

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE BIOMEDICINA

ANÁLISE DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 EM SORO DE PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA

CAROLINA ROSA BORDIN

Uberlândia/MG
Dezembro/2019

CAROLINA ROSA BORDIN

ANÁLISE DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 EM SORO DE PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA

Pesquisa monográfica apresentada como trabalho de conclusão de curso, requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva.

Uberlândia/MG
Dezembro/2019

CAROLINA ROSA BORDIN

ANÁLISE DA CITOCINA ANTI-INFLAMATÓRIA IL-10 EM SORO DE PACIENTES
COM CÂNCER DE MAMA

Pesquisa monográfica apresentada como trabalho de conclusão de curso, requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr^a Bruna Cristina Borges

Prof. Dr^a Fraçoise Vasconcelos Botelho

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Uberlândia, 11 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por serem meus exemplos, aos meus pais e meu irmão que proporcionaram tudo que precisei todos esses anos, por nunca me deixarem desistir, por sempre me apoiarem em todas as decisões e por sempre fazerem de tudo para me ver feliz, e a Melzinha.

Ao meu namorado, por estar comigo todos esse anos, por ter me estimulado a crescer e amadurecer em todos os aspectos, por estar ao meu lado sempre que preciso e por ser meu melhor amigo.

As minhas amigas de Monte Carmelo, que apesar da distância e raros encontros sei que elas estão sempre ao meu lado me apoiando.

Aos amigos que fiz na faculdade, por estarem comigo nos sufocos de todas as matérias e por todos os momentos fora da faculdade. Todos fizeram com que esse tempo fosse inesquecível, principalmente minhas amigas que vou levar para sempre comigo.

Ao meu orientador por me proporcionar o estudo em uma área importante de pesquisa e incentivar a busca de conhecimento.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer existente hoje em dia e que afeta diversas mulheres, devido aos diversos fatores de risco que aumentam as chances de aparecimento dessa doença. Ele pode ser classificado quanto aos receptores presentes nas células cancerígenas e ao estágio em que o tumor está, o que irá determinar o melhor prognóstico e tratamento para o paciente. Recentemente a pesquisa de citocinas como biomarcadores tumorais tem crescido e de acordo com alguns estudos a IL-10 pode estar envolvida no escape do sistema imune em diversos tipos de câncer, o que contribui para o desenvolvimento do tumor. Esse estudo tem como objetivo quantificar a IL-10 em soro de pacientes com câncer de mama e relacionar com os dados dos tumores das pacientes. Para isso, foi utilizado o LEGENDplex™, um kit comercial que quantifica a fluorescência, por meio da ligação da citocina a microesferas correspondentes a IL-10. Ao realizar a análise da produção de IL-10 com as variáveis clínicas das pacientes observou-se que a presença dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2 influencia na produção de IL-10. Nas outras análises de correlação, foi observado uma ligação apenas entre IL-10 e receptor de progesterona e HER2.

Palavras-chave: câncer de mama, interleucina 10, citometria de fluxo e variáveis clínicas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Comitê de ética	12
3.2. Amostras	12
3.3. Dosagem de IL-10 pelo LEGENDplex™	12
3.4. Análise estatística	15
4. RESULTADOS	16
4.1. Relação entre concentração de IL-10 e variáveis clínicas	16
4.1.1. Subtipo molecular	16
4.1.2. Estadiamento e Metástase	16
4.1.3. Grau e Subtipo do tumor	16
4.2. Correlação entre metástase e subtipo molecular	17
4.3. Correlação entre IL-10 e variáveis clínicas	17
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é considerado, nos dias atuais, uma importante malignidade a ser estudada com o objetivo de conseguir uma detecção precoce e um tratamento eficaz (MERINO BONILLA, TORRES TABANERA and ROS MENDOZA, 2017). Dentre os tipos de câncer existentes, o de mama é o mais comum e o que apresenta maior incidência entre as mulheres (CLEGG et al. 2009). Apesar da quantidade de pacientes diagnosticados com essa doença ser menor, em comparação com anos anteriores, o mundo todo ainda sofre com as altas taxas de incidência e mortalidade afetando diversas mulheres (MERINO BONILLA, TORRES TABANERA and ROS MENDOZA, 2017).

