

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Assinatura transcricional específica dos genes IL-1 β , IL-6, IL-10, E TNF α em pacientes com
câncer de mama

Jéssica Pereira de Oliveira

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

Uberlândia – MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Assinatura transcricional específica dos genes IL-1 β , IL-6, IL-10, E TNF α em pacientes com
câncer de mama

Jéssica Pereira de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

Co-orientadora: Msc. Alinne Tatiane Faria Câmara

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

Uberlândia – MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Assinatura transcricional específica dos genes IL-1 β , IL-6, IL-10, E TNF α em pacientes com
câncer de mama

Jéssica Pereira De Oliveira

Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia
Faculdade de Medicina

Msc. Alinne Tatiane Faria Câmara
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ____/____/____

Edgar Silveira Campos

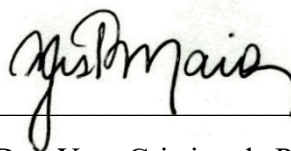
Uberlândia – MG
Dezembro – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Assinatura transcricional específica dos genes IL-1 β , IL-6, IL-10, E TNF α em pacientes com
câncer de mama

Jéssica Pereira de Oliveira

Aprovado pela Banca Examinadora em: 18 de dezembro de 2017.



Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

Uberlândia, 18 de dezembro de 2017

DEDICATÓRIA

Dedicado a todas as mulheres que lutam cotidianamente com o câncer de mama, e especialmente a aquelas que a cima de tudo aceitaram fazer parte do presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido saúde e inteligência, e por ter tranquilizado o meu espírito nos momentos mais difíceis da minha trajetória acadêmica, me permitindo assim superar todos os obstáculos impostos com sabedoria.

Agradeço aos meus pais, Simone e Paulo, por todo amor, carinho e confiança depositados sobre mim ao longo desta trajetória, e principalmente por não me permitirem desistir, não medindo assim esforços para que hoje eu pudesse estar vivenciando esta fase.

Agradeço também ao meu namorado, Vitor, por sempre acreditar na minha capacidade, em momentos que eu mesma não acreditava, e por ter compreendido a minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos.

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Yara Cristina de Paiva Maia, e co-orientadora, MSc. Alinne Tatiane Faria Câmara, pela constante paciência e dedicação, assim como por todos os ensinamentos transmitidos que possibilitaram a realização deste estudo.

Agradeço por fim a todos os colaboradores, que foram de suma importância para a conclusão deste estudo, especialmente a todas as mulheres que se dispuseram gentilmente a participar da pesquisa.

RESUMO

Grande parte dos casos de câncer de mama são atualmente diagnosticados em estágios tardios. Frente a isto, identifica-se uma crescente dificuldade na determinação do índice de eficácia do tratamento neoplásico aplicado. Desta forma, o objetivo do estudo foi investigar diferenciações nos níveis transcricionais de marcadores inflamatórios em pacientes com câncer de mama, submetidas ou não à quimioterapia, visando melhor compreender a atuação da inflamação nesta enfermidade e a sua possível influência na quimioterapia. Para isto, foi determinado, por meio de qPCR, o nível transcricional dos marcadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α , no sangue periférico de 45 mulheres. Os resultados obtidos indicam uma expressão significativamente maior no grupo câncer de mama sem quimioterapia para a IL-6, e uma concentração significativamente maior no grupo câncer de mama com quimioterapia para IL-1 β . Foi também identificado uma alteração no nível transcricional de IL-1 β de acordo com a variação do fenótipo molecular tumoral. Sendo assim, frente aos dados descritos na literatura, e os resultados obtidos, sugere-se uma possível associação entre o nível de expressão das interleucinas 6 e 1 β , com a efetividade da quimioterapia.

Palavras-chave: Câncer de mama; Marcadores Inflamatórios; Quimioterapia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer	2
1.2. Quimioterapia	4
1.3. Anatomia da Mama	5
1.4. Câncer de Mama	6
1.5. Processo Inflamatório e o Câncer	8
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos	12
3. METODOLOGIA	13
3.1. Triagem das Pacientes	13
3.2. Extração do RNA total do sangue periférico, Transcrição Reversa e qPCR	15
3.3. Análises Estatísticas	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Características das Pacientes	20
4.2. Níveis Transcricionais dos Marcadores Inflamatórios Alvos	23
5. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÃO	30
7. PERSPECTIVAS	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
APÊNDICES	36
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	36
APÊNDICE B - Questionário Socioeconômico e Clínico (QSEC)	37
ANEXOS	38

ANEXO A - Classificação do TNM Patológico e do Fenótipo Molecular do Tumor ..	38
ANEXO B - Aprovação do parecer pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo da Carcinogênese.	3
Figura 2. Anatomia da Mama.	6
Figura 3. Componentes da Resposta Inflamatória.	9
Figura 4. Representação da eletroforese em gel de agarose 1,5% para avaliação da qualidade do cDNA.	19
Figura 5. Gráfico boxplot para identificação de valores extremos e <i>outliers</i> .	23
Figura 6. Gráfico de associação da média dos níveis transcricionais de IL-1 β com o subtipo molecular do tumor.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> empregados na qPCR.	18
Tabela 2. Características clínicas, hormonais e terapêuticas em pacientes com câncer de mama.	22
Tabela 3. Valores extemos obtidos da análise dos gráficos de boxplot.	23
Tabela 4. Níveis transcricionais dos marcadores inflamatórios em pacientes com câncer de mama (Mediana/média e Percentis/DP).	24
Tabela 5. Níveis transcricionais dos marcadores inflamatórios (Mediana/média e Percentis/DP).	25
Tabela 6. Análise de EEG para o marcador IL-1 β .	26

LISTA DE ABREVIATURAS

B2M – β -2-Microglobulina

cDNA – Desoxirribonucleico Complementar

CEP – Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos

CTCs – Células Tumorais Circulantes

DEPC – Dietil Pirocarbonato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNTP – Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

DTT – Ditionotritol

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EEG – Equações de Estimativas Generalizadas

HC-UFU – Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

IL-10 – Interleucina-10

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-6 – Interleucina-6

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MMLV-RT – Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney

N – Metástase em Linfonodo Regional

NK – *Natural Killer* (Células Exterminadoras)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pTNM – Classificação TNM Patológica

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

QSEC – Questionário Socioeconômico e Clínico

RE – Receptor de Estrógenos

RNA – Ácido Ribonucleico

RNase – Ribonuclease

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RP – Receptor de Progesterona

T – Extensão do Tumor Primário

TBE – Tris-Borato-EDTA

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

TRIS – Trisaminometano

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado como um grave problema de saúde pública em nível mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, sendo assim enquadrado como uma das causas mais relevantes de morbidade e mortalidade em crianças e adultos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que no ano de 2025 haverá em todo o mundo 20 milhões de novos casos de câncer. No Brasil, para o biênio 2016-2017, estima-se uma média de aproximadamente 600 mil novos casos desta enfermidade (ABBAS *et al.*, 2012; INCA, 2015).

De acordo com o projeto Globocan/Iarc, conduzido no ano de 2012, os tipos de cânceres com maior frequência de incidência mundialmente são pulmão, mama, intestino e próstata. A população feminina é principalmente acometida pelo câncer de mama, que apresenta 28% de incidência em todo o mundo, estimando-se a ocorrência de 58 mil novos casos até o final do ano de 2017. Além do fator de incidência, o câncer de mama no Brasil é também considerado o tipo de neoplasia que mais causa mortes na população feminina, ocasionando 13.225 óbitos no país no ano de 2011 (INCA 2015).

Desde os estudos conduzidos por Rudolf Virchow durante o século XIX, a partir dos quais foi possível detectar a presença de leucócitos nas regiões proximais aos tumores, estipula-se uma potencial conexão entre o processo inflamatório e o desenvolvimento do câncer (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; COELHO, 2013; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010). Análises mais recentes identificaram a presença de células inflamatórias em neoplasias que se encontram em fases de desenvolvimento, inicialmente acreditava-se que estas células eram responsáveis por erradicar as células tumorais. Todavia, as células inflamatórias demonstraram na verdade, propiciar o crescimento dos tumores através da produção de mediadores da homeostasia tecidual, contribuindo desta forma tanto para o remodelamento da

matriz extracelular, quanto para os processos de angiogênese e metástase (COELHO, 2013; KEMPEN *et al.*, 2006).

1.1. Câncer

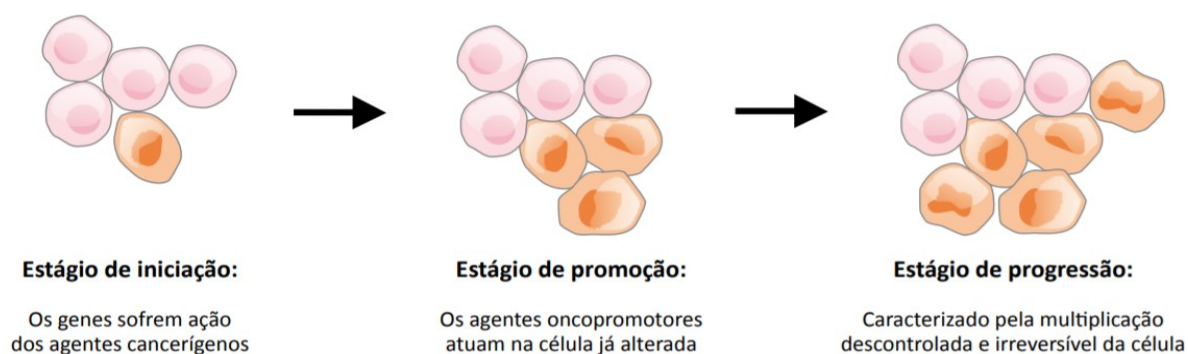
A terminologia câncer, etimologicamente proveniente do termo grego *karkínos*, já é empregada a vários anos a fim de designar um conjunto de mais de cem enfermidades, caracterizadas pela proliferação desordenada e descontrolada de células malignas. Desta forma, o câncer é intitulado como sendo uma doença heterogênea, delimitada por distintas manifestações histológicas, prognósticas e clínicas, assim como também por variações nos padrões genéticos do organismo (GUAN *et al.*, 2016; INCA, 2011; ZARDAVAS *et al.*, 2015).

As mutações do DNA, que acarretam nas desordens genéticas e subsequentemente no surgimento do câncer, podem ser ocasionadas tanto espontaneamente por fatores internos do organismo, como também podem ser induzidas por fatores externos do ambiente, tal como por influência de costumes próprios de um ambiente social/cultural ou um dano desencadeado por instabilidade genética induzida por radiação. O câncer pode apresentar também alterações epigenéticas, como por exemplo o aumento focal da metilação de genes supressores tumorais (KUMAR *et al.*, 2013).

