligante 17 da quimiocina CCL	DUSP6: A fosfatase 6 de dupla especificidade
CCL20: Ligante 20 da quimiocina CCL	NFs: Fibroblastos normal adjacente
CXCL: Quimiocina do tipo CXC	TNM: Sistema tumor-nódulo-metástase
CXCL1: Ligante 1 da quimiocina CXC	CAF: Fibroblastos associados à câncer
CXCL5: Ligante 5 da quimiocina CXC	TAMs: Macrófagos associados ao tumor
CXCL8: Ligante 8 da quimiocina CXC	APC: Aloficocianina
CXCL9: Ligante 9 da quimiocina CXC	R²: Coeficiente de determinação
CXCL10: Ligante 10 da quimiocina CXC	F: Teste de variância
CXCL11: Ligante 11 da quimiocina CXC	MMPs: Metaloproteinases
IL-8: Interleucina 8	Cys: <i>Cysteina</i>
Eotaxin: Eotaxina	pN: Estadiamento nodal patológico
IP-10: Proteína induzível por interferon (IFN) - γ	\geq: Maior ou igual
GRO-α: Oncogene regulado por crescimento	\leq: Menor ou igual
MIG: Monocina induzida por interferon gama	$>$: Maior
TARC: Timo e quimiocina regulada por ativação	$<$: Menor
ENA-78: Proteína de ativação de neutrófilos epitelial	X²: Qui-quadrado
MCP-1: Proteína-1 quimiotática de macrófago	Status: Condição
MIP-1α: Proteína-1 α inflamatória macrofágica	
MIP-3α: Proteína-3 α inflamatória macrofágica	
MIP-1β: Proteína-1 β inflamatória macrofágica	
I-TAC: Químioatraente de células T α induzível por interferon	
RANTES: Regulado após ativação, célula T normal expressa e secretada	
BCA-1: Quimiocina atraente de linfócito B	
PE: Ficoeritrina	
cN: Estadiamento nodal patológico	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Câncer de mama	12
1.2 Quimiocinas	12
1.2.1 CCL2 (MCP-1)	14
1.2.2 CCL3 (MIP-1alfa)	15
1.2.3 CCL20 (MIP-3alfa)	16
1.2.4 CXCL9 (MIG)	16
1.3 Parâmetros clínicos patológicos	17
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral:	19
2.2 Objetivos específicos:	19
3. MATERIAIS E MÉTODO	19
3.1 Materiais:	19
3.2 Metodologia:	20
3.2.1 Coleta dos dados das pacientes	20
3.2.2 Coleta das amostras de soro	20
3.2.3 Agrupamentos das pacientes de acordo com os parâmetros clínicos analisados	20
3.2.4 Preparação das alíquotas	21
3.2.5 <i>Legendplex</i>	21
3.2.6 Citometria de fluxo	23
3.2.7 Análise no Software <i>Legendplex</i> :	23
3.2.8 Análise estatística:	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Características demográficas e clínico-patológicas	25
4.2 As quatro quimiocinas estão correlacionadas entre si	25
4.3 A predominância do subtipo molecular não influencia na produção das quimiocinas	26
4.4 O grau histológico da paciente não interfere na produção de quimiocinas	26
4.5 A responsividade ao receptor de estrógeno não influencia na concentração das quimiocinas	27
4.6 A presença de receptor HER2 não influencia na concentração das quimiocinas ..	28
4.7 As pacientes em menopausa possuem não produzem mais quimiocinas comparados com aquelas que ainda não atingiram a menopausa	29

4.8 A evolução do estadiamento clínico não influencia na concentração das quimiocinas	30
4.9 Variação da concentração de MIG também é concomitante com mutação de p53	30
4.10 Pacientes com alta concentração de MIP-3alfa sobreviveram mais.....	31
4.11 Pacientes com alta concentração de MIG tiveram maior sobrevida livre de recorrência	33
4.12 Pacientes com alta concentração de MCP-1 sobrevivem menos	33
4.13 Pacientes grau 3 com alta concentração de MIP-1alfa sobrevivem menos	34
4.14 Pacientes ER negativo com altas concentrações de MCP-1 e MIG vivem menos	35
4.15 Pacientes com invasão linfovascular com alta produção de MIP-1Alfa têm maior sobrevida livre de recorrência.....	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS.....	48
8 ANEXO:.....	61

RESUMO

O câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado em mulheres e ocupa o segundo lugar entre as causas de morte por câncer. É uma doença heterogênea e sua patogênese ainda permanece obscura na maioria dos casos. Este trabalho avaliou a relação de quatro tipos específicos de quimiocinas com características clínico patológicas de pacientes portadoras de câncer de mama do Hospital de Clínica de Uberlândia. Na metodologia empregada, para a quantificação das quimiocinas no soro das pacientes, realizou-se a quantificação pela técnica de *LegendPlex*, um ensaio imuno-enzimático baseado em *beads* de captura que são adquiridas através de um Kit de ensaio, e as demais etapas do processo foram realizadas com auxílio de um citômetro de fluxo e os *softwares LegendPlex* e o IBM SPSS *Statistics 22* para análises de dados. Os resultados demonstraram que os parâmetros clínicos subtipo molecular de câncer de mama, presença de receptor de estrógeno, presença de receptor de progesterona, presença de receptor HER2, menopausa e estadiamento clínico não influenciam na concentração das quimiocinas. Foi possível observar que as quimiocinas possuem uma correlação positiva entre elas e que existe associação entre a concentração de MIG com a presença de mutação da proteína p53. Nas análises de sobrevida, observou-se que, a alta concentração da quimiocina MIP-3alfa estava associada com maior sobrevida das pacientes em estadiamento inicial, e que altas concentrações da quimiocina MIP-1alfa estava presente no grupo de pacientes com tumores grau 3 que sobreviveram menos. Além disso, MIP-1alfa estava associado com maior sobrevida livre de recorrência de pacientes com invasão linfovascular. Além disso, pacientes com altas concentrações de MIG tiveram maior sobrevida livre de recorrência. Ademais, as pacientes não responsivas ao receptor de estrógeno, tiveram redução da sobrevida global quando possuíam altas concentrações de MCP-1 e MIG, o mesmo aconteceu com as pacientes com subtipo triplo-negativo com altas concentrações de MCP-1. Com base nesses achados, as dosagens sorológicas de MIP-1alfa, MCP-1, MIG e MIP-3alfa não demonstram diferença entre os grupos estudados. No entanto, MIP-3alfa, MIP-1alfa e MIG possuem associação com sobrevida e sobrevida livre de recorrência no grupo de pacientes estudados.

Palavras-chaves: Quimiocina, câncer de mama, prevalência, sobrevida global

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women and ranks second among the causes of death from cancer. It is a heterogeneous disease, and its pathogenesis remains unclear in most cases. This work evaluated the relationship of four specific types of chemokines with clinical pathological characteristics of patients with breast cancer at the Hospital de Clínica de Uberlândia. The quantification of chemokines in the patients' serum was performed using the LegendPlex technique, an immunoenzymatic assay based on capture beads that are acquired through an assay kit, and the other steps of the process were performed with the aid of a flow cytometer with LegendPlex and IBM SPSS Statistics 22 software for data analysis. The results demonstrated that the clinical parameters of the molecular subtype of breast cancer, presence of estrogen receptors, presence of progesterone receptors, presence of HER2 receptors, menopause, and clinical staging did not influence the concentration of chemokines. It was possible to observe that chemokines have a positive correlation between them, and that there is an association between MIG concentration and the presence of p53 protein mutation. In the survival analyses, it was observed that the high concentration of the chemokine MIP-3alpha was associated with greater survival of patients in the initial stage, and that high concentrations of the chemokine MIP-1alpha were present in the group of patients with grade 3 tumors who survived less. Furthermore, MIP-1alpha was associated with greater recurrence-free survival of patients with lymphovascular invasion, and patients with high concentrations of MIG had a longer recurrence-free survival. Furthermore, patients unresponsive to the estrogen receptor had a reduction in overall survival when they had high concentrations of MCP-1 and MIG, and the same happened in patients with triple-negative subtype with high concentrations of MCP-1. Based on these findings, the serological dosages of MIP-1alpha, MCP-1, MIG and MIP-3alpha did not present any difference between the studied groups. However, MIP-3alpha, MIP-1alpha and MIG are associated with survival and recurrence-free survival in the group of patients studied.

Keywords: Chemokine, breast cancer, prevalence, overall survival.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo e, apesar dos consideráveis esforços diagnósticos e terapêuticos, ainda representa a quinta causa principal de mortalidade relacionada ao câncer em geral (GIOVANNELLI et al., 2019). Ele é caracterizado pela presença de tumor maligno localizado dos ductos lácteos, lóbulos ou estroma, no qual, células se proliferam de maneira desordenada e são capazes de invadir os tecidos circulantes, nódulos linfáticos e órgãos distantes (SB; CC, 2010). O câncer de mama é um grupo heterogêneo de neoplasias originárias das células epiteliais que revestem a estrutura da mama (POLYAK, 2011). A classificação do câncer de mama é denominada em subtipo luminal A, luminal B, HER2 positivo, *basal-like* e *normal-like* (YAO et al., 2017).

A presença de história familiar significativa é um fator de risco muito importante para o desenvolvimento do câncer de mama (EVANS; HOWELL, 2007). Outros fatores de risco incluem idade, alteração genética, tabagismo, fatores nutricionais, altos níveis de hormônios, dentre outros (AC; DF, 2006; ATAOLLAHI et al., 2015; PJ et al., 2003). Todos os anos, mais de 44.000 mulheres desenvolvem a doença no Reino Unido e mais de 12.500 morrem (EVANS; HOWELL, 2007) As maiores taxas de incidência de câncer de mama estão na América do Norte, Austrália, Nova Zelândia e Europa do Norte e Ocidental (O'SULLIVAN; LOPRINZI; HADDAD, 2018)

1.2 Quimiocinas

As quimiocinas são pequenas proteínas secretadas bastante conhecidas por seus papéis na mediação do tráfego de células imunes e do desenvolvimento do tecido linfóide (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014; NAGARSHETH; WICHA; ZOU, 2017; ROT; VON ANDRIAN, 2004a). Estas proteínas são definidas por sua sequência de aminoácidos primária e pelo arranjo de resíduos de cisteína, na quais formam ligações dissulfeto que mantêm a estrutura do monômero de quimiocina, que consiste em uma folha β de três fitas centrais, uma hélice α C-terminal sobreposta e um terminal N não estruturado curto que desempenha um papel crítico na ativação do receptor (CLORE; GRONENBORN, 1995).

As quimiocinas são denominadas como grande subfamília de citocinas, tendo cerca de cinquenta tipos diferentes (STONE et al., 2017) e podem ser subdivididas em quatro classes principais, dependendo da localização dos dois primeiros resíduos de cisteína (C) em sua sequência da extremidade N-terminal da cadeia de polipeptídeo: a saber, as CC-quimiocinas, CXC-quimiocinas, C-quimiocinas e CX3C-quimiocinas (CLORE; GRONENBORN, 1995). As quimiocinas podem ser inflamatórias ou não, sendo essa primeira, aquelas ativadas e reguladas positivamente sob condições inflamatórias e têm papéis em resposta a danos nos tecidos, infecção e outras anormalidades fisiológicas na imunidade adaptativa e inata (CAROLINA; PALOMINO; MARTI, 2015).

Nas subfamílias CC, CXC e CX3C, os dois resíduos Cys, que formam ligações dissulfeto a outros resíduos Cys conservados dentro da quimiocina, são separados por 0, 1 e 3 resíduos, respectivamente, enquanto na subfamília XC o segundo Cys, e seu parceiro de ligação dissulfeto, estão ausentes da sequência. As quimiocinas são designadas de acordo com sua classificação de subfamília por nomes sistemáticos compostos por um prefixo (CCL, CXCL, CX3CL ou XCL; “L” significa um ligante em oposição a um receptor) seguido por um número de identificação (STONE et al., 2017).

As CXCs podem ser classificadas com base na presença / ausência de um motivo ELR Glu-Leu-Arg antes do primeiro resíduo de aminoácido cisteína na estrutura primária, (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1997; STRIETER et al., 2006; WANG et al., 2018).

As quimiocinas CXC ELR⁺ incluem CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8; e as quimiocinas CXC ELR⁻ incluem CXCL4, CXCL9 e CXCL10 (KOZŁOWSKI et al., 2003; ZHANG et al., 2017). A quimiocina da classe CC é a maior das quatro quimiocinas, consistindo em pelo menos CCL1-28, 28 membros da quimiocina que sinalizam através do CCR1-10 (RIDIANDRIS et al., 2017). Os receptores de quimiocinas que se ligam às quimiocinas da classe CC são expressos principalmente por monócitos-macrófagos e células T, as categorias de células estão relacionados à inflamação crônica (WHITE; IQBAL; GREAVES, 2013).

Os receptores de quimiocinas são nomeados conforme o grupo que se ligam, portanto, seus nomes sistemáticos consistem em um prefixo como CCR, CXCR, CX3CR ou CR seguido por um número de identificação (CUI; CHU; CHEN, 2020; LIU et al., 2014; STONE et al., 2017).

No contexto do microambiente tumoral, as quimiocinas podem ser expressas por células tumorais e outras, incluindo células imunes e células do estroma (CHOW; LUSTER, 2014). Em resposta a quimiocinas específicas, diferentes subconjuntos de células imunes migram para o microambiente tumoral e regulam as respostas imunes tumorais (NAGARSHETH; WICHA; ZOU, 2017). As quimiocinas tem o papel de estimular e regular o recrutamento dos leucócitos e do sangue para os tecidos, além de estimular a produção de novas citocinas e auxiliar em ativações e diferenciações celulares (NEGUS, 1996; RAMAN; SOBOLIK-DELMARE; RICHMOND, 2011; SALAZAR et al., 2013). As quimiocinas inflamatórias e seus receptores são contribuintes críticos na atração de células imunes para o microambiente tumoral, desempenhando um papel fundamental, já que podem não só orientar o infiltrado leucocitário, mas também intervir na proliferação celular do tumor e na condução de metástases (PALACIOS-ARREOLA et al., 2014a).

As quimiocinas inflamatórias tem potencial para promover a progressão do tumor, como a MCP-1/CCL2 que é altamente expressa em células tumorais, na qual possui efeitos pro-tumorais através da promoção da angiogênese e da infiltração de leucócitos, principalmente macrófago associados a tumor (TAMs) (A, 2006; G; A, 2008; SL et al., 2009). Assim como a MCP-1, outras quimiocinas também desempenham um papel pró-tumoral, como por exemplo a quimiocinas MI-3-alfa/CCL20, onde um estudo mostrou que essa quimiocina, em altas concentrações, foi correlacionada com proliferação celular do tumor (MARSIGLIANTE; VETRUGNO; MUSCELLA, 2013). Porém, quimiocinas como a MIG/CXCL9 demonstrou em alguns estudos, atividades tanto anti-tumorais e pró-tumorais, mostrando que os efeitos imunobiológicos dessa quimiocinas é bastante complexo (DING et al., 2016). Portanto, as quimiocinas afetam diretamente e indiretamente a imunidade tumoral; molda fenótipos imunológicos e biológicos do tumor; e influência a progressão do câncer, terapia e desfechos do paciente (BALKWILL, 2004; ZOU; WOLCHOK; CHEN, 2016).