Devido às inúmeras campanhas em combate ao câncer de mama foi possível disseminar as informações mais importantes sobre essa malignidade, para que as mulheres possam conhecer mais seu corpo e obter um diagnóstico precoce para evitar a progressão do tumor e ter um tratamento mais eficaz (MERINO BONILLA, TORRES TABANERA and ROS MENDOZA, 2017). Entretanto, apesar dos diversos avanços, as pessoas menos privilegiadas que não possuem acesso as informações ou a novos tratamentos sofrem com o diagnóstico tardio e um tratamento menos eficaz (DOWNING et al., 2007).

O câncer de mama pode ser diagnosticado mais comumente pela mamografia, em que é feito um raio-x do tecido mamário para observar se há a presença de nódulos, e atualmente por biomarcadores, que ajudam na identificação do tipo de câncer e do provável tratamento para determinado paciente (WELLINGS, VASSILIADES and ABDALLA, 2016).

Após o diagnóstico é feito a classificação do subtipo de câncer de mama do paciente, que ajuda no prognóstico, evolução, e na escolha do melhor tratamento. O câncer de mama pode ser classificado em: Luminal A, Luminal B, HER2 + ou Triplo Negativo (PONDE, ZARDAVAS and PICCART, 2019), sendo essa classificação do subtipo de câncer de mama é feita de acordo com os receptores presentes ou ausentes nas células tumorais, que servem como marcadores tumorais para diagnóstico e tratamento, podendo ser o receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) (ALTUHHIS et al., 2004) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (BARNES, 1993).

O câncer de mama Luminal A é o mais frequente nos pacientes, sendo caracterizado pela presença de receptor de estrógeno e/ou de progesterona e ausência de HER2. Por ter essa classificação é o que apresenta melhor prognóstico, ou seja, o paciente, caso siga todas as orientações e tratamentos indicados, tem uma grande chance de melhora e menor chance de

recidiva da doença (GOLDHIRSCH et al., 2013). Já o Luminal B é caracterizado pela presença do receptor de estrógeno, de progesterona e HER2 (HARBECK, THOMSEN and GRANT, 2013). Atualmente é considerado o tipo mais agressivo e de pior prognóstico devido a intensa proliferação celular, gerando mais chances de metástase (TRAN and BEDARD, 2011).

O diagnóstico de HER2 + é caracterizado pela presença de HER2 e ausência dos receptores de estrógeno e progesterona. Pacientes com esse tipo de câncer apresentam um tumor agressivo de difícil tratamento, que quando diagnosticado no estágio inicial pode ser feito um tratamento adjuvante mais eficaz (WUERSTLEIN and HARBECK, 2017). Já o câncer de mama triplo negativo recebe esse nome pois não apresenta nenhum dos três biomarcadores mais utilizados para classificação, sendo eles o receptor de estrogênio e progesterona e HER2 (SHAH et al., 2012). O triplo negativo é diagnosticado, geralmente, em mulheres mais novas apresentando sobrevida curta devido ao alto grau de malignidade, invasão e chance de reincidência (JIA et al., 2017), além disso, é provável a chance de ocorrer metástases viscerais precoces, levando a morte na maioria dos casos (HUDIS and GIANNI, 2011).

Além dos tipos de receptores presentes nas células cancerígenas o câncer de mama pode ser classificado de acordo com o estágio do tumor, Grau I e II em que o tumor está limitado apenas na mama e tem grandes chances de ter um ótimo tratamento, Grau III em que o tumor está mais avançado e começa a se espalhar para os nódulos linfáticos e outros tecidos na mama, sendo um tratamento mais difícil, e por fim o Grau IV, em que o tumor está em metástase e as células cancerígenas começam a se espalhar para outros tecidos, sendo mais grave (YALCIN, 2013).

A classificação dos tipos de receptores e o estágio do tumor é muito importante para definir o melhor tratamento para o câncer de mama, podendo ser feito a mastectomia total ou parcial, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal (OVERGAARD et al., 1997).