O processo de transformação de células normais em células tumorais é denominado como carcinogênese, tal processo ocorre basicamente em três etapas e é governado por complexas alterações genéticas e epigenéticas, de modo que células normais sejam progressivamente transformadas em células malignas por meio da obtenção de novos mecanismos e habilidades (BELIZÁRIO, 2002; KUMAR *et al.*, 2013; WEIGELT *et al.*, 2014). O primeiro estágio da carcinogênese, denominado iniciação tumoral, é desencadeado por agentes carcinógenos, responsáveis por induzir modificações em genes-chaves, de modo a

ocasionar uma alteração genética celular. Sucessivamente, tem-se a etapa de promoção tumoral, a qual é influenciada pela atuação dos agentes oncopromotores, que são responsáveis por transformar gradativamente as células alteradas, oriundas da iniciação tumoral, em células malignas. Por fim, tem-se o estágio da progressão tumoral, que é demarcado pela proliferação descontrolada e irreversível das células malignas (Figura 1) (INCA, 1996; INCA, 2011).

Figura 1. Processo de Carcinogênese.



Fonte: INCA, 2011, p. 22.

Legenda: Células normais demonstradas pela coloração rosa, e células tumorais representadas pela coloração laranja.

As células oncogênicas apresentam uma rápida divisão celular e atuam de maneira agressiva no organismo, ocasionando assim na formação das chamadas neoplasias malignas. Tais neoplasias apresentam um alto grau de autonomia, sendo assim capazes de invadir tecidos e órgãos adjacentes. Existem também os tumores de caracterização benigna, os quais singelamente são representados por uma porção localizada de massa celular, que se multiplica lentamente, de forma organizada, e que usualmente não se diferencia do seu tecido de origem. Outro fator característico dos tumores benignos é a presença de margens bem definidas (INCA 1996; INCA 2011).

A letalidade dos tumores malignos, pode ser explicada através de fatores como a desregulação da atividade proliferativa das células, ou pela resistência das células oncogênicas ao processo apoptótico do organismo, assim como também pela capacidade das

células tumorais migrarem e invadirem tecidos e órgãos secundários, isto é, locais distintos ao de origem do tumor, processo este denominado como metástase (ABBAS *et al.*, 2012).

A metástase é considerada como um processo dinâmico, demarcado pela presença de vários estágios, o primeiro deles é caracterizado pela separação das células neoplásicas, oriundas do tumor primário, e a subsequente migração das mesmas. No segundo estágio, tem-se a invasão de tecidos adjacentes por meio da penetração da membrana basal, sendo este seguido pela difusão das células tumorais para os vasos sanguíneos ou linfáticos. As células tumorais são capazes de sobreviver as condições de morte celular, enquanto encontram-se separadas da massa tumoral e em um órgão distante, graças a perda das características de adesão celular. O último estágio do processo metastático é demarcado pela formação de micrometástases, e posterior adaptação e reprogramação do estroma, visando desta forma propiciar o desenvolvimento das macrometástases (BELIZÁRIO, 2002; YAO *et al.*, 2011).

Durante a cascata metastática tem-se o desprendimento de células do tumor primário e a posterior migração das mesmas para a corrente sanguínea. Acredita-se que este fenômeno seja responsável por desencadear na formação das chamadas células tumorais circulantes (CTCs), as quais são principalmente caracterizadas pela capacidade de migrarem para a corrente sanguínea e de sobreviverem a condições adversas durante todo este processo de migração, sendo ainda capazes de posteriormente se instalarem em órgãos/tecidos diferentes dos de sua origem. (CIERNA *et al.*, 2014; MENDES, 2016)

1.2. Quimioterapia

Atualmente, são descritas três principais metodologias para o tratamento do câncer, sendo elas a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. Tais tratamentos, podem ser empregados em conjunto, ou de forma separada levando em consideração a suscetibilidade do tumor em questão, a cada uma destas três modalidades terapêuticas (INCA, 2011). Contudo, a

quimioterapia tem-se mostrado nos últimos anos, como uma das únicas opções disponíveis de tratamento, frente ao fato de que a grande maioria dos casos de câncer vêm sendo diagnosticados em estágios tardios e avançados da doença (JANUCHOWSKI *et al.*, 2013).

Sinteticamente, a quimioterapia consiste no emprego de agentes antineoplásicos, os quais são administrados em intervalos regulares de acordo com o perfil de tratamento traçado, a fim de prevenir ou tratar de forma sistêmica neoplasias malignas. O processo quimioterapêutico exerce sua função a nível celular, interferindo de modo não específico nos processos de progressão e disseminação das células, ou seja, a quimioterapia não atua de forma a eliminar seletivamente somente as células tumorais do organismo (BONASSA, 1992; INCA, 2011; RIUL&AGUILLAR, 1999).

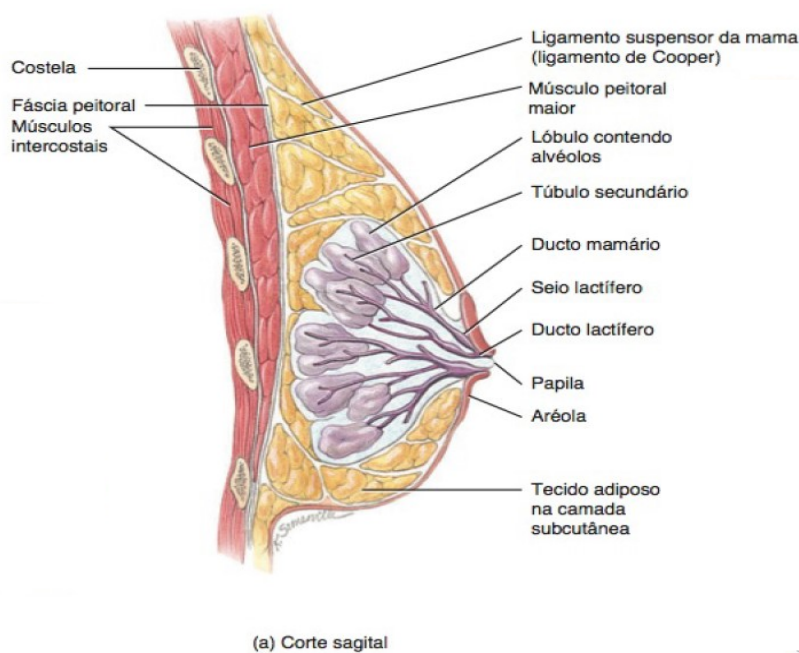
A quimioterapia é subdividida em cinco classes: (1) quimioterapia neoadjuvante, a qual é empregada com a finalidade de reduzir o tamanho dos tumores, tornando-os assim ressecáveis; (2) quimioterapia adjuvante/profilática, que é indicada após a realização de intervenção cirúrgica curativa; (3) quimioterapia curativa, a qual é utilizada a fim de tratar pacientes diagnosticados com neoplasias malignas, sendo nestes casos tida como a principal forma de tratamento ; (4) quimioterapia para controle temporário da doença, empregada principalmente para o tratamento de tumores sólidos ou neoplasias de evolução crônica; e (5) quimioterapia paliativa, que é indicada para amenização de sintomas responsáveis por comprometer a capacidade funcional do paciente (INCA, 2011).

1.3. Anatomia da Mama

A mama é caracterizada como uma protuberância hemisférica, de tamanho variado, situada na porção anterior da musculatura peitoral maior e serrátil anterior, sendo ligada a estes músculos por meio de uma camada de tecido conjuntivo denso não modelado. Cada mama apresenta uma glândula sudorípara modificada, responsável por produzir leite durante a

fase de lactação, que recebe a denominação de glândula mamária. Na porção interior de cada glândula mamária, tem-se cerca de 15 a 20 lobos, que encontram-se organizados radialmente e separados por tecido adiposo e frações de tecido conjuntivo, frações estas conhecidas como ligamentos suspensores mamários ou ligamentos de Cooper, que possuem a função de sustentar as mamas. Internamente, cada lobo apresenta uma série de compartimentos menores chamados de lóbulos, que são demarcados pela presença dos alvéolos, unidade glandular funcional da mama responsável pela secreção de leite (Figura 2) (TORTORA & NIELSEN, 2013).

Figura 2. Anatomia da Mama.



Fonte: Adaptado de TORTORA & NIELSEN, 2013, p. 980.

1.4. Câncer de Mama

O câncer de mama é tido como uma enfermidade heterogênea tanto nos quesitos clínicos quanto morfológicos, demandando desta forma um perfil de tratamento específico para cada um dos tipos existentes. Atualmente, existem mais de vinte subtipos diferentes da doença, tais como o carcinoma lobular, tubular, medular, papilar, dentre outros. Todavia,

apesar da multiplicidade, o tipo de câncer de mama mais habitual é o oriundo do epitélio ductal, apresentando 80% de frequência, este tipo de tumor é denominado como carcinoma ductal invasivo (INCA, 2015).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama resumem-se, a presença da enfermidade em parentes de primeiro grau, a idade, fatores genéticos e endócrinos, a situações que envolvam um longo período de exposição a hormônios, tais como a utilização de anticoncepcionais ou menarca precoce, eventos reprodutivos, alta densidade do tecido mamário, assim como também os hábitos de vida da mulher. Outros agentes, tais como o excesso de peso, tabagismo e o sedentarismo, podem também ser enquadrados como potenciais fatores que favorecem o desenvolvimento deste tipo de neoplasia (AMBROSONE, 2000; COELHO, 2013; INCA 2015).

Diversos estudos apontam que apesar do câncer de mama, quando diagnosticado precocemente, apresentar um bom prognóstico, os índices de mortalidade por este tipo de neoplasia permanecem ainda amplamente elevados no mundo todo. Este fato se deve, principalmente, a existência de políticas ineficazes para o controle e rastreamento desta enfermidade, ocasionado desta forma no diagnóstico tardio da doença, ou seja, quadros já em estágios avançados incluindo normalmente a presença de metástases (COELHO, 2013; JANUCHOWSKI *et al.*, 2013).

Frente a esta problemática de incidência do câncer de mama, pesquisadores destinaram os seus estudos para o desenvolvimento de novas metodologias e tecnologias capazes de propiciar um melhor prognóstico, rastreamento e/ou diagnóstico do câncer de mama. Desta forma, a fim de complementar a mamografia, método atualmente empregado o qual possui sensibilidade e especificidade moderada, diversas biomoléculas têm sido analisadas como potenciais marcadores de diagnóstico, prognóstico e até mesmo possíveis alvos terapêuticos do

câncer de mama, ou seja, atualmente existe uma intensa procura pelos denominados marcadores tumorais (COELHO, 2013; JESNECK *et al.*, 2009).

Os marcadores tumorais consistem em macromoléculas situadas no tumor, no sangue ou em outros fluídos biológicos, os quais podem ser produzidos diretamente pelo tumor, ou indiretamente pelo organismo devido a presença da neoplasia. A oscilação na concentração destas biomoléculas está relacionada com a origem e o desenvolvimento das células tumorais, podendo desta forma serem empregadas como indicadores da presença de câncer, de modo que no câncer de mama por exemplo já se tem o emprego de marcadores como o CA 15-3 e o CA-27 (ALMEIDA *et al.*, 2007).