1.2.1 CCL2 (MCP-1)

As quimiocinas CC têm efeitos quimiotáticos em monócitos e subconjuntos de linfócitos, mas também estimulam eosinófilos, basófilos e célula *natural killer* (PALOMINO; MARTI, 2015). A quimiocina inflamatória CCL2 (também

conhecida como MCP-1) é um mediador inflamatório pró-canceroso, particularmente no câncer de mama (BORSIG et al., 2014; CONTI; ROLLINS, 2004). Essa quimiocina é expressa por leucócitos e células do estroma no local do tumor. No entanto, a principal fonte de CCL2 está nas próprias células do câncer de mama, embora dificilmente seja expressa pelas células epiteliais normais da mama. Além disso, em pacientes com câncer de mama, altos níveis de expressão de CCL2 foram associadas com doença avançada e recidiva precoce (CHAVEY et al., 2007; SORIA et al., 2011). Estudos realizados *in vivo* com sistemas de modelo animal de câncer de mama demonstraram que a inibição/super-expressão do CCR2b (receptor do CCL2) causa um aumento/diminuição no crescimento tumoral comparado com os camundongos que expressam normalmente o receptor. Portanto, a atividade dessa quimiocina faz parte da rede pleiotrópica de fatores que influenciam o desenvolvimento do câncer de mama (LU; KANG, 2009; QIAN et al., 2011). A CCL2 contribui para o recrutamento de células mieloides como os macrófagos associados a tumores (TAMs) e células supressoras derivadas de tecido mieloides em tumores de mama e tais células contribuem para a manutenção da regulação negativa do sistema imunológico no microambiente tumoral (LOW-MARCHELLI et al., 2013).

Os macrófagos podem ser recrutados para o microambiente tumoral pela sinalização CCL2-CCR2 (QIAN et al., 2011). A expressão de CCL2 por tumores se correlaciona com o número de macrófagos associados a tumor (TAMs) em muitos tumores e está associada a um mau prognóstico da paciente em alguns tipos de câncer, incluindo câncer de mama (POLLARD, 2004).

1.2.2 CCL3 (MIP-1alfa)

A quimiocina CCL3, também conhecida como proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1alfa), é uma quimiocina da categoria CCL que é composta por três exões e dois intrões, que codificam uma pré-proteína de 92 aminoácidos. Essa quimiocina é capaz de realizar o recrutamento de monócitos e macrófagos, principalmente de neutrófilo e pode estar associada com alguns tipos de câncer, como o carcinoma epidermóide oral (DA SILVA et al., 2017; HEINRICHS et al., 2013; SEKI et al., 2009).

Um estudo observou que pacientes portadoras do câncer de mama com altas concentrações da quimiocina CCL3 tiveram o pior prognóstico clínico, no qual essas pacientes tiveram uma redução do tempo de sobrevida comparada às pacientes com baixa concentrações de CCL3 (FARMAKI et al., 2017). Em um estudo *in vitro* mostrou que CCL3 promoveu a proliferação, ciclagem, migração e invasão de células do câncer de

mama, na qual o bloqueio dessa quimiocina proporcionou a inibição do crescimento tumoral e das metástases (LUO et al., 2020). Contrariando esses estudos, um estudo sobre carcinoma de colón em modelo animal concluiu que CCL3 potencializa a atividade antitumoral, no qual, essa quimiocina aumenta a infiltração de células T CD4⁺, T CD8⁺, além disso, recruta célula natural *killer*, que é fonte de interferon-gama, para conduzir a infiltração de células dendríticas (ALLEN et al., 2018).

1.2.3 CCL20 (MIP-3alfa)

O CCL20 ou MIP-3alfa é uma quimiocinas do tipo CCL, que é produzida por muitos tipos de células, incluindo células endoteliais e macrófagos que respondem a estímulos como as citocinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , dentro outros fatores pro-inflamatórios (LI et al., 2017). A quimiocina CCL20 é relada por possuir a função de atrair linfócitos, mas não atrai monócitos, e seu receptor é o CCR6 (ABRAHAM et al., 2017). Além disso, um estudo relatam a capacidade da CCL20 de atrair células dendríticas que expressam o receptor CCR6 em tecido epitelial e com base em outro estudo, isso tem associado a um mau prognóstico de pacientes com câncer de mama (LE BORGNE et al., 2006; TREILLEUX et al., 2004).

Mas o papel da CCL20 ainda não está claramente estabelecido como aponta algumas investigações, entretanto, já foi relatado que esta quimiocinas se encontra desregulada no contexto do câncer de mama, mas se isso é fator principal para a contribuição da tumorigenicidade do câncer de mama, ainda é necessário mais abordagens para melhores esclarecimentos (ASIEDU et al., 2011; XU et al., 2010).

1.2.4 CXCL9 (MIG)

A CXCL9, também conhecida como monocina induzida por interferon-gama, (MIG), é uma quimiocina do cromossomo humano 4 e é do grupo das quimiocinas do tipo CXC, sua produção feita por monócito/macrófago é induzida pelo interferon-gama e seu receptor é o CXCR3 e assim como as demais 17 α -quimiocinas (FARBER, 1993; LIAO et al., 1995). A quimiocina CXCL9 possui várias funções fisiológicas e patológicas (GAO et al., 2020; GORBACHEV et al., 2007), onde estudos têm mostrado que CXCL9 pode mediar a quimiotaxia de células promotoras de tumor, como células T reguladoras (REDJIMI et al., 2012) e resposta do padrão Th1, estimulação de células T CD8 e célula

natural killer (PALOMINO; MARTI, 2015). Além disso, essa quimiocina vem sendo relatada em diversos contextos além do tumor, dentre eles, as doenças auto-imunes, hipersensibilidade tardia e infecções virais (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1997).

Um estudo mostrou que células cancerosas deficientes com CXCL9 são mais tumorigênicas do que aquelas que expressam essa quimiocina (GORBACHEV et al., 2007). A CXCL9 já foi associada a uma redução da sobrevida global de pacientes com câncer de mama em estágio inicial, tendo assim uma relação com um mau prognóstico (RAZIS et al., 2020). Contrariamente, outro estudo afirmou que altas concentrações de CXCL9 foi significativamente correlacionada com um resultado de sobrevida favorável no câncer de mama, no qual, essa quimiocinas proporcionou a infiltração no microambiente tumoral, em torno de seis tipos de células imunes, os linfócitos B, T CD4+ T CD8+, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, evidenciando assim uma atividade supressora de tumor (LI et al., 2020).

1.3 Parâmetros clínicos patológicos

Existem diversos parâmetros usados na clínica que se englobam no sistema de estadiamento TNM, que foi identificado há muito tempo como um dos melhores preditores de sobrevida a longo prazo e um indicador para decisões terapêuticas em pacientes com câncer de mama (VERONESI et al., 2009). O jornal eletrônico *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publicou sete edições do sistema tumor-nódulo-metástase (TNM) para estadiamento do câncer. Em 2017, foi anunciada a 8ª edição, em que as revisões foram baseadas no mais alto nível de evidência de dados clínicos e patológicos recém-adquiridos (KOH; KIM, 2019a)

A 7ª edição do sistema de estadiamento AJCC baseou-se principalmente no estadiamento anatômico, que utilizou a extensão do tumor primário (T), o estado dos linfonodos regionais (N) e o estado da metástase (M). Isso permaneceu praticamente inalterado na 8ª edição. O estágio T é baseado no tamanho e grau de invasão locoregional pelo tumor primário e é categorizado de T1 a T4. O estágio N é determinado pela extensão do envolvimento nodal, incluindo linfonodos axilares, mamários internos e supraclaviculares ipsilaterais. As metástases distantes são avaliadas para determinar o estágio M. A 7ª edição usou nove estágios (0, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC e IV) com base em diferentes combinações de status T, N e M. (KOH; KIM, 2019a)

Para estadiamento, o tamanho máximo do tumor invasivo é medido porque é uma estimativa razoável do volume do tumor (KOH; KIM, 2019a; REZO et al., 2011). Ao contrário das categorias T, o estadiamento nodal usa categorias clínicas N (cN) e N (pN) patológicas separadas, sendo a classificação patológica é definida pelas regiões de linfonodos envolvidos e o número de metástases de linfonodos axilares ipsilaterais. As metástases podem ser detectadas em vários estudos de imagem, (KOH; KIM, 2019a) e os locais mais comuns de metástases de câncer de mama são ossos, pulmão, cérebro e fígado (CUI; CHU; CHEN, 2020).

O grau do tumor é um importante fator prognóstico independentemente do tamanho do tumor e do número de linfonodos positivos (SCHWARTZ et al., 2014). O grau do tumor reflete a diferenciação do tumor com pior prognóstico observado em tumores com alto grau histológico ou diferenciação pobre, do que aqueles com baixo grau ou bem diferenciados (ELSTON; ELLIS, 1991).

Avaliar a expressão de receptores de estrogênio (ERs) e receptores de progesterona (PRs) no câncer de mama é importante, porque moduladores ER seletivos retardam a progressão de tumores ER-positivos e PR-positivos (ABE et al., 2011; BARNES et al., 1996). Além disso, o câncer de mama está relacionado a vários oncogenes, incluindo *HER2*. A presença de *HER2* está associada a um mau prognóstico em pacientes não tratados (ROSENTHAL et al., 2002). No entanto, o fármaco usado no tratamento de *HER2* (trastuzumabe) melhoram o prognóstico para pacientes com tumores *HER2* positivos (MOASSER; KROP, 2015; SLAMON et al., 2011). Um nível alto de Ki-67 reflete a divisão rápida das células tumorais, embora não haja limite universal para medir os níveis de Ki-67 (COATES et al., 2015; GERDES et al., 1983). De acordo com o status ER / PR e *HER2* e com informações adicionais sobre Ki-67, a 8.^a edição identifica quatro subtipos: luminal A (receptor de hormônio positivo, *HER2*- negativo, baixo Ki-67), luminal B (receptor de hormônio positivo, *HER2* -negativo, alto Ki-67), *HER2* (*HER2* -positivo, independentemente do status do receptor de hormônio) e basal (receptor de hormônio e *HER2* negativo) (EIERMANN et al., 2013; KONECNY et al., 2003). O tipo luminal A apresenta o melhor prognóstico, com excelente resposta às terapias endócrinas. O tipo B luminal é menos responsivo às terapias endócrinas e tem pior prognóstico do que o tipo A luminal. O tipo *HER2* responde aos agentes de direcionamento de *HER2* e o tratamento adequado melhora o prognóstico. O tipo basal, também conhecido como tumor triplo-negativo, tem o pior prognóstico (KOH; KIM, 2019a)

Diferentes estágios prognósticos são atribuídos a tumores com o mesmo estágio anatômico, dependendo do grau histológico, *status* do receptor de hormônio, *status* de HER2 e painéis multigênicos. Diferentes estágios de prognóstico exigirão diferentes terapias para cânceres de mama com o mesmo estágio anatômico; portanto, o papel dos radiologistas na avaliação da resposta do tumor após terapias adequadas também é importante (KOH; KIM, 2019a).

Existem diversas questões clínicas já estudada sobre o câncer de mama, porém é de suma relevância explorar a partir do ponto vista do contexto imunológico. Com base nisso, este trabalho teve como objetivo avaliar os perfis de quimiocinas correlacionando as mesmas com alguns parâmetros clínicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o perfil de quimiocinas em pacientes portadoras de câncer de mama e sua relação com parâmetros clínicos patológicos.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Quantificar as quimiocinas de amostras de sangue de pacientes com câncer de mama através de técnica de *Legendplex*.
- b) Analisar as concentrações de MCP-1, MIG, MIP-1alfa, MIP-3alfa, com fatores e parâmetros clínicos e patológicos de pacientes portadores de câncer de mama.
- c) Analisar a relação da sobrevida global e sobrevida livre de recorrência entre os diferentes grupos de pacientes com as concentrações de MCP-1, MIG, MIP-1alfa, MIP-3alfa.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Materiais: Jaleco, tubo de coleta de sangue, amostra de soro de pacientes, anticoagulante EDTA, placa de fundo em V, tubos de *ependorf* de 1,5 ml, pipetas, ponteiras, vórtex, papel alumínio, centrífuga 1500 rpm, tubo de falcon, , papel pardo, citômetro acoplado ao monitor de computador, luvas descartáveis, pincel, equipamento ultra-freezer, instante de isopor e kit *Legendplex* (manual, tampão de lavagem, esferas, matrix C, solução padrão, estreptovidina, esferas magnéticas, água destilada, papel plástico).

3.2 Metodologia:

3.2.1 Coleta dos dados das pacientes

Os dados foram obtidos dos prontuários das pacientes do setor de oncologia do Hospital de clínica do Hospital de Clínicas de Uberlândia, no qual os dados das pacientes envolvidas no estudo foram inseridos em uma planilha do programa Excel contendo diversas informações de cada uma das 60 pacientes, desde informações básicas como idade, IMC até subtipo molecular de câncer no qual a paciente possui.

3.2.2 Coleta das amostras de soro

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. Para seleção das pacientes que poderiam participar da pesquisa foram adotados os seguintes termos de inclusão: mulheres com idade igual ou superior a 18 anos, em primeira linha de tratamento e com condições verbais e cognitivas de responderem ao instrumento de coleta de dados. Em relação aos critérios de exclusão foram os seguintes: mulheres com outro tipo de câncer que não o de mama, mulheres com menos de 18 anos, mulheres que já iniciaram o tratamento oncológico e mulheres sem condições verbais e cognitivas de responderem ao instrumento de coleta de dados.

Com isso, as pacientes que concordaram em participar da pesquisa, por meio do termo que leram e assinaram (ANEXO 1), foram encaminhados para o posto de coleta de sangue do hospital do câncer, para a coleta de 12 mL de sangue periférico por meio de técnicas assépticas pelas enfermeiras, após o procedimento responderam um questionário enquanto aguardavam a consulta médica. O sangue foi coletado em um tubo com o anticoagulante EDTA e armazenado em refrigeração adequada. As amostras foram processadas do seguinte modo: primeiramente 100 µL do sangue foi lavado com PBS a 0,3% BSA e bloqueado com PBS a 5% BSA por 10 minutos.

3.2.3 Agrupamentos das pacientes de acordo com os parâmetros clínicos analisados

As pacientes foram agrupadas na seguinte forma:

Subtipo Molecular	Receptor estrógeno	Receptor progesterona	HER2	Estadiamento	Invasão linfovascular
--------------------------	---------------------------	------------------------------	-------------	---------------------	------------------------------

Luminal A	Positivo	Positivo	Positivo	Inicial	Sim
Luminal B	Negativo	Negativo	Negativo	Avançado	Não
Triplo-negativo					

Menopausa	Grau	p53	Infiltrados	Neoadjuvante
Sim	G1	Positivo	Presente	Sim
Não	G2	Negativo	Ausente	Não
	G3			
	G4			
	Microinvasor			

3.2.4 Preparação das alíquotas

Após obtenção das amostras, as quais estavam armazenadas em um ultra-freezer, na temperatura de -80°C , as mesmas foram descongeladas, misturadas e centrifugadas a 1.000 rpm, durante 10 minutos, para separar o plasma e algumas partículas, obtendo assim o soro das pacientes, com isso foram separadas alíquotas de $100\mu\text{L}$ do soro de cada uma das 60 pacientes.