Recentemente muitos pesquisadores investem na pesquisa de citocinas como biomarcadores de câncer de mama, já que elas regulam a resposta imune do organismo por controlar a ação de células de defesa. A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina que possui funções anti-inflamatórias por inibir a ação de células dendríticas e macrófagos, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e limitando a resposta imune do organismo (MOORE et al., 2001).

A produção de IL-10 pode ser feita por diversos tipos de células, como células B (O'GARRA and VIEIRA, 2004), mastócitos, eosinófilos (MOORE et al., 2001), macrófagos,

células dendríticas (BOONSTRA et al., 2006), linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T regulatórios (UHLIG et al., 2006). Essa citocina se liga a duas cadeias receptoras denominadas de IL-10R1 e IL-10R2 (OUYANG et al., 2011), inibindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-8 (ESSE É COM ABRAMS) (DE WAAL MALEFYT et al., 1991), reduz a expressão de MHC classe II inibindo a apresentação de antígenos (ESSE COM HAANEN) (DE WAAL MALEFYT et al., 1991) e inibe a proliferação e produção de citocinas do linfócito T CD4⁺ (GROUX et al., 1996).

O papel principal da interleucina 10 é o de manter a homeostase do sistema imune, limitando a ativação de macrófagos para controlar a inflamação (GLOCKER et al., 2011). Em casos de deficiência de IL-10 pode ocorrer uma reação imune excessiva resultando em dano no tecido ou necrose (SIEWE et al., 2006).

De acordo com alguns estudos, diversos tipos de câncer secretam a IL-10 pelo fato dela criar um ambiente imunossupressor que contribui para o desenvolvimento do tumor (MOCELLIN et al., 2004), por diminuir a produção de mediadores de inflamação (DENNIS et al., 2013). Alguns estudos com IL-10 sérica demonstraram altas concentrações da citocina em pacientes com câncer de mama (KOZLOWSKI et al., 2003), em pacientes em estágio II e III de desenvolvimento do tumor e em pacientes que as células tumorais não apresentam receptor de estrógeno (LV et al., 2018). A expressão de IL-10 pode suprimir a resposta imune do organismo e impedir a eliminação do tumor (HECKEL et al., 2011), porém foi descrito que essa citocina pode apresentar um papel de inibir a angiogênese (HUANG, ULLRICH and BAR-ELI, 1999). Em um estudo de Hundu et al. realizado em modelos animais de câncer de mama e melanoma foi observado que a IL-10 apresentava efeitos anti metastáticos. E em estudos realizados in vitro com células MDA-MB-231 e MCF-7 também foi observado uma diminuição da migração celular com tratamento de IL-10 (AHMAD et al., 2018).

De acordo com Wang et al. a IL-10 e outras citocinas como IL-6 e IL-8 podem servir como biomarcadores para predição de metástases e prognóstico no câncer de mama. A interleucina 6 possui propriedades pro-inflamatórias e foi descrita por estimular o crescimento de células tumorais (LEEK and HARRIS, 2002), e que sua produção foi observada em linhagem celular MDA-MB-231 que não expressavam o receptor de estrógeno (ROBINSON, SNEIGE and GRIMM, 1998). Outra citocina frequentemente estudada é o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que possui características pró-inflamatórias (WOLCZYK et al., 2016). Alguns estudos com células tumorais MDA-MB-231 o TNF- α foi descrito por inibir a proliferação celular, migração e invasão do tumor (ZHANG et al., 2018).

Esse estudo é necessário para determinar se a interleucina 10, quantificada em soro de pacientes com câncer de mama, possui sua produção relacionada às variáveis clínicas das pacientes analisadas, sendo elas grau e subtipo do tumor, presença de receptores nas células tumorais, estadiamento e metástase. E observar se a sua produção depende dessas variáveis ou se a IL-10 influencia na variável.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Quantificar a presença de IL-10 no soro de pacientes com câncer de mama e relacionar com os dados clínicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Relacionar a presença de IL-10 com os dados clínicos das pacientes, como grau do tumor, subtipo de câncer de mama, estadiamento, receptores presentes nas células cancerígenas e metástase;
- Determinar se existe diferença na concentração de IL-10 ao ser relacionada com os receptores presentes nas células cancerígenas, estadiamento, metástase, grau do tumor e subtipo de câncer de mama;
- Determinar se existe correlação entre a IL-10 com as variáveis clínicas, receptores presentes nas células cancerígenas, estadiamento, metástase, grau do tumor e subtipo de câncer de mama.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, **CAAE:** 38930314.5.0000.5565 e **parecer:** 1.230.380/2015. Todos os pacientes que forneceram a amostra assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido aceitando a doação (ANEXO A).