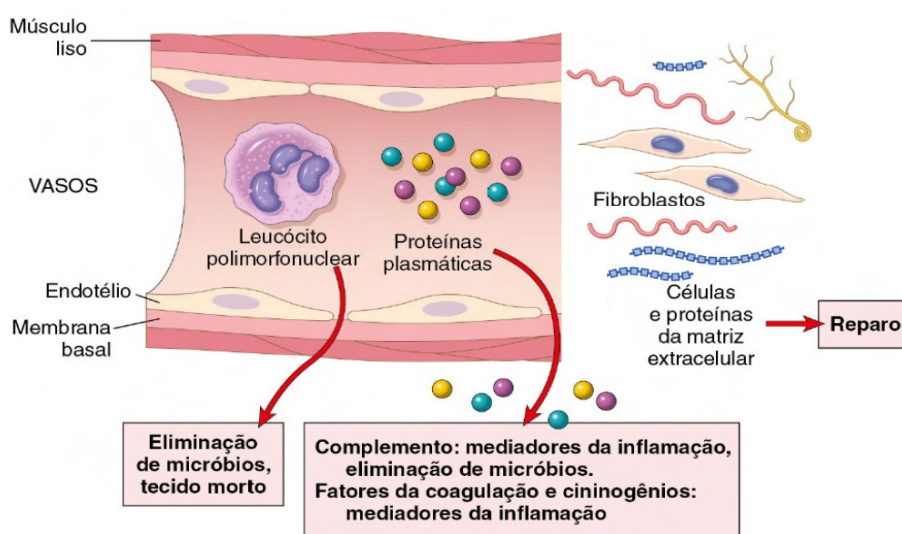
1.5. Processo Inflamatório e o Câncer

A inflamação consiste basicamente em uma reação do organismo a uma infecção ou lesão tecidual, isto é, trata-se de uma resposta protetora do organismo que visa a eliminação da causa inicial da inflamação e a subsequente iniciação da reparação do local afetado. A inflamação é subdividida em aguda e crônica, sendo a aguda caracterizada por um rápido início e uma curta duração, assim como também pelo acúmulo de leucócitos e pela exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas. A inflamação crônica por sua vez, apresenta uma maior duração e é reconhecida pelo influxo de linfócitos e macrófagos com proliferação vascular associada e cicatrização (ABBAS *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2013).

O processo inflamatório é desencadeado por meio da produção celular de mediadores químicos em função de um estímulo nocivo. O primeiro estágio deste processo é caracterizado pelo reconhecimento do agente lesivo e o subsequente recrutamento de proteínas plasmáticas e glóbulos brancos, também denominados como leucócitos, através da secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios. Sucessivamente, tem-se o acúmulo de leucócitos nos tecidos infectados ou lesados, sendo este processo seguido posteriormente

pela ativação dos mesmos, os quais irão atuar de modo a eliminar, por fagocitose, o fator lesivo desencadeante da inflamação. Por fim, tem-se a regulação da resposta inflamatória e o início do processo de reparação, o qual é conduzido por meio de células e proteínas da matriz extracelular, assim como também pelos fibroblastos (Figura 3) (ABBAS *et al.*, 2015; GRIVENNIKOV *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2013).

Figura 3. Componentes da Resposta Inflamatória.



Fonte: Adaptado de KUMAR *et al.*, 2013, p. 47.

Durante o processo inflamatório, uma série de citocinas são secretadas. Tais citocinas, são membros de um amplo grupo de proteínas as quais apresentam diferentes estruturas e funções, mas que possuem em comum a capacidade de regular e coordenar diversas atividades das células imunes. Dentre as características estruturais e funcionais das citocinas destacam-se, o fato das mesmas serem pleiotrópicas, exercerem suas funções através de receptores situados na membrana da célula alvo, e apresentarem efeitos aditivos/sinérgico/antagonistas. As citocinas são secretadas principalmente por linfócitos e macrófagos, atuando de maneira a modificar a função de células alvo. Como representantes deste grupo, pode-se apontar as diversas interleucinas existentes, assim como também os

fatores de necrose tumoral e transformador de crescimento, TNF e TGF respectivamente (ABBAS *et al.*, 2015; KNÜPFER *et al.*, 2006).

De acordo com o estudo de Wulaningsih *et al.* (2015) a associação entre o processo inflamatório e o câncer é concedida por dois mecanismos distintos, sendo um sustentado pelo ideal de que a liberação de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, pela inflamação crônica, promove o desenvolvimento da neoplasia, e outro baseado no fato de que a progressão tumoral é afetada pela inflamação, a qual ocorre de forma secundária ao câncer. Estudos recentes voltados para o câncer de mama, demonstram que esta associação é verificada por meio da infiltração de leucócitos em tecidos cancerígenos, assim como também pela maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (ALI *et al.*, 2014).

A interleucina-1 (IL-1) consiste em uma importante citocina mediadora da resposta inflamatória aguda, sendo principalmente produzida por fagócitos mononucleares e macrófagos. O estudo de Johnson (1993) demonstra que existem duas formas desta interleucina, denominadas como IL-1 α e IL-1 β , as quais apesar de apresentarem menos de 30% de homologia, são capazes de se ligarem em receptores celulares idênticos e exercerem as mesmas funções biológicas, todavia, a IL-1 β consiste na principal forma biologicamente ativa secretada. De acordo com o estudo de Apte *et al.* (2006), a IL-1 β contribui ativamente para a proliferação tumoral, assim como também para os processos de angiogênese e invasão local do tumor. A IL-1 β é também descrita por apresentar a capacidade de aumentar a eficácia de agentes quimioterápicos através de mecanismos diretos e indiretos, ocasionando assim em um aumento da citotoxicidade e da capacidade de promoção da morte da célula tumoral (JOHNSON, 1993; TRIOZZI & ALDRICH, 2010).

A interleucina-6 (IL-6) é também enquadrada como uma citocina pró-inflamatória, sendo responsável por induzir a síntese de diversos mediadores inflamatórios, estimular a produção de neutrófilos, assim como promover a diferenciação de algumas células T. A IL-6

é comumente produzida por fagócitos mononucleares, células endoteliais vasculares e fibroblastos, todavia, já se tem relatos mencionando a secreção de IL-6 e outras citocinas similares por células tumorais (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010; KNÜPFER *et al.*, 2006). Frente a isto, nos últimos anos, o número de publicações relacionando a IL-6 com o câncer de mama têm aumentado significativamente, de modo que estudos, como o de Kozlowski *et al.* (2003), já demonstram a presença de níveis significativamente mais elevados desta interleucina no soro de pacientes já diagnosticadas com câncer de mama em relação a mulheres saudáveis (ABBAS *et al.*, 2015; KNÜPFER *et al.*, 2006).

O fator de necrose tumoral (TNF α), que é sintetizado por macrófagos e células dendríticas, tem como funções biológicas a indução da morte celular, processo este denominado como apoptose, e a mediação de ações pró-inflamatórias. Além disto, o TNF α é considerado como um dos fatores responsáveis por promover o crescimento e a migração do tumor no microambiente tumoral, sendo ainda altamente expresso em carcinomas mamários. Kamel *et al.* (2012) demonstram que existe uma expressão crônica de TNF α em tumores da mama, sustentando desta forma a hipótese de que esta citocina encontra-se diretamente relacionada ao crescimento tumoral (ABBAS *et al.*, 2015; ESQUIVEL-VELÁZQUEZ *et al.*, 2015; HAMED *et al.*, 2012; LEEK *et al.*, 1998; KNÜPFER *et al.*, 2006).

A interleucina-10 (IL-10) caracteriza-se como uma potente citocina anti-inflamatória, uma vez que inibe a expressão gênica e a produção de mediadores inflamatórios por células T e macrófagos. Esta citocina é tanto produzida quanto inativada pelos macrófagos, de modo a ser assim enquadrada como um regulador de retroalimentação negativa. Estudos como o de Hamidullah *et al.* (2011) têm demonstrado, que em alguns tipos de câncer a IL-10 pode desempenhar atividades tanto antitumorais quanto pró-tumorais. Acredita-se que o efeito antitumoral desta citocina seja provocado, ou pela atuação aumentada das células exterminadoras naturais, terminologia provinda do inglês *natural killer* (NK), ou pela atuação

das células T CD8⁺ e CD4⁺. Todavia, já foi demonstrado que a IL-10 pode ser também enquadrada como um dos fatores responsáveis por provocar a imunossupressão da imunidade anticancerígena, sendo este fenômeno desencadeado pela atuação desta citocina como um mediador negativo do *cross-talk* entre a imunidade antitumoral inata e adaptativa, ou ainda por atuar como um potente inibidor das células dendríticas (ABBAS *et al.*, 2015; ALAS *et al.*, 2011; HAMIDULLAH *et al.*, 2011; KUNDU *et al.*, 1996; MOCELLIN *et al.*, 2005).

Contudo, apesar da grande quantidade de estudos, ainda não foram elucidadas todas as funções do processo inflamatório no câncer de mama, assim como também não se tem dados conclusivos sobre as implicações da inflamação no prognóstico desta doença (ALI *et al.*, 2014; GU-TRANTIEN *et al.*, 2013; LOI *et al.*, 2013; WULANINGSIH *et al.*, 2015). Desta forma, é de suma importância que estudos mais detalhados sejam conduzidos, a fim de demonstrar, de forma mais concreta, a atuação dos diversos mediadores inflamatórios, tais como as interleucinas e o fator de necrose tumoral, no câncer de mama, possibilitando ainda a identificação da possível capacidade de os mesmos atuarem como potenciais marcadores de prognóstico e diagnóstico do câncer de mama.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar as diferenciações nos níveis transcricionais de marcadores inflamatórios, em pacientes com câncer de mama submetidas ou não à quimioterapia no HC-UFU, visando melhor compreender a atuação da inflamação no câncer de mama.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as características clínicas, hormonais e terapêuticas em pacientes diagnosticadas com câncer de mama;

- Determinar a expressão transcricional, por meio de PCR em tempo real, das interleucinas 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), assim como também do fator de necrose tumoral (TNF α), em sangue periférico de pacientes com câncer de mama antes de iniciarem a quimioterapia e pacientes que já se encontravam em quimioterapia;
- Correlacionar os resultados da expressão gênica com os dados clínicos das pacientes.

3. METODOLOGIA

3.1. Triagem das Pacientes

O estudo foi conduzido com mulheres que recorreram ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) durante os anos de 2013 a 2015, para a realização de cirurgia de mama, e que apresentaram após a biópsia resultado positivo para o câncer de mama. As mulheres com câncer de mama e que se encontravam em quimioterapia também foram convidadas a participar do estudo. As pacientes foram convidadas a participar voluntariamente do estudo enquanto aguardavam a realização da cirurgia ou durante a quimioterapia, sendo informadas sobre a metodologia da pesquisa e posteriormente solicitadas a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (CEP), registrado sob o número de protocolo 1.080.288/2015 (Anexo B). Além disto, todo o projeto foi realizado segundo os padrões da Declaração de Helsinki.

As mulheres participantes responderam a um Questionário Socioeconômico e Clínico (QSEC) (Apêndice B). Dentre as perguntas realizadas para preenchimento do mesmo, destacam-se a existência de um histórico clínico prévio de doença na mama, assim como o histórico de câncer de mama familiar. Além disto, foram coletadas informações referentes ao estado de saúde das pacientes, avaliando-se desta forma a existência de qualquer disfunção

envolvendo desde alergias até condições crônicas e hormonais. O histórico cirúrgico, prática de atividade física, tabagismo e etilismo, também foram questionados.