3.2.5 Legendplex

O *Legendplex BioLegend* é um imunoenensaio à base de esferas que utiliza os mesmos princípios básicos dos imunoenaios em sanduíche, nos quais um analito solúvel é capturado entre dois anticorpos. Dentre os kits, utilizou-se o painel denominado de *Human Proinflammatory Chemokine Panel* que contém marcadores de quimiocinas específicas, para identificar e quantificar as seguintes quimiocinas pró inflamatórias: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11.

Para dar início aos procedimentos, realizou-se algumas etapas que deveriam ser feitas previamente. Com as alíquotas já 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 e 1:1. Para isso, agitou-se as esferas em um sonicador por 1 minuto e

depois no vórtex durante 30 segundos, antes de usar. Após feito isso, calculou-se o volume final de esferas a ser usado.

Além disso, foi necessário ir fazendo o tampão de lavagem, o qual foi feito utilizando 25 ml do tampão do kit mais 475 ml de água deionizada, este tampão de lavagem deve ser deixado a temperatura ambiente e misturado de forma eficiente. Preparou-se também a Matrix a ser usada durante o experimento, a qual foi realizada adicionando 5 ml da solução tampão teste do kit, no frasco da Matrix, esperar 15 minutos e depois misturá-los usando o vórtex.

Foi realizado também a preparação padrão, no qual reconstitui-se painel padrão de inflamação liofilizado em 250µl de tampão, misturou e deixar por 10 minutos. Transferiu para um microtubo e rotulou como padrão C7 superior, realizar diluição em 6 tubos, adicionando 75µl de tampão de ensaio + 25µl do tubo anterior (ex: C6 (75µl + 25µl C7); C5 (75µl + 25µl C6) C0 (75µl de tampão).

E por último realizou-se a diluição das amostras, diluindo-as 2x com tampão de ensaio antes do teste (ex. 50µl tampão + 50µl amostra). Após todas essas etapas prévias realizadas, iniciaram-se as etapas na placa de fundo em forma de V.

Com uma placa de fundo em forma de V na bancada e todos os outros materiais em temperatura ambiente, colocou-se a placa do filtro em uma tampa invertida da placa o tempo todo, para que a placa não toque em nenhuma superfície. Na placa, os primeiros itens a serem montadas foram os padrões, que foram realizados em duplicatas e dispostos na placa, sendo os padrões nas duas primeiras colunas, depois colocou-se nos poços da curva padrão 25µL de Matrix, 25µL de cada padrão e 25µL de esferas (as quais anteriormente deve ter sido colocadas no vórtex por 30 segundos). Já nos poços das amostras previamente delimitados adicionou-se 25µL de tampão de ensaio, 25µL das amostras diluídas e 25µL das esferas que passaram previamente pelo vórtex por 30 segundos, na sequência selou-se a placa sem colocar pressão positiva, enrolou em papel alumínio com a tampa invertida e colocou-a em um prato em um agitador e agitou por 800rpm por 2 horas, posteriormente fez uma centrifugação da placa por 5 minutos a 1050 rpm usando um rotor de balde giratório com adaptador de microplaca, imediatamente após a centrifugação, despejou o sobrenadante sacudindo em movimento contínuo.

Em seguida, adicionou 200µl de tampão de lavagem em cada poço, agitou por 1 minuto a 800 rpm e centrifugou a placa por 5 minutos a 1050 rpm usando um rotor de balde giratório com adaptador de microplaca. Imediatamente após centrifugar despejou o sobrenadante sacudindo em movimento contínuo e secar a placa apenas 1 vez no papel

Posteriormente, adicionou 25µl de anticorpos de detecção em cada poço, selou a placa sem colocar pressão positiva, enrolar em papel alumínio com a tampa invertida, colocou o prato em um agitador, prendeu e agitar por 800rpm por mais 1 hora. Após isso adicionou 25µl da SA-PE em cada poço, selou novamente a placa sem colocar pressão positiva, enrolou em papel alumínio com a tampa invertida e colocou o prato em um agitador, prendeu e agitar por 800rpm por mais 30 minutos.

Após esse prazo, centrifugou a placa por 5 minutos a 1050 rpm usando um rotor de balde giratório com adaptador de microplaca e imediatamente após centrifugar, despejou o sobrenadante sacudindo em movimento contínuo, secou a placa apenas 1 vez no papel e drenou o líquido restante do poço com uma pipeta de 75µl tomando cuidado com o *pellet*. Por fim, adicionou 150µl de tampão de lavagem 1X e ressuspendeu as esferas com a pipeta para a leitura no citômetro de fluxo.

3.2.6 Citometria de fluxo

Nessa etapa as amostras das pacientes e a curva padrão montadas previamente foram passadas para tubos *ependorf* devidamente identificado, os quais foram encaminhados para fazer a leitura no citômetro de fluxo, com o objetivo de determinar a concentração dos analitos em questão. Para essa quantificação foram usados dois conjuntos das esferas (*beads*), que estavam conjugadas com um anticorpo específico biotinilado que serviram como esferas de captura com tamanhos diferentes e intensidade de fluorescência interna variada no citômetro. Para essa análise, os canais do citômetro que foram utilizados para detectar a fluorescência interna foram o FL3, FL4 ou APC, com isso a concentração dos analitos foram quantificadas pelo citômetro de fluxo e concentração de um analito específico é determinada com base em uma curva padrão conhecida usando o *software* de análise de dados *LEGENDplex*.

3.2.7 Análise no Software Legendplex:

Após a obtenção dos arquivos do citômetro de fluxo, utilizou-se o programa *Legendplex* para análise das concentrações dos treze analitos. Primeiramente inseriram-se os arquivos obtidos do citômetro de fluxo no programa *Legendplex* e realizaram-se as configurações básicas antes de fazer a quantificação das quimiocinas de cada paciente. Na plataforma do programa é mostrado para cada paciente 3 gráficos com eixos APC X PE, onde o primeiro se refere às duas esferas do experimento, e os demais são gráficos de cada esfera separadamente. É feito uma delimitação nas populações dos achados

referentes a cada quimiocina, e com base nessa delimitação, o programa quantifica a quantidade, em picogramas, de quimiocina referente à cada uma das 60 pacientes.

3.2.8 Análise estatística:

Através dos softwares IBM SPSS e do *GraphPad Prism 8*, foi realizado diversas análises estatísticas com os mais variados testes. Primeiramente efetuou-se a identificação e remoção dos *outliers* (Watson e Hoglin, 1976). Os mesmos foram definidos por método de *boxplot* (Diagrama de caixa), no qual pode-se determinar quais dados são *outliers* através de limites pré-definidos (-3+ 3). Após isso, realizou-se um teste de normalidade do banco de dados, para verificar se a distribuição dos dados é semelhante a uma curva gaussiana. Visto isso, foi possível decidir se irá adotar o uso dos métodos estatísticos paramétricos ou não paramétricos. Com as pacientes já agrupadas com a base nos parâmetros clínicos, realizou-se o teste de Mann-Whitney para dois grupos, teste de Kruskal-Wallis para três grupos ou mais. O teste de correlação de Spearman foi aplicado entre as quatro quimiocinas para averiguar se havia uma relação linear entre elas.

Além disso, foi realizado também uma recodificação das variáveis quimiocinas no programa SPSS de variáveis quantitativas para categóricas, baseando-se em um ponto de corte definido com base na mediana dos valores das quimiocinas como *status Low* para valores abaixo do ponto de corte e *status High* para valores acima do ponto de corte. A sobrevida global é utilizada para avaliar o tempo sobrevida de paciente em determinada doença, na qual, a causa do óbito pode ser a doença alvo ou doença secundária e a sobrevida livre de recorrência é uma análise de tempo de sobrevida livre de aparecimento de sintomas da doença de investigação. Sendo assim foram feitas construções de gráficos com as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de recorrência através do método de Kaplan-Meier com as pacientes agrupadas com base nos parâmetros clínicos, no qual a análise comparativa da sobrevida foi feita utilizando os testes de Log-rank. Além disso, foi realizado o teste de associação para avaliar se a distribuição da variável observada é diferente daquela esperada.

Para todos os testes, foram considerados estatisticamente significativos resultados com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas e clínico-patológicas

Primeiramente foi realizado uma análise sobre o perfil das pacientes envolvidas no estudo, no qual, com base nos dados obtidos, a idade das pacientes variou entre 34 à 83 anos de idade, tendo uma média de 56 anos, com desvio padrão de 12 anos, além disso, a média de IMC dentre elas foi de 31, tendo assim, um IMC indicando um quadro de obesidade. Das 60 pacientes, 57 delas possuíam a presença de infiltrados linfocitários, 44 já haviam atingido a menopausa e 33 delas eram não fumantes, tendo nesse grupo, uma predominância de baixos níveis plasmáticos das quimiocinas. Além disso, apenas 15% das pacientes possuíam metástases e 31,6% estavam submetidas a terapia neoadjuvante.

Posteriormente verificou como os dados referentes às concentrações das quimiocinas se comportam, através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Observou-se que a maioria dos dados não apresenta uma distribuição normal ($p > 0,05$), por isso, optou-se pela aplicação de testes não paramétricos nas análises estatísticas.

4.2 As quimiocinas estão correlacionadas entre si

Para verificar se existe uma correlação entre as quatro quimiocinas, foi realizado os testes estatísticos de Spearman. Observou-se que a maioria das quimiocinas possuem correlação uma com as outras ($p \leq 0,05$), sendo que apenas MIP -3alfa não apresentou correlação estatística com as demais quimiocinas (**Tabelas 1**).

Tabela 1: Teste de Correlação de Spearman entre as quatro quimiocinas. valores significativos para $p \leq 0,05$.

Correlações de Spearman						
			MCP-1	MIP-1alfa	MIG	MIP-3alfa
	MCP-1	ρ Spearman	1,000	,470	,528	,016
		Sig.	.	,000	,000	,911
		N	60	58	58	50
	MIP-1alfa	ρ Spearman	,470**	1,000	,619	,201
		Sig.	,000	.	,000	,172
		N	58	58	57	48
	MIG	ρ Spearman	,528**	,619	1,000	-,046
		Sig.	,000	,000	.	,752
		N	58	57	58	49
	MIP-3alfa	ρ Spearman	,016	,201	-,046	1,000
		Sig.	,911	,172	,752	.

	N	50	48	49	50
--	---	----	----	----	----

4.3 A predominância do subtipo molecular não se associa com a produção das quimiocinas

Para analisar se existe uma relação entre os subtipos moleculares e a produção das quatro quimiocinas, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis para verificar se existe diferença estatística entre as concentrações das quatro quimiocinas avaliadas das pacientes com os quatro subtipos moleculares de câncer. Não foi observado nenhum dado significativo ($p \leq 0,05$) quanto a esse parâmetro clínico sugerindo que o subtipo molecular não influencia na produção dessas quimiocinas (**Tabelas 2**).

Tabela 2: Teste de Kruskal-Wallis entre as quimiocinas e os quatro tipos moleculares, valores significativos para $p \leq 0,05$.

	Grupo	N	Mediana (pM)	Desvio padrão (pM)	Variância (pM ²)	p
MCP-1	Luminal A	19	254,46	123,60	15279,38	0,47
	Luminal B	20	231,676	162,12	26284,88	
	Triplo- negativo	13	215,58	199,31	39727,56	
	HER2	8	204,65	176,97	31318,61	
MIP-1alfa	Luminal A	18	178,43	167,77	28146,97	0,99
	Luminal B	20	143,45	7248,05	85,13	
	Triplo-negativo	12	157,74	97,51	9508,90	
	HER2	8	146,15	76,15	5799,72	
MIG	Luminal A	17	136,32	70,38	4954,11	0,58
	Luminal B	20	114,34	63,61	4047,12	
	Triplo-negativo	13	103,48	50,09	2509,19	
	HER2	8	92,99	36,36	1322,73	
MIP3-alfa	Luminal A	12	161,38	4676,18	21866672,19	0,62
	Luminal B	19	240,90	1868,75	3492239,70	
	Triplo-negativo	11	400,07	2063,89	4259643,51	
	HER2	8	65,24	1882,34	3543235,48	

4.4 O grau histológico da paciente não interfere na produção de quimiocinas

Para avaliar se os graus histológicos definidos como G1, G2, G3 e Microinvasor influenciam na produção das quimiocinas, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Com

base no resultado, o grau histológico não influencia na produção das quatro quimiocinas avaliadas (**Tabela 3**).

Tabela 3: Teste de Kruskal-Wallis entre grau histológico e as quatro quimiocinas, valores significativos para $p \leq 0,05$.

	Grupo Grau	N	Mediana (pM)	Desvio padrão (pM)	Variância (pM ²)	p
MCP-1	G1	9	245,04	20459,27	143,03	0,31
	G2	35	239,23	192,51	37062,33	
	G3	15	229,48	93,11	8670,87	
	Microinvasor	1	----	-----	----	
MIP-1alfa	G1	9	161,08	131,27	17232,34	0,23
	G2	33	174,37	120,59	14542,89	
	G3	15	119,69	66,42	4412,83	
	Microinvasor	1	----	----	-----	
MIG	G1	9	129,18	16,69	278,83	0,35
	G2	33	109,28	59,38	3526,99	
	G3	15	121,65	72,10	5198,95	
	Microinvasor	1	-----	-----	----	
MIP-3alfa	G1	6	1910,35	6032,20	36387474,78	0,39
	G2	29	225,83	1820,33	3313609,50	
	G3	14	85,67	1978,08	3912819,21	
	Microinvasor	1	-----	----	-----	

4.5 A responsividade ao receptor de estrógeno não se associa na concentração das quimiocinas

No presente estudo, pacientes foram agrupadas em pacientes estrógenos positivos e estrógenos negativos. Realizou-se o teste de Mann-Whitney para avaliar se a presença do receptor de estrógeno no tumor influencia na produção das quimiocinas. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para nenhuma das quimiocinas (**Tabela 4**).

Tabela 4 : Teste de Mann-Whitney entre receptores positivos e negativos para estrogênio e as quimiocinas, valores significativos para $p \leq 0,05$.

	Grupo ER	N	Mediana (pM)	Desvio padrão (pM)	Variância (pM²)	p
MCP-1	Positivo	45	233,65	174,83	30568,72	0,13
	Negativo	15	233,26	113,28	12832,89	
MIP-1alfa	Positivo	44	144,81	113,42	12864,48	0,91
	Negativo	14	146,15	107,49	11554,34	
MIG	Positivo	43	129,18	64,20	4122,20	0,54
	Negativo	15	99,19	42,97	1846,86	
MIP-3alfa	Positivo	37	88,46	1729,12	2989879,02	0,18
	Negativo	13	428,51	20507797,31	4528,55	

4.6 A presença de receptor HER2 não se associa na concentração das quimiocinas

As pacientes foram agrupadas em dois grupos, pacientes com receptor HER2 positivo e pacientes com receptor HER2 negativo, e em seguida foi realizado o teste de Mann-Whitney entre esses dois grupos definidos e com as quatro quimiocinas. No resultado, observou-se que a diferença na concentração das quimiocinas não foi significativa (**Tabela 5**).

Tabela 5 : Teste de Mann-Whitney entre receptorer HER2 e as quimiocinas, valores significativos $p \leq 0,05$.