3.2. Amostras

As amostras de sangue total foram obtidas no Hospital do Câncer de Uberlândia, por profissionais treinados em coleta, de 80 pacientes já diagnosticados com câncer de mama, antes do início do tratamento, em tubos de coleta com gel separador e identificadas. Após isso todas foram centrifugadas por 10 minutos a 1000rpm para obter apenas o soro. O soro de cada paciente foi transferido para microtubos identificados e mantidos no ultra freezer na temperatura de -80°C até o dia de análise.

Para o experimento as amostras foram descongeladas, misturadas e centrifugadas novamente para remover as partículas. Após isso, elas foram diluídas duas vezes em tampão de ensaio fornecido pelo kit.

3.3. Dosagem de IL-10 pelo LEGENDplex™

O LEGENDplex™ da BioLegend® é um kit comercial que utiliza o mesmo princípio de um imunoensaio sanduíche, sendo utilizado soro de pacientes com câncer de mama para quantificar a presença de citocinas desejadas, como a IL-10. O ensaio é composto por um anticorpo conjugado a microesferas que se liga a citocina correspondente presente no soro, após isso é adicionado o anticorpo de detecção biotinizado que se liga as microesferas, por fim a streptavidina-ficoeritrina (SA-PE) é adicionada e se liga ao anticorpo de detecção, essa ligação fará com que seja possível identificar o tamanho e fluorescência da citocina presente. Para a identificação é utilizado um citômetro de fluxo em que é determinado a fluorescência de cada citocina de acordo com uma pré-determinada já fornecida pelo kit (BioLegend®).

As microesferas, fornecidas pelo kit, se ligam a sua respectiva citocina, sendo que cada uma pode ser identificada por tamanho, sendo maior ou menor, e intensidade de fluorescência. A interleucina 10, quando presente no soro de pacientes, se liga as microesferas maiores e emite uma fluorescência que é comparada com uma amostra padrão já conhecida, permitindo assim sua identificação (BioLegend®).

O kit LEGENDplex™ foi obtido pela BioLegend e mantido a -2°C até o dia de análise. Para o experimento todos reagentes necessários foram diluídos corretamente de acordo com as instruções do fornecedor.

O experimento foi feito testando microesferas de IL-10, IL-6 e TNF- α , sendo que para a diluição foi utilizado 200 μ l de cada microesferas e 2000 μ l de tampão de ensaio. Antes da pipetagem cada microesfera foi levada ao vortéx por 1 minuto e misturada ao tampão de ensaio. Para cada reação é necessário um volume de 25 μ l de microesferas diluídas.

O tampão de lavagem necessário para a lavagem da placa foi diluído, sendo que em 25ml de tampão foram adicionados 500ml de água deionizada.

O tampão de diluição do padrão (Matriz B) fornecida pelo kit era liofilizada e foi necessário adicionar 5ml de tampão de teste ao frasco para reconstituição.

A preparação do padrão é necessária para que na análise das amostras possa ser comparado a fluorescência e tamanho da citocina encontrada com a padrão, que já é conhecida. Para isso foi adicionado 250 μ l de tampão de teste ao painel padrão de inflamação liofilizado, fornecido pelo kit, para reconstituição. Foi transferido 100 μ l dessa diluição para um microtubo identificado como C7. Após isso, outros sete microtubos foram identificados como C6, C5, C4, C3, C2, C1 e C0 e foi adicionado 75 μ l do tampão de ensaio em todos os tubos. A partir disso, foi feita uma diluição de 1:4 em cada um a partir do C7, que possui a concentração máxima, sendo transferido 25 μ l do microtubo anterior para o próximo. Apenas no C0 não foi transferido os 25 μ l do tubo anterior, já que é a concentração mínima.