Os fatores de exclusão adotados no estudo abrangiam casos de pacientes que já apresentaram um histórico individual de qualquer outro tipo de câncer, ou um padrão citopatológico de malignidade suspeito ou indeterminado, de modo que estas mulheres foram excluídas e/ou não foram convidadas a participar da pesquisa. Sendo assim, foram incluídas mulheres com idade superior a 18 anos e com capacidade física, mental e cognitiva para responder ao QSEC.

As pacientes participantes foram categorizadas em dois grupos, pacientes não submetidas a nenhum tratamento antineoplásico, advindas do centro cirúrgico do HC-UFU, e pacientes submetidas a quimioterapia. O sangue periférico das mulheres participantes do estudo foi coletado por um profissional capacitado, no momento que a paciente foi encaminhada para a realização da cirurgia no centro cirúrgico, ou durante a realização da quimioterapia. O sangue foi coletado em tubo tipo *vacutainer TM* contendo K₂EDTA 7,2mg, sendo posteriormente armazenado a -4°C na câmara fria do Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, onde permaneceu até o processamento e a análise transcricional de genes específicos.

A classificação patológica das neoplasias malignas da mama foi realizada em conformidade com a sexta edição do Sistema TNM (extensão do tumor primário [T], metástase em linfonodo regional [N], metástase a distância [M]), da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (GREENE *et al.*, 2002) (Anexo A). Contudo, não foi possível realizar a classificação TNM patológica (pTNM) para todas as pacientes participantes do estudo, visto que algumas das mulheres, enquadradas no grupo câncer de mama submetidas a tratamento antineoplásico, realizaram quimioterapia neoadjuvante, não havendo desta forma a realização prévia de intervenção cirúrgica, ocasionando na não existência de material a ser analisado

para proceder-se com a classificação. Além disto, devido à grande quantidade de casos não relatados, a categoria metástase a distância (pM) não foi avaliada para nenhum dos dois grupos.

Informações como o tipo histológico do tumor e a imunohistoquímica dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP), HER2 e Ki67, foram obtidas por meio da análise dos laudos do exame anatomopatológico, descritos no prontuário das pacientes. A partir destas informações, foi possível classificar o fenótipo molecular das neoplasias malignas da mama, a classificação foi feita de acordo com os estudos de Li *et al.* (2015) e Toss e Cristofanilli (2015), em luminal A, luminal B, HER2 e triplo negativo (Anexo A). Todos os dados advindos desta busca, assim como também as informações provenientes do preenchimento do QSEC, foram compilados e arquivados em uma planilha, a fim de posteriormente serem empregados nas análises estatísticas.

3.2. Extração do RNA total do sangue periférico, Transcrição Reversa e qPCR

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas por um período de 15 minutos, a temperatura de 4°C e rotação de 4000rpm. Ao final deste processo, obteve-se a formação de uma pequena camada de leucócitos e a separação do plasma sanguíneo, sendo este último transferido para um microtubo e armazenado à -20°C para realização de futuras análises.

A camada de leucócitos foi transferida para um tubo Falcon de 15mL, no qual adicionou-se 500µL de água DEPC. Posteriormente, a mistura foi invertida delicadamente até que se obtivesse uma homogeneização total. Em sequência, adicionou-se 3mL do reagente Trizol, encaminhando assim as misturas para agitação no Vórtex. A amostra provinda da agitação foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, a fim de possibilitar a completa dissociação do complexo nucleoproteína.

Subsequentemente, adicionou-se 800µL de clorofórmio e a mistura foi novamente agitada e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra foi encaminhada para uma centrifugação de 15 minutos, a temperatura de 4°C e rotação de 2000xg. Após a centrifugação, transferiu-se 750µl da fase aquosa formada, junto a 750µl de Isopropanol, para um microtubo de 1.5mL. A mistura foi invertida delicadamente, até que se obtivesse uma homogeneização total, sendo posteriormente armazenada a -20°C por no mínimo 24 horas.

Concluído o tempo mínimo de 24 horas, a amostra foi então centrifugada, por um período de 15 minutos, a temperatura de 4°C e rotação de 12000xg. Em seguida, o sobrenadante formado foi descartado e a amostra foi lavada com Etanol 75%, sendo este processo de lavagem repetido no mínimo duas vezes.

Para a lavagem, empregou-se a centrifugação da amostra a uma rotação de 7500xg por um período de 5 minutos, descartado subsequentemente o sobrenadante. Posteriormente, deixou-se o *pellet* de RNA obtido, secar por um período de 10 minutos, sendo em seguida ressuspendido em 30µl de água DEPC. Do total obtido, alíquotou-se 5µl, dos quais 2µl foram destinados para a quantificação da amostra e 3µl para a realização da eletroforese em gel de agarose. Todas as alíquotas foram armazenadas a -80°C.

O produto da extração foi quantificado e avaliado por meio de leitura espectrofotométrica a 260nm. Paralelamente, o produto da extração também foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, realizada em tampão TBE (45mM Tris-borato – pH 8,3 e 1mM EDTA). O perfil eletroforético foi visualizado em luz UV após uma hora à 110volts, sendo este documentado em sistema ImageSystem – VDS (Amersham Biosciences), a fim de proporcionar assim a avaliação da qualidade do RNA extraído.

Para a transcrição reversa foi utilizado 10µL de RNA total, 0.25µL de inibidor de RNase (Invitrogen), 0.2µL de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 4µL de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 0.4µL de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP), 0.5µL

de DTT e 1µL de *primer*. A solução foi incubada no Termociclador PTC-100 (MJ Research) à 37°C por uma hora. Reações controle, não contendo RNA, foram realizadas, a fim de verificar a presença de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA obtido, foi estocado à -20°C para posterior amplificação.

A qualidade do cDNA foi avaliada pela amplificação de um fragmento de 536 pares de bases do gene constitutivo β -2-Microglobulina (B2M). Para esta reação foram utilizados Tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, glicerol 50% v/v), 0.4µL de dNTPs (Invitrogen), 1µL de *primer* (Invitrogen), 0.2µL de Platinum®Taq DNA polymerase (Invitrogen), 0.75µL de MgCl₂ (Invitrogen). Cada reação foi processada nas seguintes condições no Termociclador-PTC-100 (MJ Research Inc.): 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 59°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos e 72°C por 10 minutos. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

Para se estabelecer o perfil transcricional dos marcadores IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α , foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores para cada uma das sequências gênicas e para o gene endógeno B2M (Tabela 1). Foram empregados oligonucleotídeos, capazes de flanquear fragmentos nos tamanhos de 50 a 150 pares de base, e que foram considerados viáveis quantos aos padrões de amplificação segundo o software Primer Express versão 3.0 (Applied Biosystems). A especificidade dos oligonucleotídeos foi primeiramente avaliada em PCR convencional, para posteriormente serem utilizados na PCR em tempo real (qPCR).

As quantificações transcricionais relativas dos genes alvos (IL-1 β ; IL-6; IL-10; TNF α) em relação ao gene endógeno (B2M) foram estimadas por meio de qPCR a partir do cDNA obtido. As amostras foram amplificadas em duplicata e a detecção ocorreu a partir da emissão de fluorescência do corante de SYBRGreen, de acordo com o uso do kit Master Mix SYBR®Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems).

Tabela 1. Sequência dos *primers* empregados na qPCR.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
B2M	B2M F: AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA
	B2M R: TGTGATGTTGGATAAGAGAA
IL-1 β	IL-1 β F: ACAGGATATGGAGCAACAAGTGG
	IL-1 β R: GGGCTTATCATCTTTCAACACGC
IL-6	IL-6 F: GATTCCAAAGATGTAGCCGCC
	IL-6 R: ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC
IL-10	IL-10 F: ACCCACTTCCCAGGCAACC
	IL-10 R: TGGCAACCCAGGTAACCCTT
TNF α	TNF α F: CAGGCGGTGCTTGTTCTT
	TNF α R: GGGGTTCGAGAAGATGATCTGAC

Legenda: F – *primer forward*; R – *primer reverse*.

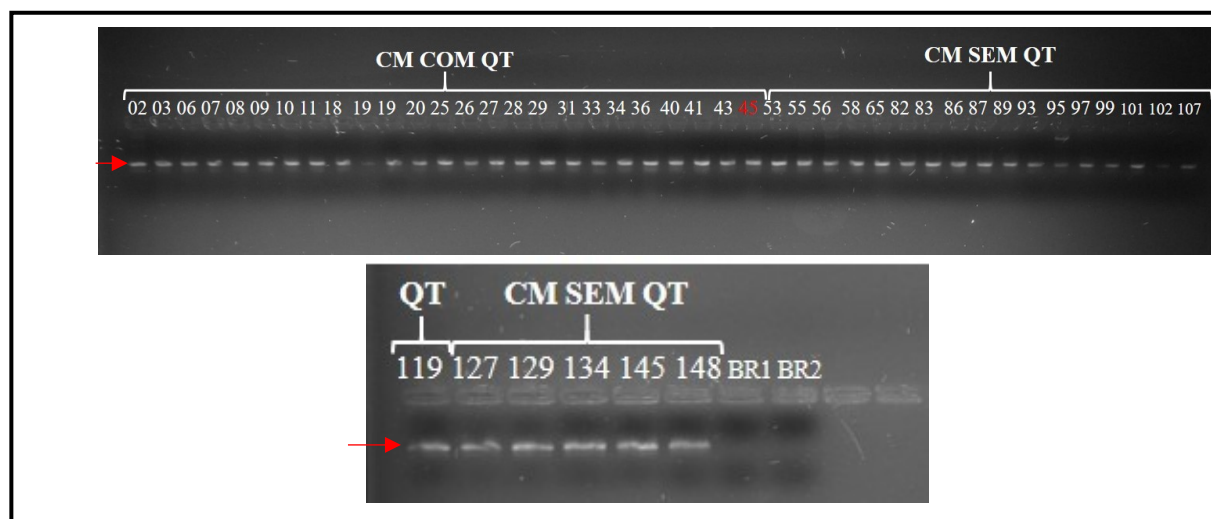
3.3. Análises Estatísticas

Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. A partir do comportamento das variáveis, realizou-se testes paramétricos para variáveis com distribuição normal, ou testes não-paramétricos para variáveis sem distribuição normal. Para comparação dos níveis transcricionais dos genes alvo nos grupos estabelecidos, foi empregado o Teste de Mann-Whitney, ou Teste T para amostras independentes. Foi considerado o intervalo de confiança de 95% e 99%, sendo os valores de $p < 0.05$ e $p < 0.01$ considerados como estatisticamente significantes. Foram construídos gráficos de boxplot para a identificação de valores *outliers* e pontos extremos, de modo que os valores extremos, acima de 3 interquartis, foram excluídos do estudo, e os valores *outliers*, entre 1.5 e 3 interquartis, foram mantidos. Além disto, aplicou-se o modelo de equações de estimativas generalizadas (EEG), a fim de verificar a diferença entre as médias dos níveis transcricionais de IL-1 β para os quatros subtipos moleculares analisados (Luminal A; Luminal B; HER2; Triplo Negativo). As análises estatísticas foram executadas no SPSS Statistics versão 21.0 (SPSS, IBM, Chicago, IL, USA).