	Grupo HER2	N	Mediana (pM)	Desvio padrão (pM)	Variância (pM²)	p
MCP-1	Positivo	7	274,44	172,97	29918,78	0,23
	Negativo	53	229,78	160,03	25612,21	
MIP-1alfa	Positivo	7	146,17	73,40	5388,79	0,67
	Negativo	51	144,13	116,26	13517,02	
MIG	Positivo	7	120,99	42,97	1847,09	0,97
	Negativo	51	112,39	62,84	3948,90	
MIP-3alfa	Positivo	7	75,45	1983,76	3935334,00	0,62
	Negativo	43	161,38	2883,79	8316283,53	

4.7 As pacientes em menopausa possuem não produzem mais quimiocinas comparados com aquelas que ainda não atingiram a menopausa

Pacientes que atingiram a menopausa podem ter aumento significativo das quimiocinas, por isso aplicou-se teste estatístico Mann-Whitney comparando as pacientes que atingiram ou não a menopausa. Observou-se que nenhuma diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) foi encontrada quando comparado esses dois grupos de pacientes (Tabela 6).

Tabela 6: Teste de Mann-Whitney com variável agrupamento a menopausa, avaliando com as quatro quimiocinas, valores significativos para $p \leq 0,05$.

	Grupo Menopausa	N	Mediana (pM)	Desvio padrão (pM)	Variância (pM²)	p
MCP-1	Sim	44	254,46	173,80	30209,12	0,29
	Não	16	210,75	59,00	3481,42	
MIP-1alfa	Sim	44	146,14	82,18	6754,95	0,97
	Não	14	144,13	174,66	30509,30	
MIG	Sim	44	114,34	44,81	2008,21	0,75
	Não	14	92,32	97,21	9449,95	
MIP-3alfa	Sim	37	95,89	3033,29	9200895,45	0,38
	Não	13	161,38	1466,27	2149966,08	

4.8 A evolução do estadiamento clínico não se associa na concentração das quimiocinas

Foi realizado o teste de Mann-Whitney entre dois grupos de pacientes em estadiamentos clínicos previamente definidos como inicial e avançado e com as quatro quimiocinas. Com base nos resultados, não houve diferença estatisticamente significativa em relação estadiamento clínico para nenhuma das quatro quimiocinas envolvidas (Tabela 7).

Tabela 7: Teste de Mann-Whitney, estadiamento clínico e quimiocinas, valores significativos para $p \leq 0,05$.

	Grupo Estadiamento	N	Mediana (pM)	Desvio padrão (pM)	Variância (pM²)	p
MCP-1	Inicial	37	250,30	171,85	29535,45	0,95
	Avançado	19	228,54	86,52	7487,16	
MIP-1alfa	Inicial	35	176,40	96,38	9289,32	0,25
	Avançado	19	128,36	136,09	18523,13	
MIG	Inicial	35	117,66	40,40	1632,79	0,76
	Avançado	19	105,79	82,87	6868,83	
MIP-3alfa	Inicial	28	119,38	3379,95	11424081,62	0,92
	Avançado	18	118,41	1810,98	3279682,74	

4.9 Variação da concentração de MIG está associada com mutação de p53

Foi analisada a associação entre baixa e alta concentração das quimiocinas e a positividade para a mutação em p53. Os testes demonstram que existe uma diferença significativa entre os grupos perante a MIG e que entre os pacientes com alta concentração de MIG, 77,4% são negativos para p53 e 22,6% são positivos para p53 (Tabela 8, 9 e 10).

Tabela 8: Teste de Mann-Whitney entre mutação de p53 e quimiocinas, valores significativos para $p \leq 0,05$.

	Grupo p53	N	Mediana (pM)	Desvio padrão (pM)	Variância (pM ²)	p
MCP-1	Positivo	23	219,15	211,52	44742,10	0,93
	Negativo	37	253,80	123,42	15233,35	
MIP-1alfa	Positivo	22	143,79	74,87	5606,09	0,29
	Negativo	36	152,56	126,73	16062,71	
MIG	Positivo	23	94,47	57,39	3294,04	0,03
	Negativo	35	135,28	59,85	3582,12	
MIP-3alfa	Positivo	19	441,55	1998,53	3994133,31	0,30
	Negativo	31	78,74	3161,31	9993900,56	

Tabela 9: Teste de qui-quadrado entre Low/High de MIG e p53, os valores significativos para $p \leq 0,05$.

		p53	
		Positivo	Negativo
LowHighMIG			
	% em Low MIG	55,2%	44,8%
	% em High MIG	22,6%	77,4%
	% em LowHigh MIG	38,3%	61,7%

Tabela 10: Tabulação cruzada entre Low/High de MIG e p53, os valores significativos para $p \leq 0,05$.

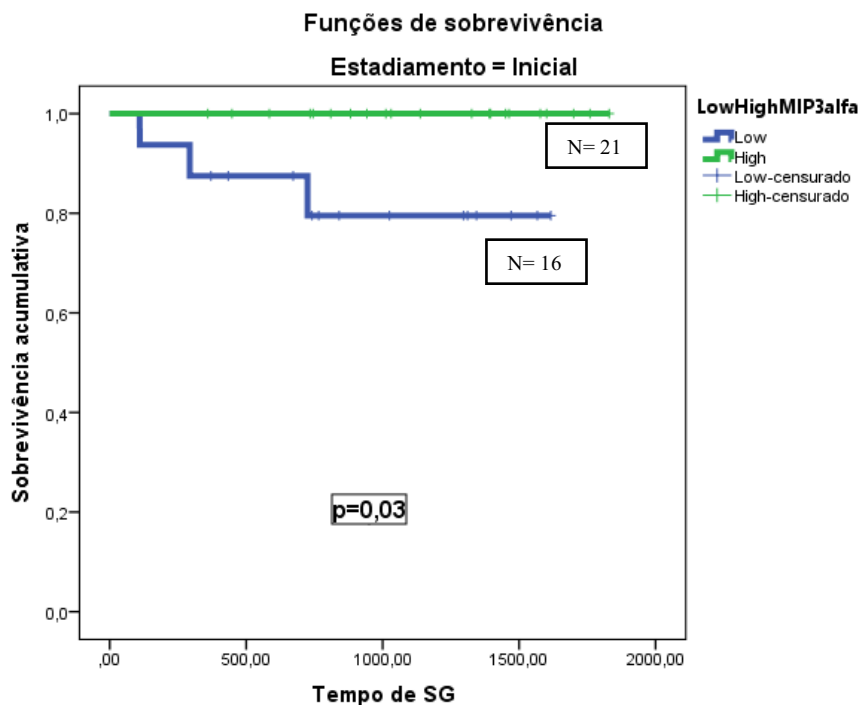
	Valor	Significância
Qui-quadrado de Pearson	6,733 ^a	,009

4.10 Pacientes com alta concentração de MIP-3alfa sobreviveram mais

Baseando-se no método de Kaplan-Meier, foi construído as curvas de sobrevida de pacientes do estadiamento inicial e do estadiamento avançado, relacionando essas duas categorias com altos e baixos valores das concentrações de MIP-3alfa previamente

definidos. Observou-se uma diferença significativa na análise obtida pelo Teste de Log-rank no estadiamento inicial com relação a MIP-3alfa (**Figura 1**).

A)



B)

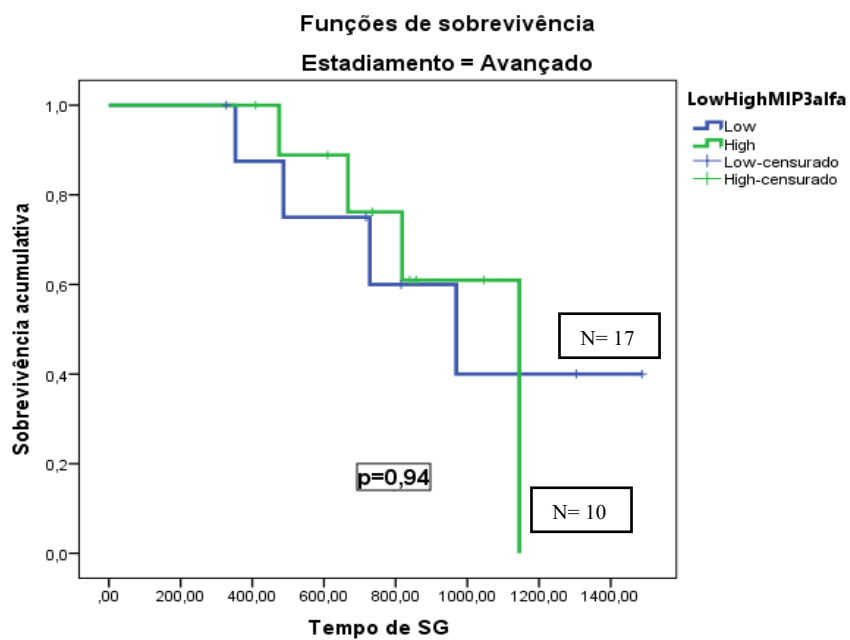


Figura 1: Gráficos A e B das curvas de sobrevida (Dias) de pacientes em estadiamento inicial e avançado em função do ponto de corte dos valores das concentrações de MIP-3alfa. Valores altos (linha verde, N=21) e baixos (linha azul, N=16) do estadiamento inicial e valores altos (linha verde, N=10) e baixos (linha azul, N=17) do estadiamento avançado

4.11 Pacientes com alta concentração de MIG tiveram maior sobrevida livre de recorrência

Verificou-se se as diferentes concentrações das quatro quimiocinas influenciam na sobrevida livre de recorrência entre os diferentes subtipos moleculares de câncer. Observou-se através da análise feita pelo Teste de Log-rank, que no subtipo luminal B, existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) na sobrevida das pacientes com altas concentrações de MIG é maior comparando com a sobrevida das pacientes com baixas concentrações da mesma (Figura 2).

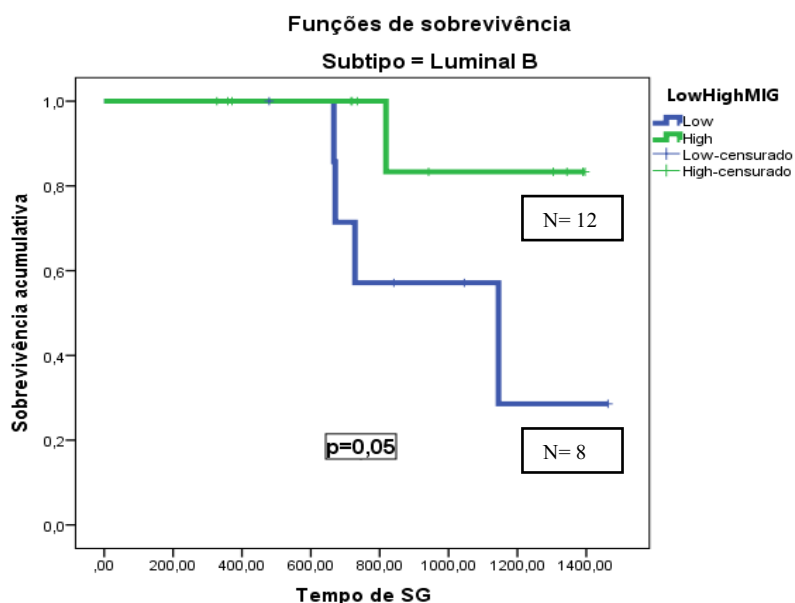


Figura 2: Gráfico da curva de sobrevida livre de recorrência (Dias) entre pacientes do subtipo molecular luminal B em função do ponto de corte que define altos (linha verde, N=12) e baixos (linha azul, N=8) valores das concentrações de MIG.

4.12 Pacientes com alta concentração de MCP-1 sobrevivem menos

Analisou-se as quatro quimiocinas perante os dois grupos de pacientes, previamente definidos em *Low* e *High*, através de um ponto de corte pré-determinado. O teste de Log-rank apontou significância, demonstrando que as pacientes categorizadas como grupo *High* MCP-1 sobrevivem menos comparado com as pacientes consideradas como grupo *Low* MCP-1 (Figura 3).

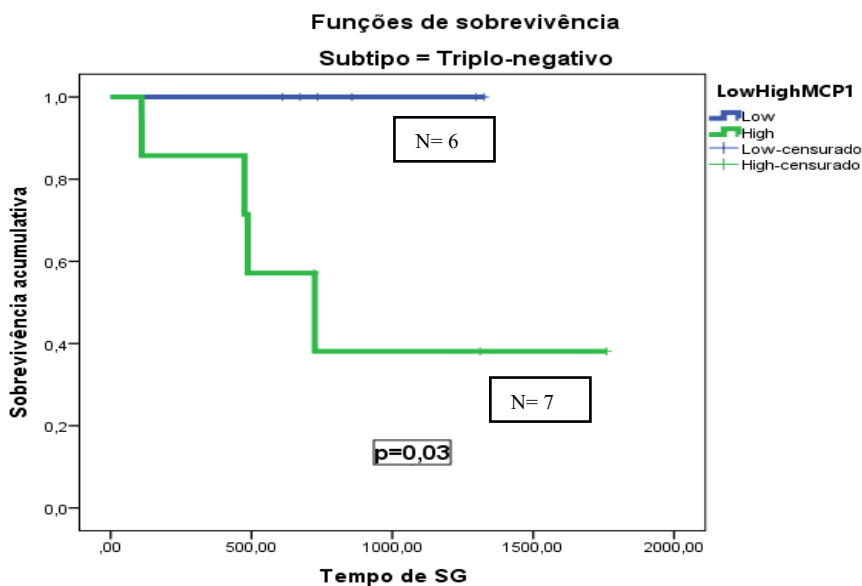


Figura 3: Gráfico da curva de sobrevivência global (Dias) das pacientes com subtipo triplo-negativo em função do ponto de corte que define altos (linha verde, N=7) e baixos (linha azul, N=6) valores das concentrações de MCP-1. O valor de p significativo ($p \leq 0,05$).

4.13 Pacientes grau 3 com alta concentração de MIP-1alfa sobrevivem menos

Realizou-se através dos testes de Log-rank a análise das curvas de sobrevivência entre as pacientes com grau 3 comparado aos *status* baixo e alto de MIP-1alfa. As pacientes consideradas com *status* alto de MIP-1alfa, sobreviveram menos em relação às pacientes com *status* baixo de MIP-1alfa (**Figura 4**).