O experimento seguiu as instruções fornecidas pelo fabricante para realização em placa de 96 poços com fundo em V, sendo que todos os materiais necessários além do kit foram providenciados de acordo com as especificações. Todos os padrões foram realizados em duplicatas, sendo 16 poços para os padrões e 80 poços para os 80 pacientes testados (Tabela 1).

Tabela 1 – Mapa da placa de 96 poços com controle e amostras utilizadas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C0	C4	M 312.0	M 334.0	M 573.0 B 107	B 70.0	B 39.0	M 167.0	M 96.0	M 12.0	M 124	M 89
B	C0	C4	B 31.0	B 29	M 167	M 413.0	B 64.0	B 49.0	B 53.0	M 161.0	B 26	B 57
C	C1	C5	M 458.0	B 44.0	M 441.0	B 116.0	M 382.0	M 32.0	M 263.0	B 67.0	M 97.0	M 98.0
D	C1	C5	M 24.0	B 004	M 113.0	M 477.0	M 527.0	B 59.0	M 301.0	B 65	M 191.0	B 97.0
E	C2	C6	B 006	B 118.0	M 418.0	B 62.0	M 481.0	B 83.0	B 122.0	B 47.0	M 370.0	M 255.0
F	C2	C6	M 165.0	B 26	B 32.0	M 362.0	B 009	M 37.0	B 38.0	B 98.0	M 151.0	M 421.0
G	C3	C7	B 008	M 140.0	B 82.0	B 90.0	B 85.0	B 120.0	B 74.0	B 80.0	M 160	B 79.0
H	C3	C7	B 013	M 621.0	B 83.0	B 37.0	B 86.0	B 34.0	M 89.0	M 192	M 315.0	B 92.0

Fonte: AUTOR (2019).

Para a placa foram transferidos 25µl de matriz B e 25µl de cada padrão para os poços padrões (C), e 25µl de tampão de ensaio e 25µl da amostra para os poços dos pacientes. Após distribuição as microesferas foram agitadas no vórtex por 30 segundos, adicionado 25µl em todos os poços e então a placa foi selada e embalada em papel alumínio para ser incubada em um agitador à 800rpm por 2 horas, após esse tempo foi levada para centrifugação à 1050 rpm por 5 minutos e depois o sobrenadante foi desprezado imediatamente.

Para lavagem, foi adicionado 200µl de tampão de lavagem em cada poço e após centrifugar novamente à 1050rpm por 5 minutos o sobrenadante foi desprezado novamente. Foi adicionado 25µl do anticorpo de detecção em cada poço, a placa foi novamente selada e embalada em papel alumínio e incubada por 1 hora em um agitador. Depois do intervalo foi adicionado 25µl de SA-PE em todos os poços e novamente selada e incubada em papel alumínio por 30 minutos no agitador.

Depois da última incubação foi realizada a última centrifugação à 1050rpm por 5 minutos e após isso o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 150µl de tampão de lavagem em todos os poços para ressuspender as microesferas com a ajuda de uma pipeta. Após isso, todas as amostras foram transferidas para microtubos identificados para leitura no citômetro de fluxo.

O citômetro utilizado foi o CytoFLEX da Beckman Coulter e os dados foram obtidos pelo software CytExpert. O citômetro fornece a leitura dos analitos de acordo com o APC e PE dos analitos. O APC é o brilho de cada citocina, indicando que os anticorpos ligados as microesferas de cada citocina estão sendo detectados. O PE indica o quanto da citocina analisada está presente, sendo que quanto maior o PE mais citocinas estão presentes na amostra analisada.