4. RESULTADOS

A qualidade do cDNA, resultante da transcrição reversa, foi avaliada pela amplificação de um fragmento de 536 pares de bases do gene constitutivo β -2-Microglobulina (B2M) com as amostras advindas tanto do grupo câncer de mama sem quimioterapia quanto do grupo câncer de mama com quimioterapia (Figura 4). A amostra identificada pela numeração 45, do grupo de pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia, não foi empregada no estudo devido a quantidade de RNA não ter sido suficiente para realizar qPCR com todos os marcadores inflamatórios alvos. Além disto, a amostra 134, do grupo câncer de mama sem quimioterapia, foi excluída do estudo pelo fato de coincidir com a amostra 36 do grupo câncer de mama com quimioterapia, ou seja, a mesma não foi empregada nas análises pelo fato de se tratar da mesma paciente, a qual foi entrevista em momentos diferentes do estudo, mantendo-se desta forma somente a amostra 36 do grupo câncer de mama com quimioterapia.

Figura 4. Representação da eletroforese em gel de agarose 1,5% para avaliação da qualidade do cDNA.



Fonte: A autora.

Legenda: Amplificação do fragmento de 536 pb (indicado pela seta) do gene B2M em amostras de sangue. BR1 – Branco da Transcrição Reversa; BR2 – Branco da PCR; 02-45 e 119 – cDNA das amostras do grupo câncer de mama submetidas a quimioterapia; 53-148 – cDNA das amostras do grupo de câncer de mama não submetidas a quimioterapia.

4.1. Características das pacientes

O estudo avaliou inicialmente 45 pacientes, 21 diagnosticadas com câncer de mama, mas que ainda não foram submetidas a quimioterapia (CM sem QT), e 24 diagnosticadas com câncer de mama submetidas a quimioterapia (CM com QT). A idade média das mulheres participantes equivalia a 50.2 ± 10.8 anos, tendo a idade mínima equivalente a 32 anos e idade máxima a 77 anos.

Os dados clínicos, hormonais e terapêuticos encontram-se descritos na Tabela 2. Três pacientes das 45 (6.7%) apresentaram tumor *in situ*, 7 pacientes (15.6%) foram classificadas como T1 e 16 pacientes (35.5%) apresentaram tumores T2/T3, além disto, 5 pacientes (11.1%) não tiveram o tamanho tumoral relatado. Quatorze mulheres (31.1%) apresentaram linfonodos negativos para a patologia (N0), 7 pacientes (15.6%) tiveram de um a três linfonodos positivos (N1) e 4 pacientes (8.9%) apresentaram mais de três linfonodos positivos para a presença de células tumorais (N2/N3). É válido ressaltar, que em 11 pacientes (24.4%) não foi possível classificar o tamanho do tumor (T) e a presença de metástase em linfonodos regionais (N), devido ao fato destas mulheres encontraram-se em tratamento neoadjuvante, e por não terem sido submetidas a procedimento cirúrgico, não havendo desta forma material para classificação do pTNM.

Quatro pacientes das 45 (8.9%) apresentaram grau histológico tumoral 1 (G1), 21 pacientes (46.7%) apresentaram grau 2 (G2), 10 pacientes (22.2%) grau histológico 3 (G3), e 10 pacientes (22.2%) não apresentaram relatos do grau histológico do tumor. No tipo histológico do tumor, detectou-se 42 pacientes (93.4%) com carcinoma ductal, 1 paciente (2.2%) com carcinoma lobular e 1 paciente (2.2%) com carcinoma medular, de modo que para 1 paciente (2.2%) a classificação do tumor não foi relatada.

Nos resultados da pesquisa imunohistoquímica dos receptores foi observado, 15 pacientes (33.3%) com *status* negativo para o receptor de estrogênio e 28 pacientes (62.2%) com *status*

positivo, assim como, 19 voluntárias (42.2%) com *status* negativo para o receptor de progesterona e 24 pacientes (53.3%) com *status* positivo. Além disto, vinte e sete voluntárias (60%) foram classificadas como negativas para o receptor HER2, e 16 pacientes (35.5%) como positivas para este mesmo receptor. O antígeno Ki67 apresentou uma coloração positiva em menos de 14% das células tumorais em 15 pacientes (33.3%) e mais de 14% em 28 pacientes (62.2%). A análise imunohistoquímica dos receptores de estrógeno, progesterona, HER2 e Ki67 para 2 mulheres das 45 (4.5%) não foi relatada. Em relação ao fenótipo molecular detectou-se 10 pacientes (22.2%) com luminal A, 19 pacientes (42.2%) com luminal B, 7 pacientes (15.6%) com subtipo molecular HER2 do tumor, e 7 pacientes (15.6%) com triplo negativo, além disto, o fenótipo molecular de 2 pacientes (4.5%) não foi relatado.

É válido ressaltar que todas estas variáveis clínicas, hormonais e terapêuticas, foram também subdivididas e analisadas de acordo com os dois grupos estabelecidos, câncer de mama com quimioterapia e sem quimioterapia (Tabela 2).

Tabela 2. Características clínicas, hormonais e terapêuticas em pacientes com câncer de mama.

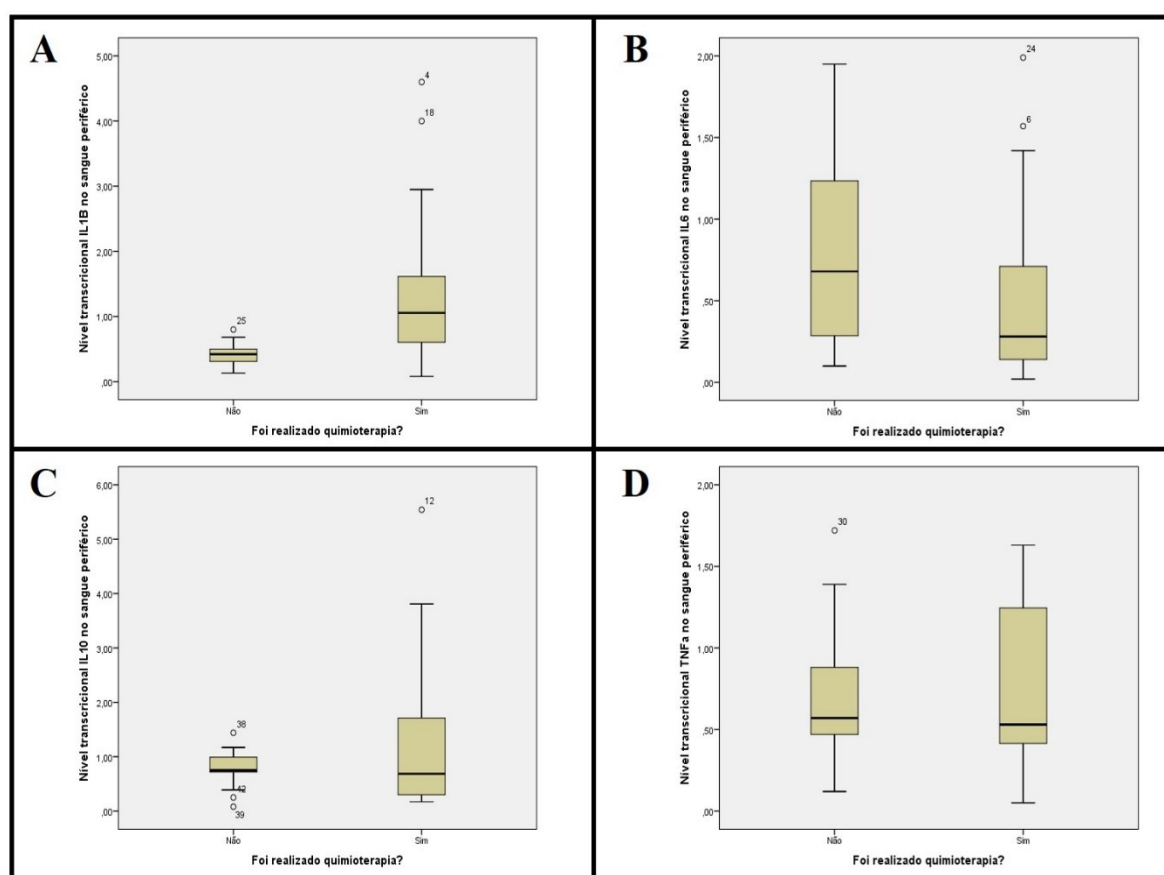
Variável	Pacientes (n=45)		CM sem QT		CM com QT	
	N	%	N	%	N	%
Idade (anos)						
Média ± DP	50.2 ± 10.8		48.6 ± 9.6		52 ± 12	
Tamanho do Tumor						
pTx	3	6.7	2	4.5	1	2.2
pTis	3	6.7	3	6.7	0	0
pT1	7	15.6	2	4.5	5	11.1
pT2	15	33.3	8	17.7	7	15.6
pT3	1	2.2	1	2.2	0	0
pT4	0	0	0	0	0	0
NR	5	11.1	0	0	5	11.1
Ausente	11	24.4	0	0	11	24.4
Linfonodos Regionais						
pNx	9	20	6	13.3	3	6.7
pN0	14	31.1	9	20	5	11.1
pN1	7	15.6	4	8.9	3	6.7
pN2	2	4.4	1	2.2	1	2.2
pN3	2	4.4	1	2.2	1	2.2
Ausente	11	24.4	0	0	11	24.4
Grau Histológico						
G1	4	8.9	1	2.2	3	6.7
G2	21	46.7	8	17.7	13	29
G3	10	22.2	3	6.7	7	15.6
NR	10	22.2	9	20	1	2.2
Tipo Histológico						
Carcinoma Ductal	42	93.4	19	42.2	23	51.2
Carcinoma Lobular	1	2.2	0	0	1	2.2
Carcinoma Medular	1	2.2	1	2.2	0	0
NR	1	2.2	1	2.1	0	0
Status RE						
Negativo	15	33.3	7	15.6	8	17.7
Positivo	28	62.2	12	26.6	16	35.6
NR	2	4.5	2	4.5	0	0
Status do RP						
Negativo	19	42.2	11	24.4	8	17.7
Positivo	24	53.3	8	17.7	16	35.6
NR	2	4.5	2	4.5	0	0
Status HER2						
Negativo	27	60	10	22.2	17	37.8
Positivo	16	35.5	9	20	7	15.5
NR	2	4.5	2	4.5	0	0
Ki67						
≤14%	15	33.3	5	11.1	10	22.2
>14%	28	62.2	14	31.1	14	31.1
NR	2	4.5	2	4.5	0	0
Fenótipo Molecular						
Luminal A	10	22.2	4	8.9	6	13.3
Luminal B	19	42.2	8	17.7	11	24.4
HER2	7	15.6	5	11.1	2	4.5
Triplo Negativo	7	15.6	2	4.5	5	11.1
NR	2	4.5	2	4.5	0	0
Quimioterapia						
Não	21	46.7	21	46.7	0	0
Sim	24	53.3	0	0	24	53.3

Legenda: Ausente – pacientes em quimioterapia neoadjuvante e que ainda não foram submetidas a nenhuma intervenção cirúrgica na mama; NR – não relatado.