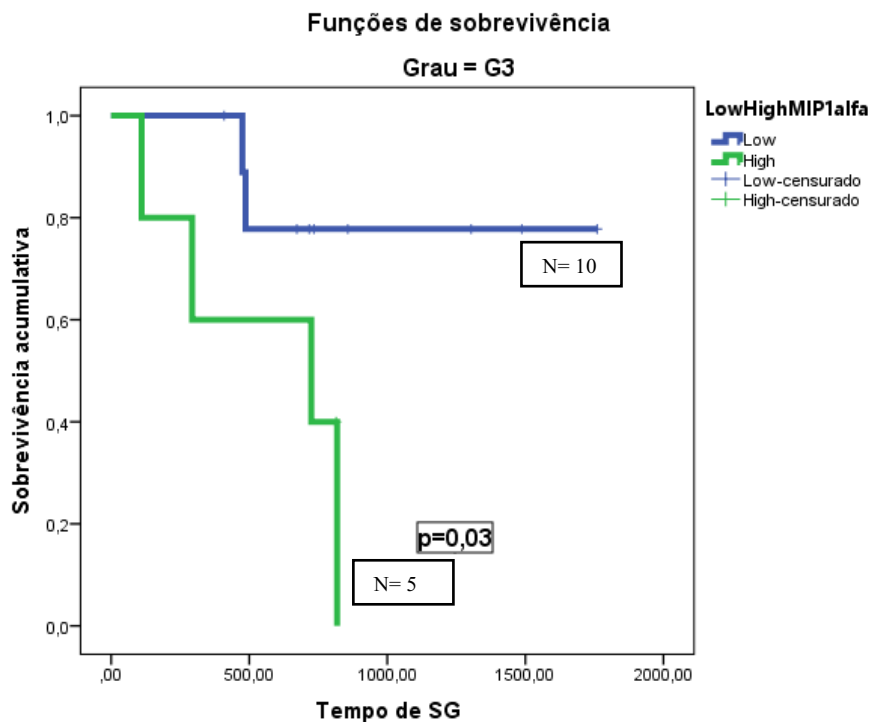
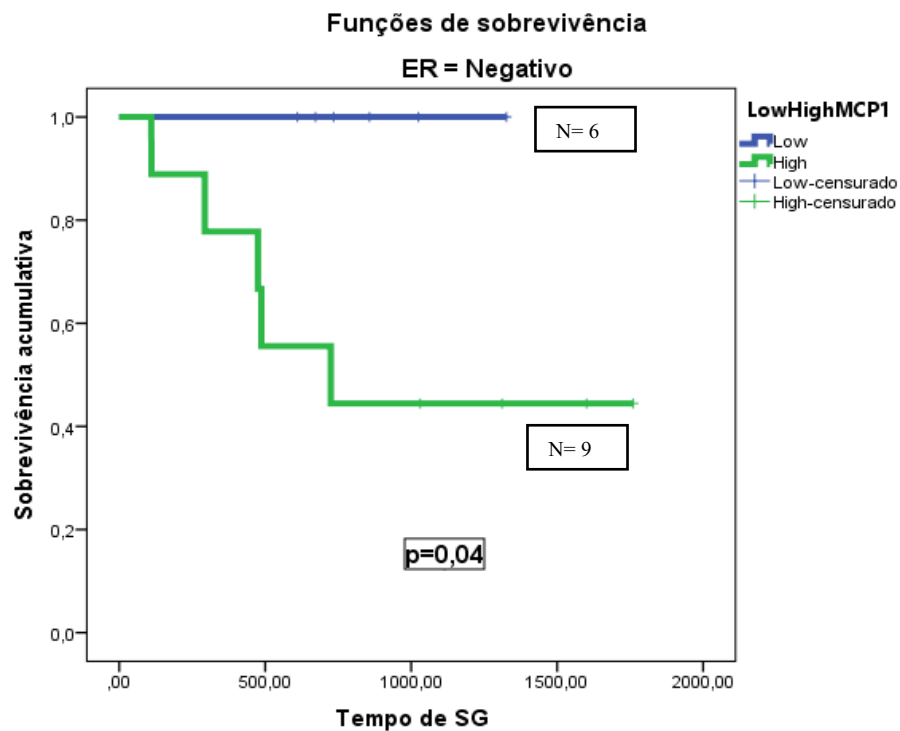


Figura 4: Gráfico da curva de sobrevida global (Dias) entre pacientes com grau 3 em função do ponto de corte que define altos (linha verde, N=5) e baixos (linha azul, N=10) valores das concentrações de MIP-1alfa. O valor de p significativo ($p \leq 0,05$).

4.14 Pacientes ER negativo com altas concentrações de MCP-1 e MIG vivem menos

Para avaliar se existia uma diferença na sobrevida entre as pacientes positivo e negativo para receptor de estrógeno com relação as quimiocinas, foi realizado uma análise pelo teste de Log-rank. Observou-se uma diferença significativa entre pacientes com altos e baixos níveis plasmáticos de MPC-1 ($p= 0,04$) e MIG ($p=0,004$) no subgrupo ER negativo (**Figura 5**).

A)



B)

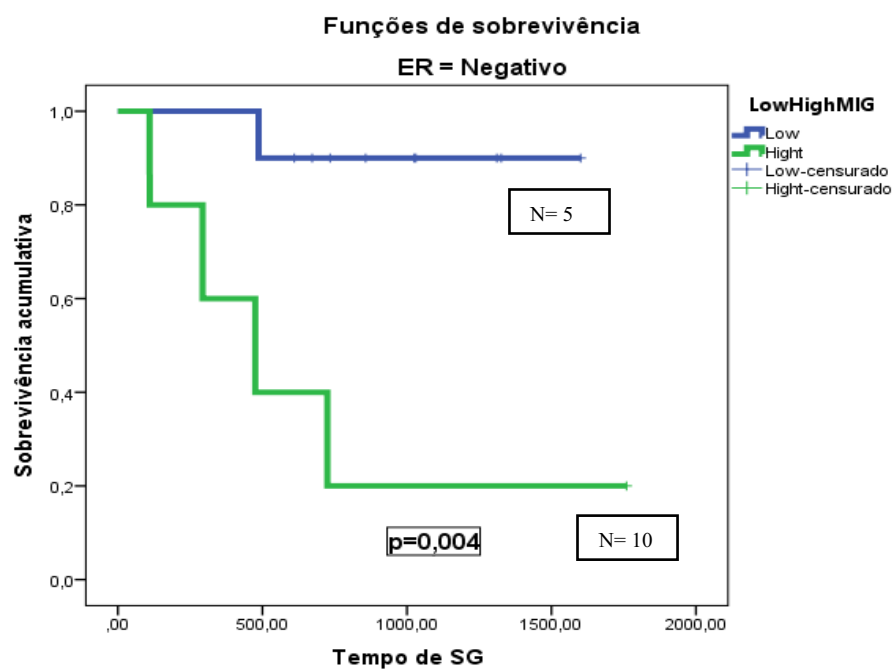
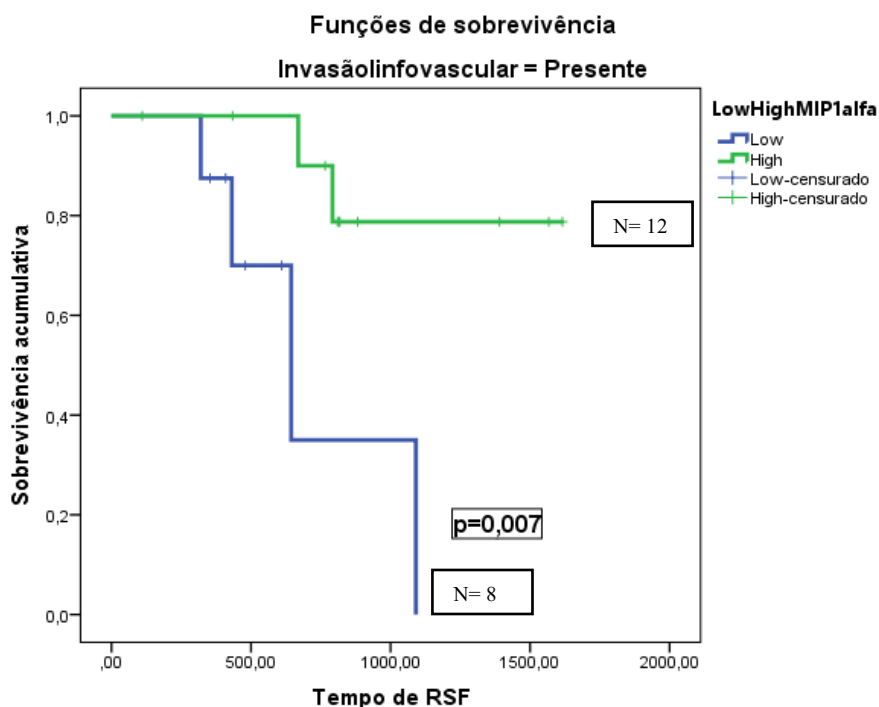


Figura 5: Gráficos A e B das curvas de sobrevida global (Dias) entre pacientes com receptor de estrógeno negativo em função do ponto de corte que define altos (linha azul, N=6) e baixos (linha verde, N=9) valores das concentrações de MCP-1 e de pacientes receptor de negativo em função do ponto de corte dos valores das concentrações de MIG entre valores altos (linha verde, N=5) e baixos (linha azul, N=10) das pacientes ER negativo. O valor de p significativo ($p \leq 0,05$).

4.15 Pacientes com invasão linfovascular com alta produção de MIP-1Alfa têm maior sobrevida livre de recorrência

Foi realizado uma construção de curvas de sobrevida através do método de Kaplan-Meier da relação entre pacientes com e sem invasão linfovascular com os dois grupos de diferentes *status* da concentração de MIP-1alfa. Observou-se, através do Log-rank, que pacientes com invasão linfovascular apresentaram dado significativo ($p= 0,007$) quando analisado entre pacientes com altas e baixas concentrações de MIP-alfa, revelando melhor sobrevida livre de recorrência nessas pacientes (**Figura 6**).

A)



B)

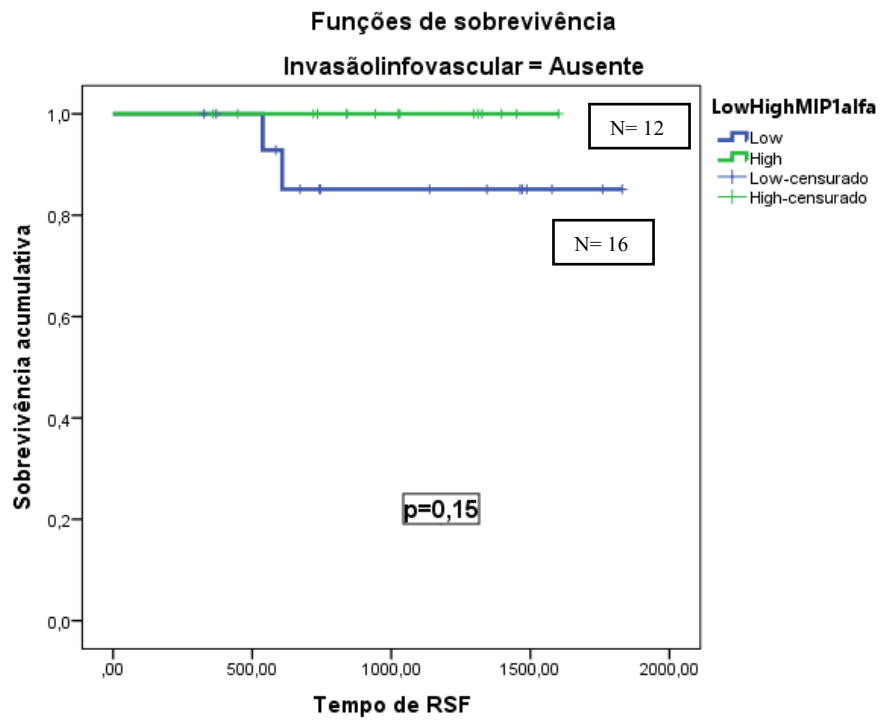


Figura 6: Gráficos A e B das curvas de sobrevida livre de recorrência (Dias) de pacientes com e sem invasão linfovascular em função do ponto de corte dos valores das concentrações de MIP-1alfa. Valores altos (linha verde, N=12) e baixos (linha azul, N=8) das pacientes com invasão e valores altos (linha verde, N=12) e baixos (linha azul, N=16) das pacientes sem invasão. O valor de p significativo ($p \leq 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A função da quimiocina é crítica para a mediação do tráfego de células imunes e desenvolvimento das mesmas (ROT; VON ANDRIAN, 2004b), desde a migração necessária para o desenvolvimento e homeostase das células imunológicas, até a necessidade para geração de respostas imunes celulares e humorais primárias (GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014). É de suma relevância tentar estabelecer relações entre esse biomarcador, que é a quimiocina, com indicadores de prognóstico de pacientes portadoras do câncer de mama.

Neste presente estudo, avaliou-se as variações nas concentrações de quatro quimiocinas, associando-as à vários parâmetros clínicos patológicos, como os diferentes subtipos moleculares de câncer de mama, diferentes graus histológicos, estádios clínicos, que podem assim, acabar estabelecendo uma relação relevante para a clínica. Por exemplo, se a presença dessas quimiocinas concomitante com a presença de outros elementos dos processos celulares como infiltrados leucocitários, mutação da proteína p53, presença de metástases, dentre outros, podem explicar as diferenças nas sobrevidas das pacientes.

A literatura busca estabelecer uma possível correlação entre estado clínico das pacientes com fatores clínicos das mesmas. Um desses estudos, tentou verificar se existe uma associação entre a ocorrência de um polimorfismo genético de quimiocina e o risco de câncer de mama, no qual concluíram que a quimiocina MIP-1beta pode ser um marcador de diagnóstico e alvo terapêutico para a terapia do câncer de mama (HU et al., 2018). Já em outra abordagem, analisaram uma correlação entre a expressão gênica de doze quimiocinas e fatores clínicos patológicos, onde constataram que os escores de quimiocinas foram associadas à formação de linfonodos ectópicos em tumores de mama (PRABHAKARAN et al., 2017). Neste presente estudo, tentou-se verificar se essas relações podem ser encontradas entre quatro quimiocinas dosadas e o conjunto de parâmetros clínico-patológicos das pacientes envolvidas no estudo.

As quimiocinas não só estão associadas ao estabelecimento de um microambiente tumoral e metástase, mas também medeiam a progressão do câncer (PALACIOS-ARREOLA et al., 2014b). Como várias quimiocinas fazem parte desse processo, neste presente estudo, avaliou-se a correlação entre as quatro quimiocinas, e observou-se que a quimiocina MCP-1 foi correlacionada positivamente com MIP-1alfa ($p=0,0001$) e MIG($p=0,0001$). Em outro estudo, observaram uma correlação entre altas concentrações

de MIP-3 alfa e extensa proliferação celular (MARSIGLIANTE; VETRUGNO; MUSCELLA, 2013). Já em outro estudo, MCP-1 foi correlacionada a um aumento do recrutamento de monócitos, e isso foi associado a um prognóstico adverso em câncer de mama, câncer gástrico e câncer esofágico(YANG et al., 2020). No estudo presente as quimiocinas revelaram uma correlação moderada entre si, isso mostra que elas poderiam explicar o fato do aparecimento de processos inflamatórios intensos, podendo esses processos, serem fruto de ações dessas quimiocinas em conjunto, considerando que as mesmas estão envolvidas em processos inflamatórios, como aponta vários estudos (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; MUKAIDA; SASAKI; BABA, 2014). Ademais, pelo fato dessas pacientes possuírem quimiocinas com diferentes funções imunobiológicas e diferentes concentrações séricas, torna essa investigação neste presente estudo bastante relevante para a clínica.

A menopausa, período estabelecido pelo fim da reprodutividade da mulher, está associada às importantes alterações fisiológicas e imunológicas (GHOSH; RODRIGUEZ-GARCIA; WIRA, 2014). O declínio na produção de estrogênio associado ao envelhecimento em mulheres, tem sido relacionado às mudanças importantes na população de células e na expressão de citocinas (TANEJA, 2018). Mas, muito se sabe que após a menopausa, quimiocinas e muitos outros fatores do contexto imunobiológico se alteram (ABU-TAHA et al., 2009; SIVRO et al., 2013). Em estudos onde pretendiam determinar o efeito da menopausa na expressão sistêmica das citocinas e quimiocinas estudadas, descobriram que os níveis plasmáticos de MIG e MCP-1 foram significativamente maiores em mulheres em pós-menopausa, sugerindo uma potencial regulação hormonal dessas citocinas (SIVRO et al., 2013). Já nesse presente trabalho, a mesma abordagem foi feita, mas nenhuma das quimiocinas envolvidas demonstraram dados significativos perante o fator menopausa. No entanto, outro trabalho que buscou também avaliar os níveis circulantes de quimiocinas, mostrou que as quimiocinas MCP-1, MCP-3 e GRO-alfa não revelaram dado significativo quanto a questão da menopausa, devido ao baixo número de participantes do estudo (ABU-TAHA et al., 2009) . Isso poderia explicar a ausência de dados significativos no presente estudo, já que o número de participantes também é baixo.