4.2. Níveis Transcricionais dos Marcadores Inflamatórios Alvos

Antes de proceder-se para as análises dos níveis transcricionais dos marcadores inflamatórios alvos, construiu-se gráficos de boxplot, a fim de assim identificar a presença de valores *outliers* e pontos extremos (Figura 5). Devido ao tamanho amostral, excluiu-se do estudo apenas os pontos extremos, acima de três interquartis, mantendo desta forma os valores *outliers*, entre um e meio e três interquartis (Tabela 3).

Figura 5. Gráfico boxplot para identificação de valores extremos e *outliers*.



Fonte: A autora.

A – Gráfico boxplot IL-1β; **B** – Gráfico boxplot IL-6; **C** – Gráfico boxplot IL-10; **D** – Gráfico boxplot TNFα.

Tabela 3. Valores extremos obtidos da análise dos gráficos de boxplot.

Marcadores Inflamatórios	Valores Extremos
IL-1β	QT24; QT34; M55; M56; M82; M93; M95
IL-6	QT06; QR29; M53; M55; M93
IL-10	QT07; QT27; QT33; QT34; M55; M56; M82; M95
TNFα	QT02; QT07; QT27; QT33; QT34; QT41; M55; M56; M101

Legenda: QT – grupo câncer de mama com quimioterapia; M – grupo câncer de mama sem quimioterapia.

Além disto, não foi possível determinar o nível transcricional de todos os marcadores inflamatórios alvos (IL-1 β ; IL-6; IL-10; TNF α) para as quarenta e cinco pacientes participantes, visto que em alguns casos teve-se erros na leitura da amostra pelo equipamento durante o processamento da qPCR. Frente a isto, inicialmente analisou-se somente a frequência dos quatro marcadores inflamatórios alvos em pacientes diagnosticadas com câncer de mama, isto é, nesta análise não considerou-se a divisão em submetidas ou não a quimioterapia (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis transcricionais dos marcadores inflamatórios em pacientes com câncer de mama (Mediana/média e Percentis/DP).

Marcadores Inflamatórios	N	Mediana (p25-p75) Média $\pm$ DP
IL-1 β ^a	34	0.99 (0.18)
IL-6	38	0.61 (0.18-0.98)
IL-10	36	0.74 (0.41-1.15)
TNF α	27	0.57 (0.40-1.24)

Legenda: ^a Distribuição normal.

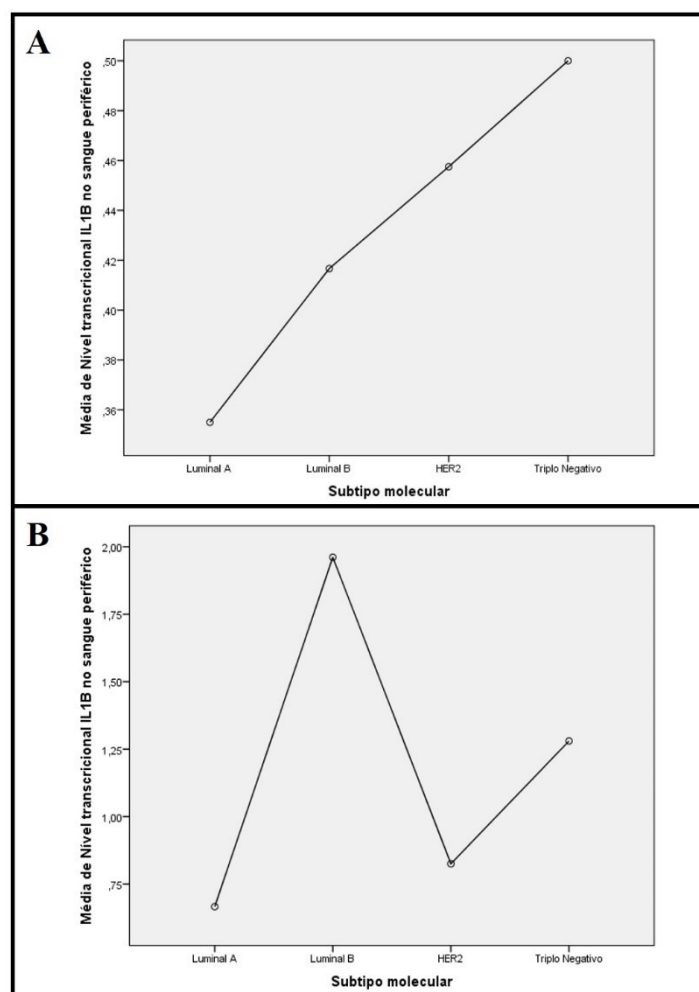
Posteriormente, procedeu-se com a divisão das pacientes em, não submetidas a quimioterapia (CM sem QT), e pacientes que encontram-se em quimioterapia (CM com QT). Através da comparação dos níveis transcricionais entre estes dois grupos, foi verificada significância estatística ($p \leq 0.05$ e $p < 0.01$) para os marcadores inflamatórios IL-6 e IL-1 β respectivamente. Além disto, verificou-se níveis transcricionais mais elevados para todos os marcadores inflamatórios no grupo câncer de mama sem quimioterapia em relação ao grupo câncer de mama com quimioterapia, sendo que a IL-1 β foi o único marcador a apresentar resultados opostos a este (Tabela 5). Frente a isto, a fim de melhor compreender o resultado obtido para IL-1 β , plotou-se inicialmente gráficos que estabelecem uma associação entre a média dos níveis transcricionais de IL-1 β com o subtipo molecular do tumor, para cada uma das amostras em ambos os grupos estudados (Figura 6), e posteriormente realizou-se a análise de EEG para comprovação da significância estatística dos resultados obtidos (Tabela 6).

Tabela 5. Níveis transcricionais dos marcadores inflamatórios (Mediana/média e Percentis/DP).

Marcadores Inflamatórios	N	CM sem QT		CM com QT		Valor de p
		Mediana (p25-p75)/ Média ± DP	N	Mediana (p25-p75)/ Média ± DP	N	
IL-1 β ²	14	0.43 (0.05)	20	1.39 (0.28)	20	0.003**
IL-6 ¹	16	0.68 (0.28-1.24)	22	0.28 (0.14-0.73)	22	0.050*
IL-10 ¹	16	0.75 (0.71-1.03)	20	0.69 (0.29-1.77)	20	0.466
TNF α ¹	12	0.57 (0.44-0.94)	15	0.53 (0.40-1.25)	15	0.401

Legenda: ¹Mann-Whitney; ²Amostras independentes Teste-t; **p<0.01; *p≤0.05.

Figura 6. Gráfico de associação da média dos níveis transcricionais de IL-1 β com o subtipo molecular do tumor.



Legenda: **A** – Amostras do grupo câncer de mama sem quimioterapia; **B** – Amostras do grupo câncer de mama com quimioterapia.

Tabela 6. Análise de EEG para o marcador IL-1 β .

(I) Subtipo Molecular	(J) Comparação	CM sem QT	CM com QT
		Diferença Média (I-J)	Diferença Média (I-J)
Luminal A	Luminal B	-0.062 ^a	-1.295 ^a
	HER2	-0.103 ^a	-0.159 ^a
	Triplo Negativo	-0.145 ^a	-0.614 ^a
Luminal B	Luminal A	0.062 ^a	1.295 ^a
	HER2	-0.041 ^a	1.136 ^a
	Triplo Negativo	-0.083 ^a	0.681 ^a
HER2	Luminal A	0.103 ^a	0.159 ^a
	Luminal B	0.041 ^a	-1.136 ^a
	Triplo Negativo	-0.043 ^a	-0.455 ^a
Triplo Negativo	Luminal A	0.145 ^a	0.614 ^a
	Luminal B	0.083 ^a	-0.681 ^a
	HER2	0.043 ^a	0.455 ^a

Legenda: ^aA diferença média é estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

No gráfico de associação da média dos níveis transcricionais de IL-1 β com os subtipos moleculares das amostras do grupo câncer de mama sem quimioterapia (Figura 6.A), observou-se um crescente aumento entre as médias dos níveis transcricionais desta interleucina à medida que tinha-se um fenótipo molecular mais agressivo. Já no gráfico do grupo câncer de mama com quimioterapia (Figura 6.B), notou-se uma oscilação entre as médias dos níveis transcricionais frente aos subtipos moleculares analisados. Através da análise de EEG foi comprovada a veracidade estatística dos resultados descritos nos gráficos, visto que todos os subtipos moleculares apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$) quando se comparou as médias obtidas para cada um deles.

5. DISCUSSÃO

A inflamação tem sido descrita como um importante fator na iniciação, progressão e angiogênese tumoral. Neste sentido, diversas citocinas e outras células do sistema

imunológico vem sendo sugeridas como potenciais marcadores tumorais (GOLDBERG & SCHWERTFEGER, 2010). No presente estudo verificou-se que a quimioterapia influencia os níveis transcricionais das interleucinas 6 e 1 β . Além disto, foi constatado que o padrão transcricional da IL-1 β é significativamente alterado de acordo com o fenótipo molecular do tumor.

A interleucina 6 (IL-6) apresentou níveis transcricionais significativamente mais elevados no grupo câncer de mama sem quimioterapia quando comparado ao grupo câncer de mama com quimioterapia. Os nossos resultados encontram-se de acordo com a literatura, uma vez que já foi relatada a presença de uma concentração mais elevada de IL-6 em soro de pacientes com câncer de mama antes de iniciarem a quimioterapia, inferindo que o mesmo acontece no sangue periférico (KOZLOWSKI *et al.*, 2003;). Neste sentido, foi estabelecida uma associação entre o elevado nível transcricional de IL-6, com piores prognósticos para o câncer de mama, e a uma baixa responsividade à quimioterapia. Supõem-se ainda, que o decréscimo no nível transcricional desta mesma citocina no grupo câncer de mama com quimioterapia, seja um indicativo que o tratamento está eliminando as células tumorais e consequentemente ocasionando em uma menor liberação de IL-6. Desta forma, acredita-se que a IL-6 pode vir a ser empregada como um potencial marcador da eficácia da quimioterapia (KOZLOWSKI *et al.*, 2003; YOKOE *et al.*, 2000; ZHANG & ADACHI, 1999).

Apesar de não ter apresentado significância estatística, a interleucina 10 (IL-10) também apresentou níveis transcricionais mais elevados no grupo câncer de mama sem quimioterapia em comparação ao grupo câncer de mama com quimioterapia, estando desta forma de acordo com os dados relatados na literatura. A IL-10, apesar de ser uma citocina anti-inflamatória, vem sendo nos últimos anos, associada ao desenvolvimento de algumas neoplasias, tal como o câncer de mama, devido a sua atuação pró-tumoral. Sendo assim, ela é

caracterizada como um dos fatores responsáveis por desencadear a imunossupressão da imunidade antitumoral. Frente a isto, uma série de estudos têm descrito a presença de concentrações mais elevadas desta citocina tanto no soro quanto no tecido de pacientes com câncer de mama (ABRANCHES *et al.*, 2011; HAMIDULLAH *et al.*, 2011; KOSLOWSKI *et al.*, 2003). Acredita-se que a não significância dos resultados da interleucina 10 seja proveniente da correlação inversa existente entre esta citocina e a IL-6, como é descrito no estudo de Koslowski *et al.* (2003), no qual elevadas concentrações sorológicas de IL-10 em mulheres com câncer encontra-se correlacionada, nas mesmas circunstâncias, à baixas concentrações de IL-6. Sendo assim, supõe-se que o nível transcricional da IL-6, por estar muito próximo do nível transcricional da IL-10 no grupo câncer de mama sem quimioterapia, está de certa forma interferindo e mascarando o verdadeiro resultado (MOCELLIN *et al.*, 2005).

O fator de necrose tumoral (TNF α), é descrito como uma citocina pró-inflamatória, a qual é encontrada em concentrações mais elevadas em pacientes com câncer de mama em relação a pacientes saudáveis, sendo assim comumente associado ao desenvolvimento e a migração do tumor no microambiente tumoral (HAMED *et al.*, 2012; LEEK *et al.*, 1998; KAMEL *et al.*, 2012; KNÜPFER *et al.*, 2006). Todavia, esta citocina não apresentou diferença significativa entre os dois grupos analisados, câncer de mama com e sem quimioterapia. Acredita-se que a não significância deste resultado esteja associada tanto ao tipo histológico dos tumores analisados, pois como descrito na pesquisa de Cui *et al.* (2008) a expressão de TNF α é significativamente maior nos carcinomas micropapilares em comparação aos carcinomas ductais, assim como também devido ao fato de que uma porcentagem das pacientes encontravam-se em quimioterapia, visto que estudos como o de Cruz *et al.* (2013) já identificaram um aumento na expressão de TNF α em pacientes com câncer de mama que encontram-se em quimioterapia, correlacionando ainda esta alta

expressão a condições de fadiga induzida pelo tratamento (ESQUIVEL-VELÁZQUEZ *et al.*, 2015; GOLDBERG & SCHWERTFEGGER, 2010). Logo, infere-se que a não significância estatística seja decorrente do fato de que das 45 voluntárias participantes do presente estudo, 42 pacientes (93.4%) apresentavam carcinoma ductal, e 24 mulheres (53.3%) estavam realizando quimioterapia.

A interleucina 1β (IL- 1β) por sua vez, apresentou níveis transcricionais significativamente mais elevados no grupo câncer de mama com quimioterapia em relação ao grupo câncer de mama sem quimioterapia (APTE *et al.*, 2006; GOLDBERG & SCHWERTFEGGER, 2010). Estudos como o de Fouad *et al.* (2014) e Knüpfer *et al.* (2006), já demonstram que em carcinomas de mama invasivos, tem-se uma elevada expressão de IL- 1β , com um decréscimo de expressão nos carcinomas *in situ* e lesões benignas da mama, além disto, demonstraram que altos níveis tumorais e sorológicos de IL- 1β , em neoplasias da mama de grau mais avançado, encontram-se usualmente correlacionados a outras variáveis, tais como alto grau histológico tumoral, presença do *status* negativo para o receptor de estrógeno e elevada expressão de outras citocinas pró-inflamatórias. Portanto, supõe-se que os níveis transcricionais de IL- 1β não foram tão elevados no grupo câncer de mama sem quimioterapia, quando comparados aos demais marcadores inflamatórios avaliados, pelo fato de que 64.4% das mulheres participantes (n=29) apresentaram fenótipo molecular tumoral equivalente a luminal A/luminal B, que são categorizados como subtipos moleculares menos agressivos da enfermidade. Esta hipótese é sustentada pelos resultados obtidos na análise de EEG e no gráfico plotado (Figura 6.A), visto que nestes subtipos moleculares tem-se uma menor média transcricional quando comparada aos fenótipos HER2 e triplo negativo, sendo estes resultados estatisticamente significativos ($p < 0.05$). Além disto, acredita-se que a maior expressão de IL- 1β no grupo câncer de mama com quimioterapia esteja relacionada ao papel já descrito na literatura desta citocina em aumentar a citotoxicidade, e a capacidade de desencadear a morte da

célula tumoral, do agente quimioterápico (JOHNSON, 1993; TRIOZZI & ALDRICH, 2010). Contudo, infere-se que esta capacidade da IL-1 β é limitada pelo fenótipo molecular tumoral, visto que de acordo com a análise de EEG e do gráfico plotado para o grupo câncer de mama com quimioterapia (Figura 6.B), foi constatada uma oscilação significativa entre as médias dos níveis transcricionais desta interleucina em relação aos subtipos moleculares analisados, tendo o fenótipo molecular luminal B como mais contrastante. Desta forma, são ainda necessários estudos mais detalhados, a fim de identificar os fatores responsáveis por ocasionar nesta alteração do perfil transcricional do subtipo molecular luminal B quando o mesmo é analisado em situações em que se tem o emprego da quimioterapia.

6. CONCLUSÃO

Foi verificado no estudo, que a expressão transcricional do marcador IL-6 é significativamente maior no grupo câncer de mama sem quimioterapia em relação ao grupo câncer de mama com quimioterapia, sugerindo desta forma que as células tumorais estão realmente sendo eliminadas. Além disto, obteve-se um aumento significativo nos níveis transcricionais de IL-1 β no grupo câncer de mama com quimioterapia, fortalecendo desta forma o ideal de que esta citocina encontra-se relacionado ao aumento da citotoxicidade e da eficácia do agente quimioterápico. Logo, ambos os marcadores, IL-6 e IL-1 β , apresentam potencial para serem empregados como possíveis marcadores da eficiência da quimioterapia.

Por meio da avaliação das variáveis clínicas e hormonais das mulheres com câncer de mama, submetidas ou não a quimioterapia, foi também possível estabelecer-se uma correlação entre o crescente aumento dos níveis transcricionais de IL-1 β com a agressividade do subtipo molecular do tumor no grupo câncer de mama sem quimioterapia, comprovando assim que o nível transcricional desta interleucina tende a aumentar com a agressividade tumoral, e que há uma oscilação neste padrão transcricional quando a paciente encontra-se em quimioterapia.

7. PERSPECTIVAS

Almeja-se aumentar o número de participantes do estudo para ambos os grupos, câncer de mama sem quimioterapia e câncer de mama com quimioterapia, acrescentando ainda um novo grupo contendo pacientes diagnosticadas com doença benigna da mama. O aumento do tamanho amostral e dos grupos poderá contribuir para a elucidação da função pregressa da inflamação no câncer de mama, e o potencial destas moléculas inflamatórias como marcadores prognósticos da doença. Além disto, pretende-se analisar estes marcadores inflamatórios não somente no sangue periférico, como também no soro e no tecido das pacientes participantes. Estas novas análises serão conduzidas durante o mestrado da presente autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade Tumoral. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 7. ed., Rio de Janeiro, cap. 17, p. 389-405, 2012.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade aos Tumores. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8. ed., Rio de Janeiro, cap. 18. p. 832-66, 2015.

ABRANCHES, M. V. et al. Antioxidant vitamins and cytokines are altered in breast cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, [S.I], v. 20, p.403-10, 2011.

ALAS, S.; EMMANOUILIDES, C.; BONAVIDA, B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 3, p. 709-23, 2001.

ALI, H. R. et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. **Ann. Oncol.**, v. 25, p. 1536-43, 2014.

ALMEIDA, J. R. C. et al. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 53, p. 305-16, 2007.

AMBROSONE C. B. Oxidants and Antioxidants in Breast Cancer. **Antioxid Redox Sign**, v. 2 p. 903-17, 2000.

APTE, R. N. et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer Metastasis Ver**, [S.I], v. 25, p.387-408, 2006.

BALKWILL F.; MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **Lancet**, p.539-45, 2001.

BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio: reverter o câncer. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 184, p. 50-7, 2002.

BONASSA E. M. A. Enfermagem em quimioterapia. **Atheneu**, São Paulo, p.277, 1992.

CIERNA, Z. et al. Matrix metalloproteinase 1 and circulating tumor cells in early breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, p. 472, 2014.

COELHO, B. A. Avaliação da Resposta Inflamatória em Mulheres com Câncer de Mama. Dissertação (Mestrado) - **Curso de Medicina**, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, p. 1-69, 2013.

CRUZ, F. M. et al. Quimioterapia induz fadiga e aumenta TNF- α em pacientes com câncer de mama. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 9, n. 32, p.52-4, 2013.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M. et al. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, [S.I.], v. 35, n. 1, p.1-16, 2015.

FOUAD, T. M et al. The Role of Inflammation in Inflammatory Breast Cancer. In: AGGARWAL, B. B; SUNG, B.; GUPTA, S. C. **Inflammation and Cancer**, [S.I.]: Springer, p. 58-60, 2014.

GOLDBERG, J. E.; SCHWERTFEGER, K, L. Proinflammatory Cytokines in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Potential Targets for Therapeutics. **Current Drug Targets**, [S.I.], v. 11, p.1133-46, 2010.

GREENE, F. et al. **AJCC cancer staging manual**. New York, 2002.

GRIVENNIKOV S. I.; GRETEN F. R.; KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, p.883-99, 2010.

GUAN, X. et al. Analysis of the hormone receptor status of circulating tumor cell subpopulations based on epithelial-mesenchymal transition: a proof-of-principle study on the heterogeneity of circulating tumor cells. **Oncotarget**, China, v. 7, n. 40, p. 65993-6002, 2016.

GU-TRANTIEN, C. et al. CD4⁺ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. **J. Clin. Invest.**, v. 123, p. 2873-92, 2013.

HANAHAN, D. et al. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-74, 2011.

HAMED, E. A; ZAKHARY, M. M; MAXIMOUS, D. W. Apoptosis, angiogenesis, inflammation, and oxidative stress: basic interactions in patients with early and metastatic breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 6, n. 138, p. 999-1009, 2012.

HAMIDULLAH; CHANGKIJIA, B.; KONWAR, R. Role of interleukin-10 in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p.11-21, 2011.

INCA. Falando sobre o Câncer e seus Fatores de Risco. In: Ministério da Saúde. **Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo**, Rio de Janeiro, 1996.

INCA. O que é o Câncer. In: Ministério da Saúde. **ABC do Câncer: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. INCA, Rio de Janeiro, p. 15-34, 2011.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Brasil. **Ministério da Saúde**, Rio de Janeiro, p. 25-6 2015.

JANUCHOWSKI, R.; WOJTOWICZ, K.; ZABEL, M. The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.I.], v. 67, n. 7, p.669-80, 2013.

JESNECK, J. L. et al. Do serum biomarkers really measure breast cancer. **BMC Cancer**, v. 9, n. 164, p. 1-13, 2009.

JOHNSON, C. S. Interleukin-1: therapeutic potential for solid tumors. **Cancer Invest**, n. 11, p. 600-8, 1993.