Os efeitos do estrogênio no sistema imunológico e na resposta imunológica são complexos e muitos trabalhos tentam averiguar se a presença ou ausência de receptores podem direcionar a terapia ideal para cada paciente. Foi demonstrado que a quimiocina IL-8 é regulada positivamente em tumores ER + e PR +, nos quais esses estudos sugerem

que essa quimiocina tem sua contribuição na invasão de células do câncer de mama, angiogênese e metástase (LIN et al., 2004; VAZQUEZ-MARTIN; COLOMER; MENENDEZ, 2007). Já outro estudo, feito com tecido murino, demonstram que a quimiocina MIG tem uma expressão dependente do receptor de estrogênio e progesterona, nos quais, estes reduzem significativamente a expressão de MIG (FANTI et al., 2003). Porém, o resultado do presente estudo não corrobora com esse achado, em vista que não se verificou significância ($p < 0,05$) para nenhum dos receptores, contudo a dosagem das quimiocinas foi feita através do soro das pacientes, isso difere de outros estudos no qual mensuraram as quimiocinas por meio de avaliação da expressão em amostra de tecido tumoral. Entretanto, em outros estudos, as quimiocinas IL-8 e GRO-alfa, duas quimiocinas que favorecem a metástase tumoral, demonstram significância na comparação entre pacientes receptor HER2 positivo e HER2 negativo, na qual o grupo HER2 positivo tiveram uma maior produção (CHAVEY et al., 2007; VAZQUEZ-MARTIN; COLOMER; MENENDEZ, 2007).

Em um estudo anterior, foi demonstrado a prevalência de MIG / CXCL9 , na qual essa quimiocina apresentou altos níveis plasmáticos em câncer de mama triplo-negativo (NARITA et al., 2016). Sendo assim, se existir uma prevalência de quimiocinas como a MIG em um subtipo molecular, poderia explicar o aparecimento dos intensos processos inflamatórios presentes nas pacientes, e ainda criar uma terapia mais direcionada. Valendo ressaltar que, essas quimiocinas intensificam o processo metastático, que acaba agravando o quadro clínico da paciente (BEN-BARUCH, 2009; ROT; VON ANDRIAN, 2004b; ZLOTNIK; YOSHIE, 2000).

O grau histológico é uma avaliação do grau de diferenciação celular e do nível da proliferação, refletindo assim, a agressividade do tumor (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010). No atual estudo, avaliou-se a relação dos quatro diferentes graus com as quatro quimiocinas, contudo, nenhum dado significativo foi observado. Entretanto, em estudos anteriores, em uma análise com várias quimiocinas, dentre elas, a MCP-1, que também é foco do presente estudo, demonstram resultados relevantes quando comparado a um grau mais alto de carcinoma (NARITA et al., 2016). Além disso, em outros estudos, as quimiocinas IL-8, IL-6 e MIP-1beta que, assim como as quimiocinas do presente estudo, são também quimiocinas pró-inflamatórias, também foram correlacionadas com o grau histológico (BENOY et al., 2004; CHAVEY et al., 2007). Isso revela que a atividade proliferativa de células evidenciada em graus histológicos pode ter contribuição dessas quimiocinas, que acabam favorecendo essa proliferação celular.

A análise de sobrevida de pacientes com câncer de mama com menção aos fatores como idade, estágio, presença de nódulo, tamanho do tumor, marcadores imunohistoquímicos como ER, PR, HER2, presença de mutação na proteína p53 já foram feitos em estudos no Brasil (MENDONÇA; SILVA; CAULA, 2004; SCHNEIDER; D'ORSI, 2009). Análise de sobrevida é considerado um parâmetro útil para avaliar os resultados do diagnóstico e tratamento de um tumor maligno (AYALA et al., 2019; COLEMAN et al., 2008). Alguns estudos afirmam que diversos parâmetros clínicos, como estadiamento é um dos fatores que influencia o prognóstico, e conseqüentemente a sobrevida das pacientes (BALABRAM; TURRA; GOBBI, 2013; DE FREITAS JÚNIOR et al., 2017). Já outro estudo aponta que a metástase, é a principal responsável pela redução da sobrevida de paciente com câncer de mama ER negativo (ALI; LAZENNEC, 2007). Diante disso, é de suma importância avaliar a diferença de sobrevida entre diferentes grupos de pacientes com câncer de mama com relação à produção das quimiocinas.

Em um estudo sobre a relação da concentração de RANTES/CCL5, uma quimiocina pró-inflamatória, e a sobrevida global de pacientes, observaram que as pacientes com altas concentrações de RANTES tinham maior sobrevida global, associando essa quimiocina a um bom prognóstico (FUJIMOTO et al., 2020). Já no atual estudo, as quimiocinas MCP-1, MIG e MIP-3alfa, que também são pro-inflamatórias e na quais as duas primeiras possuem funções similares como a quimiotaxia de leucócitos para o local da inflamação, revelaram dados semelhantes quando analisadas com alguns parâmetros clínicos como estadiamento, resposta a um receptor específico, grau de diferenciação, dentre outros, sendo possível associar essas quimiocinas a um bom prognóstico, estando ciente que efeitos imunológicos e outros fatores possam estar também envolvidos.

Dentre essas análises de sobrevida, realizou-se uma observação sobre o subtipo molecular triplo negativo, apontado pelos dados na literatura, como o subtipo molecular com o pior em prognóstico (ROMERO-MORENO et al., 2019). Nos resultados do presente estudo, o subtipo molecular triplo-negativo demonstrou ser o grupo de menor sobrevida, em comparação aos demais subtipos moleculares. Um estudo anterior envolvendo as quimiocinas MIG e BCA-1 e sobrevida global e sobrevida livre de doença, observaram que cada uma delas foram associadas a um prognóstico bom para subtipos de câncer diferentes, mostrando que as quimiocinas podem ser associados a um subtipo molecular específico (RAZIS et al., 2020). No presente estudo, identificou-se que nos triplo-negativos, a maioria das pacientes possuem altas concentrações de MCP-1 que

estão correlacionadas com às metástases. Isso poderia justificar a menor sobrevida desse grupo entre as pacientes com altas concentrações de MCP-1 uma vez que essa quimiocina é considerada como um mediador inflamatório pró-canceroso proeminente, particularmente no câncer de mama (BORSIG et al., 2014; CONTI; ROLLINS, 2004). A MCP-1 contribui para o processo metastático no câncer de mama, sendo essas metástases responsáveis pela maior causa de morte por câncer (HAJIHOSSEINI; FARADMAL; SADIGHI-PASHAKI, 2015; ZHANG et al., 2012).

As células normais e algumas células cancerígenas da mama possuem receptores que se ligam ao estrogênio e ao progesterona e dependem desses hormônios para se desenvolverem (LANGE; YEE, 2008; YUE et al., 2010). Porém, já foi evidenciado através de trabalhos anteriores que a presença do receptor de estrogênio ou de progesterona, associado com uma terapia endócrina fornece benefícios para as pacientes, como a redução de recorrência da doença e uma boa resposta na terapia neoadjuvante (KASAMI et al., 2008; SILVA et al., 2019; THOMPSON et al., 2010). Quando um estudo anterior pretendeu analisar a sobrevida referente às pacientes que apresentam o receptor de estrógeno, progesterona e HER2 perante às pacientes com diferentes níveis plasmáticos da quimiocina RANTES, observa-se uma discrepância na sobrevida entre as pacientes que possuem altas concentrações de RANTES comparado ao grupo que possui baixas concentrações da mesma (FUJIMOTO; KOIFMAN; DA SILVA, 2019). No presente estudo observou-se que, com base na avaliação da sobrevida dentro de cada um dos dois grupos pacientes perante ao receptor de estrógeno, há uma diferença significativa na sobrevida dentro grupo ER negativo, quando foi comparado o subgrupo de pacientes ER negativo que possuem baixas concentrações de MCP-1 e MIG e o subgrupo de pacientes ER negativo que possuem altas concentrações das mesmas, na qual, este último, demonstrou menor sobrevida. A capacidade de desenvolver o processo metastático, que acaba agravando o quadro clínico, é proporcionado pelas quimiocinas MIG e MCP-1, com base nos trabalhos publicados na literatura (JOYCE; POLLARD, 2009). Com isso, a menor sobrevida observada no grupo ER negativo com altas concentrações de MIG e MCP-1 pode ser devido ao efeito pró-tumoral desencadeado pelas mesmas.

A análise de sobrevida baseada em pacientes com tumores positivo e negativos para progesterona, também foi realizada no presente estudo. Resultados semelhantes à análise do receptor de estrógeno foram obtidos, na quais as quimiocinas MCP-1 e MIG também demonstraram dados significativos quando avaliou a sobrevida dentro do grupo de pacientes com tumor negativo para receptor de progesterona. Mas vale ressaltar que o

progesterona pode ter funções contraditórias, pois estudos já comprovaram que a ação do progesterona pode ter ação inibitória ou estimulatória na proliferação celular, dependendo, segundo alguns trabalhos, do contexto biológico (GROSHONG et al., 1997; LANGE; RICHER; HORWITZ, 1999). Com base nisso, a razão dos achados referentes a sobrevida de pacientes responsivas e não responsivas para progesterona pode ser sustentada na ação das quimiocinas juntamente com os efeitos da progesterona.

O estadiamento clínico no câncer de mama é definido somando um conjunto de fatores importantes, como presença de metástase nos linfonodos, presença de nódulos, tamanho anatômico do tumor, dentre outros.(KOH; KIM, 2019b). No presente estudo, foi categorizado o estadiamento das pacientes em estadiamento inicial e estadiamento avançado, e notou-se que independente do estadiamento, a concentração de quimiocinas não se alteram. Além disso, na análise de sobrevivência, a sobrevida das pacientes em estadiamento avançado foi menor comparado com a sobrevida das pacientes em estadiamento inicial. Porém, quando foi realizada a análise de sobrevida desses dois grupos separadamente e baseando-se nos *status Low e Hight* das quatro quimiocinas, os dados mostram que apenas a quimiocina MIP-3alfa revelou dados significativos e somente na sobrevida das pacientes em estadiamento inicial, mostrando que pacientes em estadiamento inicial com alta concentração de MIP-3alfa têm maior sobrevida com relação às pacientes com baixas concentrações da mesma. Portanto, é possível que essa menor sobrevida do grupo com altas concentrações de MIP-3alfa no estadiamento inicial seja devido ao efeito que essa quimiocina desencadeia no contexto tumoral, pois já é relatado que quando ela se liga ao seu receptor CCR6, a mesma consegue recrutar células dendríticas que expressam esse receptor em tecidos epiteliais e a infiltração dessas células em tumores ou estroma circundante está associada ao mau prognóstico (LE BORGNE et al., 2006; TREILLEUX et al., 2004).

A avaliação do grau histológico na clínica visa analisar a agressividade do tumor devido a sua capacidade de fornecer informação para o prognóstico (RAKHA et al., 2010). As análises de sobrevida referentes aos graus histológicos são relevantes, já que este, é considerado um importante determinante para o desfecho no câncer de mama (RAKHA et al., 2010). Na abordagem atual, a análise de sobrevida envolvendo pacientes com diferentes graus foi realizada, na qual, as pacientes de grau 3 demonstraram dados significativos quando avaliou a sobrevida dessas pacientes, analisando os dois diferentes subgrupos desse grupo de pacientes de grau 3, definidos pela diferença na concentração quimiocina MIP-1alfa, o *Low* e o *Hight*. Foi mostrado que pacientes do grau 3 com altas

concentrações de MIP-1alfa têm uma redução na sobrevida comparado às pacientes com baixas concentrações da mesma. Considerando que o aumento do grau histológico se refere ao estado em que as células possuem pouca diferenciação e se disseminam de forma agressiva, torna-se assim, o quadro clínico mais crítico (ALEXANDER et al., 2005; RAKHA et al., 2010). Com isso, associando essa condição das pacientes de grau histológico 3 e com a presença de altas concentrações de uma quimiocina pró-inflamatória, como a MIP-1alfa, é possível observar que essa menor sobrevida pode estar relacionada a essas duas condições clínicas.

Nesta abordagem atual, quando a análise de sobrevida foi realizada partindo do subtipo molecular, as pacientes com subtipo molecular triplo-negativo demonstraram significância quando análise foi baseada comparando o grupo de pacientes triplo-negativo com altas concentrações de MCP-1 e o grupo de pacientes triplo-negativo com baixas concentrações da mesma, mostrando que pacientes triplo-negativo com altas concentrações de MCP-1 vivem menos. Ressaltando que, essa quimiocina proporciona a quimioatração principalmente de neutrófilo, um importante leucócito que atua na ativação e regulação de resposta inata do sistema imune(LAVENDER et al., 2017). Entretanto, já se sabe que, o neutrófilo atua também na progressão e disseminação de vários tipos de tumores, tendo assim um fenótipo tumorigênico conhecido como neutrófilo N2 (GALDIERO et al., 2013). Com isso, pode-se afirmar que, as altas concentrações de MCP-1 podem ser um fator que pode implicar no desempenho do tratamento nessas pacientes portadoras do câncer de mama. Muitos estudos anteriores já apontaram que o triplo negativo é um dos cânceres de mama mais agressivos e com base na imunohistoquímica, é negativo para o receptor de estrogênios (ER), negativo para o receptor de progesterona (PR) e negativo para o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)(PEROU, 2011). O achado do presente estudo é um elemento biológico a mais que pode corroborar para menor sobrevida dessas pacientes portadoras do subtipo molecular triplo-negativo.

O tecido mamário expressa geralmente baixos níveis de concentrações de quimiocinas, porém nos tecidos cancerosos, esses níveis acabam se alterando e ficando extremamente altos. Além das quimiocinas, outros elementos acabam sofrendo alterações no contexto celular, dentre eles, a proteína p53(VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). Diante disso, analisou se os diferentes níveis plasmáticos das quimiocinas MIG, MIP-1alfa, MIP3-alfa e MCP-1, poderiam estar concomitantemente presentes com alterações de outros elementos ou processos biológicos, como a mutação da proteína p53. Com base

nos resultados obtidos, observou-se que variações na concentração da quimiocina MIG foram associados com presença de mutações na proteína p53, sendo que pacientes com altas concentrações de MIG revelaram ter 6,77 vezes mais chances de apresentarem mutação da proteína do que pacientes com baixas concentrações de MIG. Esse achado é consistente, já que estudos anteriores apontam que a proteína p53 tem capacidade de regular quimiocinas como a MCP-1, que possui a capacidade de atrair e ativar linhagens de macrófagos, demonstrando assim, uma atividade antitumoral (FARNEBO; BYKOV; WIMAN, 2010; TRAVÉS; LUQU; HORTELANO, 2012).