LEEK, R. D. et al. Association of tumor necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. **Br J Cancer**, v. 12, n. 77, p. 2246-51, 1998.

KAMEL, M. el al. Effect of tumor necrosis factor alpha on estrogen metabolic pathways in breast cancer cells. **J Cancer**, v. 3, p. 310-21, 2012.

KEMPEN, L. C. L.; VISSER K. E.; COUSSENS L. M. Inflammation, proteases and cancer. **Eur J Cancer**, p. 728-34, 2006.

KOZLOWSKI, L. et al. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. **Rocz Akad Med Bialymst**, v. 48, p. 82-4, 2003.

KNÜPFER, H.; PREIB, R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 102, n. 2, p.129-35, 2006.

KUNDU, N. et al. Antimetastatic and antitumor activities of interleukin 10 in a murine model of breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 88, n. 8, p. 536-41, 1996.

KUMAR, V. A.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Inflamação e Reparo. In: KUMAR, V. A.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran: Patologia – Bases Patológicas das Doenças. **Elsevier**, Rio de Janeiro, cap. 2, p. 46-73, 2013.

KUMAR, V. A.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Neoplasia. In: KUMAR, V. A.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins & Cotran: Patologia – Bases Patológicas das Doenças. **Elsevier**, Rio de Janeiro, cap. 5, p. 161-214, 2013.

LI, J. et al. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, [S.I.], v. 7, n. 8, p.8500-05, 2015.

LOI, S. et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. **Journal Clinical Oncology**, v. 31, p. 860-7, 2013.

MENDES, A. T. M. Impacto da Detecção das Células Tumorais Circulantes nas Neoplasias do Trato Urinário: Próstata e Bexiga. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Medicina, Universidade do Porto, Porto, p. 7-14, 2016.

MOCELLIN, S.; MARINCOLA, F. M.; YOUNG, H. A. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 5, p. 1043-51, 2005.

RIUL, S.; AGUILLAR, O. M. Quimioterapia Antineoplásica: Revisão Da Literatura. **Min. Enf.**, São Paulo, v. 7, n. 60, p. 60-7, 1999.

TORTORA, G. J.; NIELSEN, M. T. Sistema Genital: Glândulas Mamárias. In: TORTORA, G. J.; NIELSEN, M. T. Princípios de Anatomia Humana. **Guanabara Koogan**, 12. ed., Rio de Janeiro, cap. 26, p. 979-82, 2013.

TOSS, A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast Cancer Research**, [S.I.], v. 17, n. 1, p.1-11, 2015.

TRIOZZI, P. L.; ALDRICH, W. Effects of Interleukin-1 Receptor Antagonist and Chemotherapy on Host–Tumor Interactions in Established Melanoma. **Anticancer Research**, [S.I.], v. 30, p.345-54, 2010.

WEIGELT, B.; GHAJAR, C. M.; BISSELL, M. J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 69-70, p. 42-51, 2014.

WULANINGSIH, W. et al. Prediagnostic serum inflammatory markers in relation to breast cancer risk, severity at diagnosis and survival in breast cancer patients. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 10, p.1121-28, Oxford University Press (OUP), 2015.

YAO, D.; DAI, C.; PENG, S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 1608-20, 2011.

YOKOE, T.; IINO, Y.; MORISHITA, Y. Trends of IL-6 and IL-8 levels in patients with recurrent breast cancer: preliminary report. **Breast Cancer**, v. 7, p. 187-90, 2000.

ZARDAVAS, D. et al. Clinical management of breast cancer heterogeneity. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 12, p. 381-94, 2015.

ZHANG, G.J.; ADACHI, I. Serum interleukin-6 levels correlate to tumor progression and prognosis in metastatic breast carcinoma. **Anticancer Res**, v. 19, p. 1427-32, 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidada para participar da pesquisa intitulada “*Perfil Molecular de Citoqueratinas Basais e Luminais em Sangue Periférico de Pacientes com Câncer de Mama e sua Correlação com Fatores Clínicos*”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Luiz Ricardo Goulart Filho, Yara Cristina de Paiva Maia, Alinne Tatiane Faria Silva, Letícia Lopes Dantas, Jéssica Pereira de Oliveira, Thaíse Gonçalves de Araújo, Patrícia Terra Alves e Dr. Donizeti Wilian.

Nesta pesquisa nós estamos buscando detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença (tumor ou doença benigna da mama) no paciente, bem como definir as possíveis substâncias que podem indicar a doença e que podem auxiliar no tratamento das doenças da mama. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Doutora Yara Cristina de Paiva Maia no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Na sua participação você poderá se encaixar em três grupos seguintes: Casos (câncer de mama), doença benigna da mama e controles (sem a presença de câncer de mama e doença benigna da mama). Nessa pesquisa você deverá responder a um questionário, que será aplicado pela equipe no dia da consulta no hospital. Se por acaso, você for submetida à cirurgia ou a biópsia para diagnóstico ou tratamento, serão coletadas uma amostra de sangue (5 ml). O sangue será retirado normalmente nestes procedimentos e somente uma pequena quantia deste material será utilizada na pesquisa. Este material será enviado para o Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade para extração de DNA, RNA e proteínas. Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você poderá solicitar aos pesquisadores, a qualquer momento, o seu desligamento do estudo e a retirada dos seus dados. Você poderá ter conhecimento, se quiser e no momento em que desejar, dos resultados da avaliação genética.

É através deste tipo de pesquisa e da divulgação dos resultados, que esperamos descobrir a existência de substâncias para o diagnóstico precoce do câncer de mama, bem como para o seu tratamento. Sua participação poderá ajudar a melhorar os conhecimentos necessários para melhor orientar programas de prevenção que poderão contribuir para diminuir a ocorrência dessa doença. Vale dizer que você não terá nenhum gasto ou ganho financeiro por participar da pesquisa. Os únicos riscos aos quais você estará sujeita são o de um leve hematoma ou desconforto no local da punção.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com a equipe da Profª Drª Yara Cristina de Paiva Maia, composta pelas pesquisadoras Alinne Tatiane Faria Silva, Letícia Lopes Dantas, Thaíse Gonçalves de Araújo e Patrícia Terra Alves. Endereço: Universidade Federal de Uberlândia – Instituto de Genética e Bioquímica – Laboratório de Nanobiotecnologia – Campus Umuarama – Bloco 2E, sala 248 – CEP.: 38400902, Uberlândia, MG. Telefone de contato: (34) 3218-2478

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, ... de de 201....

Assinatura dos pesquisadores

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

Participante da pesquisa ou representante legal

APÊNDICE B – Questionário Socioeconômico e Clínico (QSEC)

DADOS GERAIS					
Data da Avaliação: ____/____/____			Nome da Paciente: _____		
Iniciais do Nome do Paciente: _____			Número do Prontuário do Paciente: _____		
HISTÓRICO CLÍNICO					
1. Histórico prévio de Lesão Benigna na Mama?			2. Histórico familiar de Câncer de Mama?		
() Sim		() Não		() Não () Sim. Quem? () Avó () Tia () Irmã	
Doenças pré-existentes:			Infecciosa: _____		
			Hormonais: _____		
			Metabólicas: _____		
			Psicológicas: _____		
			Crônico Degenerativa: _____		
			Alergia: _____		
Histórico de outro tipo de Câncer: () Não () Sim. Qual? _____					
Histórico Cirúrgico: _____					
Etilismo: () Não () Sim. Quanto: _____			Tabagismo: () Não () Sim. Quanto: _____		
Cor da pele: () Branco () Amarelo () Pardo () Moreno () Negro () Outro _____					
Pratica Atividade Física? () Não () Sim. Quantas vezes na semana e quantos minutos? _____					
Peso atual: _____ kg.		Peso usual: _____ kg.		Modificação de peso: _____	
Altura: _____		Informações adicionais: _____			
Cirurgia realizada: _____					
Conduta: _____					
DADOS PRONTUÁRIOS					
Diagnóstico da paciente: _____ () CM () DBM					
1. Tipo de tumor: _____					
2. Estadiamento Clínico: _____			Grau Anatomopatológico: _____		
Estrogênio		Progesterona		HER-2	
() Negativo	() Positivo	() Negativo	() Positivo	() Negativo	() Positivo

ANEXOS

ANEXO A – Classificação do TNM Patológico e do Fenótipo Molecular do Tumor

I. Classificação do TNM patológico

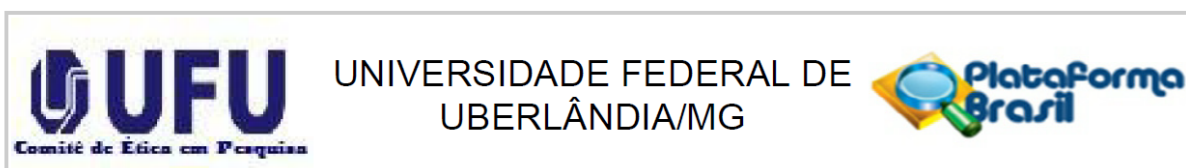
Categoria	Características
<i>Tumor Primário (pT)</i>	
pTx	O tumor primário não pode ser avaliado
pTis	Carcinoma <i>in situ</i>
pT1	Tumor com 2cm ou menos em sua maior dimensão
pT2	Tumor com mais de 2cm, porém não mais de 5cm em sua maior dimensão
pT3	Tumor com mais de 5cm em sua maior dimensão
pT4	Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele
<i>Linfonodos Regionais (pN)</i>	
pNx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (não removidos para estudo ou previamente removidos)
pN0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
pN1	Metástase de 1 a 3 linfonodos(s) axilar(es) homolateral(is), e/ou linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is) com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não aparente clinicamente
pN2	Metástase de 4 a 9 linfonodos axilares homolaterais, ou em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), clinicamente aparente, na ausência de metástase em linfonodos axilares
pN3	Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares homolaterais; ou em linfonodos intraclaviculares homolaterais; ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais de 3 linfonodos axilares clinicamente negativos, metástase microscópica em linfonodos mamários internos; ou em linfonodos supraclaviculares homolaterais

Fonte: Greene *et al.*, 2002.

II. Classificação do Fenótipo Molecular do Tumor

Subtipo Molecular	Características
Luminal A	• RE Positivo e/ou RP Positivo • HER2 Negativo • Ki-67 < 14%
Luminal B	• RE Positivo e/ou RP Positivo • HER2 Negativo • Ki67 ≥ 14%
HER	• RE Negativo e RP Negativo • HER2 Positivo
Triplo Negativo	• RE Negativo e RP Negativo • HER2 Negativo

Fonte: Li *et al.*, 2015; Toss & Cristofanilli, 2015.

ANEXO B – Aprovação do parecer pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: PERFIL MOLECULAR DE CITOQUERATINAS BASAIS E LUMINAIS EM SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES CLÍNICOS

Pesquisador: Yara Cristina de Paiva Maia

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07561312.0.0000.5152

Instituição Proponente: HOSPITAL DE CLINICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLANDIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.080.288

Data da Relatoria: 27/03/2015

O adendo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2015.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Dezembro de 2016.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Dezembro de 2017.