O parâmetro clínico estadiamento é um fator do prognóstico que reflete na sobrevida de pacientes com câncer de mama (HÖFELMANN; DOS ANJOS; AYALA, 2014; SANT et al., 2003; XING et al., 2015). Diante disso, foi também analisado perante às quimiocinas, no qual nenhuma das quatro quimiocinas revelaram dados significativos na análise entre os dois grupos de pacientes definidos como estadiamento inicial e estadiamento avançado. Porém, quando foi avaliado a sobrevida no subgrupo específico, o grupo de pacientes em estadiamento inicial demonstraram significância ao observar perante aos dois diferentes *status* da concentração de MIP-3alfa ($p= 0,03$), indicando que pacientes do estadiamento inicial com altas concentrações dessa quimiocina vivem mais. Isso contraria achados de outros estudos, nos quais apontam que MIP3alfa promove a migração celular de células T regulatórias para as células tumorais, favorecendo a proliferação tumoral (CHEN et al., 2011). Além disso, já foi relatado que a quimiocina MIP-3alfa prejudica a eficácia terapêutica de pacientes com subtipo molecular triplo negativo, já que essa quimiocina induz resistência ao taxano, um importante medicamento usado no tratamento de câncer, através da via NF- κ B (CHEN et al., 2018). Isso mostra como a presença dessa quimiocina proporciona efeitos contraditórios no contexto tumoral, necessitando de investigações mais a fundo.

Com isso, está mais que claro, que as quimiocinas podem contribuir para a progressão do câncer de mama, mas também, podem proporcionar uma regressão na sua proliferação celular, e os mecanismos precisos subjacentes ao significado do prognóstico das pacientes ainda precisam ser determinados.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os parâmetros clínicos subtipo molecular de câncer de mama, presença de receptor de estrógeno, presença de receptor de progesterona, presença de receptor HER2, menopausa e estadiamento clínico não influenciam na concentração das quimiocinas com base nos achados, pois as dosagens sorológicas de MIP-1alfa, MCP-1, MIG e MIP-3alfa não demonstram diferença entre os grupos estudados. No entanto, MCP-1 e MIP-1alfa possuem associação com a sobrevida global, reduzindo-a e MIP3-alfa e MIG com a sobrevida livre de recorrência, prolongando-a, nos grupos de pacientes estudados.

7 REFERÊNCIAS

A, Ben-Baruch. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer metastasis reviews*, v. 25, n. 3, p. 357-371, 2006.
<https://doi.org/10.1007/s10555-006-9003-5>

ABE, O. et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *The Lancet*, v. 378, n. 9793, p. 771-784, 2011.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60993-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60993-8)

ABRAHAM, Michal; KARNI, Arnon; MAUSNER-FAINBERG, Karin; WEISS, Ido D.; PELED, Amnon. Natural and induced immunization against CCL20 ameliorate experimental autoimmune encephalitis and may confer protection against multiple sclerosis. *Clinical Immunology*, v. 183, p. 316-324, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.09.018>

ABU-TAHA, May et al. Menopause and Ovariectomy Cause a Low Grade of Systemic Inflammation that May Be Prevented by Chronic Treatment with Low Doses of Estrogen or Losartan. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 2, p. 1393-1402, 2009.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803157>

AC, Antoniou; DF, Easton. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene*, v. 25, n. 43, p. 5898-5905, 2006.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209879>

ALEXANDER, Dominik; JHALA, Nirag; CHATLA, Chakrapani; STEINHAEUER, Jon; FUNKHOUSER, Ellen; COFFEY, Christopher S.; GRIZZLE, William E.; MANNE, Upender. High-grade tumor differentiation is an indicator of poor prognosis in African Americans with colonic adenocarcinomas. *Cancer*, v. 103, n. 10, p. 2163-2170, 2005.
<https://doi.org/10.1002/ncr.21021>

ALI, Simi; LAZENNEC, Gwendal. Chemokines: Novel targets for breast cancer metastasis *Cancer and Metastasis Reviews Inserm*, 2007.
<https://doi.org/10.1007/s10555-007-9073-z>

ALLEN, Frederick; BOBANGA, Iuliana D.; RAUHE, Peter; BARKAUSKAS, Deborah; TEICH, Nathan; TONG, Caryn; MYERS, Jay; HUANG, Alex Y. CCL3 augments tumor rejection and enhances CD8⁺ T cell infiltration through NK and CD103⁺ dendritic cell recruitment via IFN γ . *OncoImmunology*, v.7, n.3, 2018.
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1393598>

ASIEDU, Michael K.; INGLE, James N.; BEHRENS, Marshall D.; RADISKY, Derek C.; KNUTSON, Keith L. TGF β /TNF α -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Research*, v. 71, n. 13, p. 4707-4719, 2011.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4554>

ATAOLLAHI, MR; SHARIFI, J.; PAKNAHAD, MR; PAKNAHAD, A. Breast cancer and associated factors: a review. *Journal of Medicine and Life*, v. 8, n. Spec Iss 4, p. 6, 2015.

PMID: 28316699

AYALA, Arlene Laurenti Monterrosa; ANJOS, Juliana Cristine Dos; CASSOL, Geraldo Antonio; HÖFELMANN, Doroteia Aparecida. Survival rate of 10 years among women with breast cancer: A historic cohort from 2000-2014. *Ciencia e Saude Coletiva*, v.24, n.4, p.1537-1550, 2019.

<https://doi.org/10.1590/1413-81232018244.16722017>

BAGGIOLINI, Marco; DEWALD, Beatrice; MOSER, Bernhard. Human chemokines: An update *Annual Review of Immunology* *Annu Rev Immunol*, 1997.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.675>

OLIVEIRA, José Carlos. Fatores prognósticos do câncer de mama e sobrevida global em cinco e dez anos na cidade de Goiânia, Brasil: Estudo de base populacional. *Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 44, n. 5, p. 435-443, 2017.

<https://doi.org/10.1590/0100-69912017005003>

DING, Qiang et al. CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. *Cancer Medicine*, v. 5, n. 11, p. 3246, 2016.

<https://doi.org/10.1002/cam4.934>

EIERMANN, W. et al. The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for er-positive, nodenegative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use. *Annals of Oncology*, v. 24, n. 3, p. 618-624, 2013.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mds512>

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>

EVANS, D. Gareth R.; HOWELL, Anthony. Breast cancer risk-assessment models *Breast Cancer Research* *Breast Cancer Res*, 2007.

<https://doi.org/10.1186/bcr1750>

FANTI, Peter et al. Estrogen Decreases Chemokine Levels in Murine Mammary Tissue: Implications for the Regulatory Role of MIP-1 Alpha and MCP-1/JE in Mammary Tumor Formation. *Endocrine*, v. 22, n. 2, p. 161-167, 2003.

<https://doi.org/10.1385/ENDO:22:2:161>

FARBER, J. M. HuMIG: A new human member of the chemokine family of cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 192, n. 1, p. 223-230, 1993.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1403>

FARMAKI, Elena KAZA, Vimala; PAPA VASSILIOU, Athanasios G.; CHATZISTAMOU, Ioulia; KIARIS, Hippokratris. Induction of the MCP chemokine cluster cascade in the periphery by cancer cell-derived Ccl3. *Cancer Letters*, v. 389, p. 49-58, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.028>

FARNEBO, Marianne; BYKOV, Vladimir J. N.; WIMAN, Klas G. The p53 tumor suppressor: A master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 396, n. 1, p. 85-89, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.152>

FUJIMOTO, Ruth Helena Pimenta; KOIFMAN, Rosalina Jorge; DA SILVA, Ilce Ferreira. Survival rates of breast cancer and predictive factors: A hospital-based study from western amazon area in Brazil. *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 24, n. 1, p. 261-273, 2019.
<https://doi.org/10.1590/1413-81232018241.35422016>

FUJIMOTO, Yukie et al. Significant association between high serum CCL5 levels and better disease-free survival of patients with early breast cancer. *Cancer Science*, v. 111, n. 1, p. 209-218, 2020.
<https://doi.org/10.1111/cas.14234>

G, Soria; A, Ben-Baruch. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer letters*, v. 267, n. 2, p. 271-285, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.018>

GALDIERO, Maria Rosaria; BONAVITA, Eduardo; BARAJON, Isabella; GARLANDA, Cecilia; MANTOVANI, Alberto; JAILLON, Sébastien. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, v. 218, n. 11, p. 1402-1410, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.003>

GAO, Hui Feng; CHENG, Chien Shan; TANG, Jian; LI, Ye; CHEN, Hao; MENG, Zhi Qiang; CHEN, Zhen; CHEN, Lian Yu. CXCL9 chemokine promotes the progression of human pancreatic adenocarcinoma through STAT3-dependent cytotoxic T lymphocyte suppression. *Aging*, v. 12, n. 1, p. 502-517, 2020.
<https://doi.org/10.18632/aging.102638>

GERDES, Johannes; SCHWAB, Ulrich; LEMKE, Hilmar; STEIN, Harald. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.
<https://doi.org/10.1002/ijc.2910310104>

GHOSH, Mimi; RODRIGUEZ-GARCIA, Marta; WIRA, Charles R. The immune system in menopause: Pros and cons of hormone therapy *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Elsevier Ltd*, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.003>

GIOVANNELLI, Pia; DI DONATO, Marzia; AURICCHIO, Ferdinando; CASTORIA, Gabriella; MIGLIACCIO, Antimo. Androgens Induce Invasiveness of Triple Negative Breast Cancer Cells Through AR/Src/PI3-K Complex Assembly. *Scientific Reports*, v. 9, n.1, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-41016-4>

GORBACHEV, Anton V.; KOBAYASHI, Hirohito; KUDO, Daisuke; TANNENBAUM, Charles S.; FINKE, James H.; SHU, Suyu; FARBER, Joshua M.; FAIRCHILD, Robert L. CXC Chemokine Ligand 9/Monokine Induced by IFN- γ Production by Tumor Cells Is Critical for T Cell-Mediated Suppression of Cutaneous Tumors. *The Journal of Immunology*, v.178 n.4, p.2278-2286,2007.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2278>

GRIFFITH, Jason W.; SOKOL, Caroline L.; LUSTER, Andrew D. Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity *Annual Review of Immunology Annual Reviews Inc*, 2014.

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>

GROSHONG, Steve D.; OWEN, Gareth I.; GRIMISON, Bryn; SCHAUER, Irene E.; TODD, Maria C.; LANGAN, Thomas A.; SCLAFANI, Robert A.; LANGE, Carol A.; HORWITZ, Kathryn B. Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27(Kip1). *Molecular Endocrinology*, v. 11, n.11, p.1593-1607,1997.

<https://doi.org/10.1210/mend.11.11.0006>

HAJIHOSEINI, Morteza; FARADMAL, Javad; SADIGHI-PASHAKI, Abdolazim. Survival analysis of breast cancer patients after surgery with an intermediate event: Application of illness-death model. *Iranian Journal of Public Health*, v. 44, n. 12, p. 1677-1684, 2015.

[PMC4724741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24724741/)

HEINRICHS, Daniel; BERRES, Marie Luise; NELLEN, Andreas; FISCHER, Petra; SCHOLTEN, David; TRAUTWEIN, Christian; WASMUTH, Hermann E.; SAHIN, Hacer. The Chemokine CCL3 Promotes Experimental Liver Fibrosis in Mice. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. 66106, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066106>

HÖFELMANN, Doroteia Aparecida; DOS ANJOS, Juliana Cristine; AYALA, Arlene Laurenti. Sobrevida em dez anos e fatores prognósticos em mulheres com câncer de mama em Joinville, Santa Catarina, Brasil. *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 19, n. 6, p. 1813-1824, 2014.

<https://doi.org/10.1590/1413-81232014196.03062013>

HU, Gui Nv; TZENG, Huey En; CHEN, Po Chun; WANG, Chao Qun; ZHAO, Yong Ming; WANG, Yan; SU, Chen Ming; TANG, Chih Hsin. Correlation between CCL4 gene

polymorphisms and clinical aspects of breast cancer. *International Journal of Medical Sciences*, v.15, n.11, p.1179-1186,2018.

<https://doi.org/10.7150/ijms.26771>

JOYCE, Johanna A.; POLLARD, Jeffrey W. Microenvironmental regulation of metastasis *Nature Reviews Cancer Nat Ver Cancer*, 2009.

<https://doi.org/10.1038/nrc2618>

KASAMI, Masako; UEMATSU, Takayoshi; HONDA, Masatake; YABUZAKI, Tsugumi; SANUKI, Junichi; UCHIDA, Yoshihiro; SUGIMURA, Haruhiko. Comparison of estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2 status in breast cancer pre- and post-neoadjuvant chemotherapy. *Breast*, v. 17, n. 5, p. 523-527, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.breast.2008.04.002>

KOH, Jieun; KIM, Min Jung. Introduction of a new staging system of breast cancer for radiologists: An emphasis on the prognostic stage *Korean Journal of Radiology Korean Radiological Society*,2019.

<https://doi.org/10.3348/kjr.2018.0231>

KONECNY, Gottfried et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 95, n. 2, p. 142-153, 2003.

<https://doi.org/10.1093/jnci/95.2.142>

KOZŁOWSKI, L.; ZAKRZEWSKA, I.; TOKAJUK, P.; WOJTUKIEWICZ, M. Z. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*, v. 48, p. 82-84, 2003.

PMID: 14737948

LANGE, Carol A.; RICHER, Jennifer K.; HORWITZ, Kathryn B. Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals *Molecular Endocrinology Endocrine Society*,1999.

<https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0290>

LANGE, Carol A.; YEE, Douglas. Progesterone and breast cancer *Women's Health NIH Public Access*, 2008.

<https://doi.org/10.2217/17455057.4.2.151>

LAVENDER, Nicole; YANG, Jinming; CHEN, Sheau Chiann; SAI, Jiqing; JOHNSON, C. Andrew; OWENS, Philip; AYERS, Gregory D.; RICHMOND, Ann. The Yin/Yan of CCL2: A minor role in neutrophil anti-tumor activity in vitro but a major role on the outgrowth of metastatic breast cancer lesions in the lung in vivo. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s12885-017-3074-2>

LE BORGNE, Marie et al. Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo. *Immunity*, v. 24, n. 2, p. 191-201, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.005>

LI, Rui; SUN, Xiaobo; SHU, Yaqing; WANG, Yuge; XIAO, Li; WANG, Zhanhang; HU, Xueqiang; KERMODE, Allan G.; QIU, Wei. Serum CCL20 and its association with SIRT1 activity in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, v. 313, p. 56-60, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.10.013>

LI, Yan; LIANG, Mingqiang; LIN, Yuxiang; LV, Jinxing; CHEN, Minyan; ZHOU, Peng; FU, Fangmeng; WANG, Chuan. Transcriptional Expressions of CXCL9/10/12/13 as Prognosis Factors in Breast Cancer. *Journal of Oncology*, v. 2020, 2020.

<https://doi.org/10.1155/2020/4270957>

LIAO, Fang; RABIN, Ronald L.; YANNELLI, John R.; KONIARIS, Leonidas G.; VANGURI, Padmavathy; FARBER, Joshua M. Human mig chemokine: Biochemical and functional characterization. *Journal of Experimental Medicine*, v. 182, n. 5, p. 1301-1314, 1995.

<https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1301>

LIN, Ying; HUANG, Ruochun; CHEN, Lipai; LI, Shiyong; SHI, Qian; JORDAN, Craig; HUANG, Ruo Pan. Identification of interleukin-8 as estrogen receptor-regulated factor involved in breast cancer invasion and angiogenesis by protein arrays. *International Journal of Cancer*, v.109, n.4, p.507-515, 2004.

<https://doi.org/10.1002/ijc.11724>

LIU, Chang; CUI, Guohong; ZHU, Meiping; KANG, Xiangping; GUO, Haidong. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* E-Century Publishing Corporation, 2014.

PMID: [25674199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25674199/)

LOW-MARCHELLI, Janine M.; ARDI, Veronica C.; VIZCARRA, Edward A.; VAN ROOIJEN, Nico; QUIGLEY, James P.; YANG, Jing. Twist1 induces CCL2 and recruits macrophages to promote angiogenesis. *Cancer Research*, v. 73, n. 2, p. 662-671, 2013.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0653>

LU, Xin; KANG, Yibin. Chemokine (C-C Motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 42, p. 29087-29096, 2009.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.035899>

LUO, Anqi; MENG, Min; WANG, Guanying; HAN, Rui; ZHANG, Yujiao; JING, Xin; ZHAO, Lin; GU, Shanzhi; ZHAO, Xinhao. Myeloid-derived suppressor cells recruited by chemokine (C-c motif) ligand 3 promote the progression of breast cancer via

phosphoinositide 3-kinase-protein kinase b-mammalian target of rapamycin signaling. *Journal of Breast Cancer*, v. 23, n. 2, p. 141-161, 2020.
<https://doi.org/10.4048/jbc.2020.23.e26>

MARSIGLIANTE, Santo; VETRUGNO, Carla; MUSCELLA, Antonella. CCL20 induces migration and proliferation on breast epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, v.228, n.9, p.1873-1883, 2013.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24349>

MENDONÇA, Gulnar Azevedo e. Silv.; SILVA, Aline Moraes Da; CAULA, Wagner Manoel. Tumor characteristics and five-year survival in breast cancer patients at the National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, v. 20, n. 5, p. 1232-1239, 2004.
<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000500017>

MOASSER, Mark M.; KROP, Ian E. The evolving landscape of HER2 targeting in breast cancer. *JAMA Oncology*, v. 1, n. 8, p. 1154-1161, 2015.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2286>

MUKAIDA, Naofumi; SASAKI, So Ichiro; BABA, Tomohisa. Chemokines in cancer development and progression and their potential as targeting molecules for cancer treatment *Mediators of Inflammation*Hindawi Publishing Corporation, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/170381>

NAGARSHETH, Nisha; WICHA, Max S.; ZOU, Weiping. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy *Nature Reviews Immunology*Nature Publishing Group, 2017.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>

NARITA, D.; SECLAMAN, E.; ANGHEL, A.; ILINA, R.; CIREAP, N.; NEGRU, S.; SIRBU, I. O.; URSONIU, S.; MARIAN, C. Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma*, v.63, n.1, p.141-149, 2016.
https://doi.org/10.4149/neo_2016_017

NEGUS, R. P. M. The chemokines: Cytokines that direct leukocyte migration *Journal of the Royal Society of Medicine*SAGE Publications Ltd, 1996.
<https://doi.org/10.1177/014107689608900603>

O'SULLIVAN, Ciara C.; LOPRINZI, Charles L.; HADDAD, Tufia C. Updates in the Evaluation and Management of Breast Cancer *Mayo Clinic Proceedings*Elsevier Ltd, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.03.025>

PALACIOS-ARREOLA, M. Isabel; NAVA-CASTRO, Karen E.; CASTRO, Julieta I.; GARCÍA-ZEPEDA, Eduardo; CARRERO, Julio C.; MORALES-MONTOR, Jorge. The

Role of Chemokines in Breast Cancer Pathology and Its Possible Use as Therapeutic Targets. *Journal of Immunology Research*, v.2014, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/849720>

PALACIOS-ARREOLA, M. Isabel; NAVA-CASTRO, Karen E.; CASTRO, Julieta I.; GARCÍA-ZEPEDA, Eduardo; CARRERO, Julio C.; MORALES-MONTOR, Jorge. The role of chemokines in breast cancer pathology and its possible use as therapeutic targets *Journal of Immunology Research* Hindawi Publishing Corporation, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/849720>

PALOMINO, Diana C. arolin. Torres; MARTI, Luciana C. avalheir. Chemokines and immunity *Einstein (São Paulo, Brazil) Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein*, 2015.

<https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>

PEROU, Charles M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist*, v. 16, n. S1, p. 61-70, 2011.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-S1-61>

PJ, Goodwin; M, Ennis; KI, Pritchard; J, Koo; ME, Trudeau; N, Hood. Diet and breast cancer: evidence that extremes in diet are associated with poor survival. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 21, n.13, p.2500-2507, 2003.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2003.06.121>

POLLARD, Jeffrey W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis *Nature Reviews Cancer* European Association for Cardio-Thoracic Surgery, 2004.

<https://doi.org/10.1038/nrc1256>

POLYAK, Kornelia. Heterogeneity in breast cancer *Journal of Clinical Investigation* American Society for Clinical Investigation, 2011.

<https://doi.org/10.1172/JCI60534>

PRABHAKARAN, Sangeetha; RIZK, Victoria T.; MA, Zhenjun; CHENG, Chia Ho; BERGLUND, Anders E.; COPPOLA, Dominico; KHALIL, Farah; MULÉ, James J.; SOLIMAN, Hatem H. Evaluation of invasive breast cancer samples using a 12-chemokine gene expression score: Correlation with clinical outcomes. *Breast Cancer Research*, v. 19, n. 1, p. 71, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s13058-017-0864-z>

QIAN, Bin Zhi; LI, Jiufeng; ZHANG, Hui; KITAMURA, Takanori; ZHANG, Jinghang; CAMPION, Liam R.; KAISER, Elizabeth A.; SNYDER, Linda A.; POLLARD, Jeffrey W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, v. 475, n. 7355, p. 222-225, 2011.

<https://doi.org/10.1038/nature10138>

RAKHA, Emad A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade Breast Cancer Research BioMed Central, 2010.
<https://doi.org/10.1186/bcr2607>

RAMAN, Dayanidhi; SOBOLIK-DELMARE, Tammy; RICHMOND, Ann. Chemokines in health and disease Experimental Cell Research Academic Press Inc., 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.005>

RAZIS, Evangelia et al. The Role of CXCL13 and CXCL9 in Early Breast Cancer. Clinical Breast Cancer, v.20, n.1, p.e36-e53, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2019.08.008>

REDJIMI, Nassima; RAFFIN, Caroline; RAIMBAUD, Isabelle; PIGNON, Pascale; MATSUZAKI, Junko; ODUNSI, Kunle; VALMORI, Danila; AYYOUB, Maha. CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. Cancer Research, v. 72, n. 17, p. 4351-4360, 2012.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0579>

REZO, Angela; DAHLSTROM, Jane; SHADBOLT, Bruce; RODINS, Karl; ZHANG, Yanping; DAVIS, Alison J. Tumor size and survival in multicentric and multifocal breast cancer. Breast, v. 20, n.3, p.259-263, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.01.005>

RIDIANDRIES, Anisyah; TAN, Joanne T. M.; RAVINDRAN, Dhanya; WILLIAMS, Helen; MEDBURY, Heather J.; LINDSAY, Laura; HAWKINS, Clare; PROSSER, Hamish C. G.; BURSILL, Christina A. CC-chemokine class inhibition attenuates pathological angiogenesis while preserving physiological angiogenesis. The FASEB Journal, v. 31, n. 3, p. 1179-1192, 2017.
<https://doi.org/10.1096/fj.201600540R>

ROMERO-MORENO, Ricardo et al. The CXCL5/CXCR2 axis is sufficient to promote breast cancer colonization during bone metastasis. Nature Communications, v. 10, n. 1, 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12108-6>

ROSENTHAL, Seth I.; DEPOWSKI, Peter L.; SHEEHAN, Christine E.; ROSS, Jeffrey S. Comparison of HER-2/ neu Oncogene Amplification Detected by Fluorescence In Situ Hybridization in Lobular and Ductal Breast Cancer. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, v. 10, n. 1, p. 40-46, 2002.
<https://doi.org/10.1097/00129039-200203000-00007>

ROT, Antal; VON ANDRIAN, Ulrich H. Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokines grammar for immune cells Annual Review of Immunology Annu Ver Immunol, 2004.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543>

ROT, Antal; VON ANDRIAN, Ulrich H. Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokine grammar for immune cells *Annual Review of Immunology* *Annu Rev Immunol*, 2004.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543>

SALAZAR, Nicole; CASTELLAN, Miguel; SHIRODKAR, Samir S.; LOKESHWAR, Bal L. Chemokines and chemokine receptors as promoters of prostate cancer growth and progression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v. 23, n. 1, p. 77-91, 2013.

<https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013006905>

SANT, Milena et al. Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe. *International Journal of Cancer*, v. 106, n. 3, p. 416-422, 2003.

<https://doi.org/10.1002/ijc.11226>

SB, Edge; CC, Compton. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*, v. 17, n. 6, p. 1471-1474, 2010.

<https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4>

SCHNEIDER, Ione Jayce Ceola; D'ORSI, Eleonora. Five-year survival and prognostic factors in women with breast cancer in Santa Catarina state, Brazil. *Cadernos de Saude Publica*, v. 25, n. 6, p. 1285-1296, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009000600011>

SCHWARTZ, Arnold M.; HENSON, Donald Earl; CHEN, Dechang; RAJAMARTHANDAN, Sivasankari. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: A study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER program. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 138, n. 8, p. 1048-1052, 2014.

<https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0435-OA>

SEKI, Ekihiro; DE MINICIS, Samuele; GWAK, Geum Youn; KLUWE, Johannes; INOKUCHI, Sayaka; BURSILL, Christina A.; LLOVET, Josep M.; BRENNER, David A.; SCHWABE, Robert F. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 7, p. 1858-1870, 2009.

<https://doi.org/10.1172/JCI37444>

SILVA, Leonardo Roberto Da; VARGAS, Renato Flora; SHINZATO, Júlia Yoriko; DERCHAIN, Sophie Françoise Mauricette; RAMALHO, Susana; ZEFERINO, Luiz Carlos. Association of Menopausal Status, Expression of Progesterone Receptor and Ki67 to the Clinical Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Luminal Breast Cancer. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, v. 41, n. 12, p. 710-717, 2019.

<https://doi.org/10.1055/s-0039-3400457>

SIVRO, Aida; LAJOIE, Julie; KIMANI, Joshua; JAOKO, Walter; PLUMMER, Francis A.; FOWKE, Keith; BALL, T. B. Age and menopause affect the expression of specific cytokines/chemokines in plasma and cervical lavage samples from female sex workers in Nairobi, Kenya. *Immunity and Ageing*, v. 10, n. 1, p. 42, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-42>

SL, Deshmane; S, Kremlev; S, Amini; BE, Sawaya. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, v. 29, n. 6, p. 313-325, 2009.

<https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>

SLAMON, Dennis et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*, v. 365, n. 14, p. 1273-1283, 2011.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0910383>

SORIA, Gali et al. Inflammatory mediators in breast cancer: Coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, v. 11, 2011.

<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-130>

STONE, Martin J.; HAYWARD, Jenni A.; HUANG, Cheng; HUMA, Zil E.; SANCHEZ, Julie. Mechanisms of regulation of the chemokine-receptor network *International Journal of Molecular Sciences MDPIAG*, 2017.

<https://doi.org/10.3390/ijms18020342>

STRIETER, Robert M.; BURDICK, Marie D.; MESTAS, Javier; GOMPERS, Brigitte; KEANE, Michael P.; BELPERIO, John A. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *European Journal of Cancer*, v. 42, n. 6, p. 768-778, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.006>

TANEJA, Veena. Sex hormones determine immune response. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01931>

THOMPSON, Alastair M.; JORDAN, Lee B.; QUINLAN, Philip; ANDERSON, Elizabeth; SKENE, Anthony; DEWAR, John A.; PURDIE, Colin A. Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: The Breast Recurrence In Tissues Study (BRITS). *Breast Cancer Research*, v. 12, n. 6, 2010.

<https://doi.org/10.1186/bcr2771>

TRAVÉS, Paqui G.; LUQU, Alfonso; HORTELANO, Sonsoles. Tumor suppressor ARF: The new player of innate immunity. *OncImmunology*, v. 1, n. 6, p. 946-947, 2012.

<https://doi.org/10.4161/onci.19948>

TREILLEUX, Isabelle et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 22, p. 7466-7474, 2004.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0684>

VAZQUEZ-MARTIN, Alejandro; COLOMER, Ramon; MENENDEZ, Javier 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, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.01.037>

VERONESI, Umberto; ZURRIDA, Stefano; VIALE, Giuseppe; GALIMBERTI, Viviana; ARNONE, Paolo; NOLÈ, Franco. Rethinking TNM: A breast cancer classification to guide to treatment and facilitate research. *Breast Journal*, v. 15, n. 3, p. 291-295, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2009.00719.x>

VOGELSTEIN, Bert; LANE, David; LEVINE, Arnold J. Surfing the p53 network. *Nature*, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.
<https://doi.org/10.1038/35042675>

WANG, Neng et al. CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death & Disease*, v. 9, n. 9, p. 880, 2018.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0876-3>

WEIGELT, Britta; GEYER, Felipe C.; REIS-FILHO, Jorge S. Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology* John Wiley and Sons Ltd, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>

WHITE, Gemma E.; IQBAL, Asif J.; GREAVES, David R. CC chemokine receptors and chronic inflammation-therapeutic opportunities and pharmacological challenges *Pharmacological Reviews* American Society for Pharmacology and Experimental Therapy, 2013.
<https://doi.org/10.1124/pr.111.005074>

XING, Ying; MENG, Qingwei; SUN, Lichun; CHEN, Xuesong; CAI, Li. Survival analysis of patients with unilateral and bilateral primary breast cancer in Northeast China. *Breast Cancer*, v. 22, n. 5, p. 536-543, 2015.
<https://doi.org/10.1007/s12282-014-0517-3>

XU, Lin; XU, Wei; QIU, Shenglong; XIONG, Sidong. Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer. *Clinical Immunology*, v. 135, n. 3, p. 466-475, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.01.014>

YANG, Hui et al. CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis. *Molecular Cancer*, v. 19, n. 1, 2020.

<https://doi.org/10.1186/s12943-020-01165-x>

YAO, Hui; HE, Guangchun; YAN, Shichao; CHEN, Chao; SONG, Liujiang; ROSOL, Thomas J.; DENG, Xiyun. Triple-negative breast cancer: Is there a treatment on the horizon? *Oncotarget Impact Journals LLC*, 2017.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12284>

YUE, Wei et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *International Journal of Cancer*, v. 127, n. 8, p. 1748-1757, 2010.

<https://doi.org/10.1002/ijc.25207>

ZHANG, H. et al. CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer. *Oncogene*, v. 36, n. 15, p. 2095-2104, 2017.

<https://doi.org/10.1038/onc.2016.367>

ZHANG, Liling; RIETHDORF, Sabine; WU, Gang; WANG, Tao; YANG, Kunyu; PENG, Gang; LIU, Junli; PANTEL, Klaus. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 18, n. 20, p. 5701-5710, 2012.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1587>

ZLOTNIK, Albert; YOSHIE, Osamu. Chemokines: A new classification system and their role in immunity *Journal of Cultural Heritage Elsevier Masson SAS*, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80165-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80165-X)

ZOU, Weiping; WOLCHOK, Jedd D.; CHEN, Lieping. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science Translational Medicine*, v. 8, n. 328, 2016.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7118>

8 ANEXO

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