3.4. Análise estatística

Os resultados obtidos no citômetro de fluxo foram exportados em arquivos .fcs para o software de análise do LEGENDplex™. A curva padrão foi determinada e os valores em pg/mL foram obtidos a partir da intensidade média de fluorescência de cada analito. Esses valores foram estruturados no software SPSS versão 25 para Windows. Os dados que ficaram abaixo do ponto mínimo da curva padrão foram desconsiderados, uma vez que não possível determinar o valor exato da quantidade de citocina presente na amostra. Utilizou-se o teste de Kolgomorov-Smirnov para análise da igualdade da distribuição das amostras com a curva de Gauss. Empregou-se o teste de Levene para analisar a variância entre os grupos. Para comparação de dois grupos, utilizou-se o Teste T de Amostras Independentes. Para comparação de mais de dois grupos, utilizou-se o Teste F de Anova, aplicando-se a correção de Welch caso a variância entre os grupos fosse diferente. Para determinar a correlação entre os parâmetros estudados foi utilizado o Teste qui-quadrado de Pearson. Todos os valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Relação entre concentração de IL-10 e variáveis clínicas

Foi realizado a análise para observar se a produção de IL-10 está relacionada as variantes clínicas do paciente, como receptores das células cancerígenas, estadiamento, metástase, subtipo e grau do tumor.

4.1.1. Subtipo molecular

Foi observado que a produção de IL-10 está relacionada com a presença do receptor de estrógeno ($p = 0,016$), de progesterona ($p = 0,025$) e HER2 ($p = 0,046$) nas células cancerígenas, e que a IL-10 é mais expressa em células cancerígenas que expressam o receptor de estrógeno e/ou progesterona e HER2 (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação entre IL-10 e Receptor de Estrógeno, Progesterona e HER2

	Porcentagem	N (média pg/ml)	DP	p
ER +	68,8	21 (2,38)	0,85	0,016*
ER -	25,0	8 (1,80)	0,35	
PG +	58,8	16 (2,50)	0,93	0,025*
PG -	35,0	13 (1,88)	0,37	
HER2 +	16,3	8 (2,69)	1,03	0,046*
HER2 -	77,5	21 (2,04)	0,61	

Nota – ER: Receptor estrógeno; PR: Receptor progesterona; HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; DP: Desvio padrão; P: valor de p; *: valor estatisticamente significativo

4.1.2. Estadiamento e Metástase

Referente ao estadiamento e metástase foi observado que a produção de IL-10 não está relacionada a classificação avançada ou inicial do estadiamento ($p = 0,429$) do tumor e nem a presença ou ausência de metástase ($p = 0,829$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Relação entre IL-10 e Estadiamento e Metástase

	Classificação	Porcentagem	N (média pg/ml)	DP	p
Estadiamento	Avançado	63,7	9 (2,14)	0,94	0,429
	Inicial	30,0	20 (2,40)	0,72	
Metástase	Presente	33,8	14 (2,23)	0,82	0,829
	Ausente	46,3	12 (2,16)	0,80	

Nota – DP: Desvio padrão; P: valor de p.

4.1.3. Grau e Subtipo do tumor

Foi observado que o subtipo de tumor de mama não interfere na produção de IL-10 ($p = 0,097$), assim como o grau de desenvolvimento do tumor não influencia na produção da interleucina 10 ($p = 0,795$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Relação entre IL-10 e Grau e Subtipo do tumor

	Classificação	Porcentagem	N (média pg/ml)	DP	p
Subtipo	Luminal A	27,5	7 (2,08)	0,69	0,097
	Luminal B	31,3	8 (2,27)	0,65	
	HER2+	16,3	9 (2,64)	0,98	
	Triplo negativo	18,8	5 (1,56)	0,09	
Grau	G1	13,8	4 (2,12)	0,66	0,795
	G2	52,5	16 (2,34)	0,90	
	G3	26,3	8 (2,12)	0,65	

Nota – G1: Grau 1; G2: Grau 2; G3: Grau 3; DP: Desvio padrão; P: valor de p.

4.2. Correlação entre metástase e subtipo molecular

Foi observado que o surgimento de metástase não está correlacionado à presença dos receptores em células cancerígenas e que o tipo de receptor não depende da presença de metástase (Tabela 5).

Tabela 5 – Correlação entre metástase e Subtipo molecular

		HER2			ER			PR		
		Positivo (N)	Negativo (N)	p	Positivo (N)	Negativo (N)	p	Positivo (N)	Negativo (N)	p
Metástase	Presente	7	20	0,209	23	4	0,108	20	7	0,102
	Ausente	5	32		25	12		20	17	

Nota – HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; ER: Receptor de estrógeno; PR: Receptor de progesterona; P: valor de p.

4.3. Correlação entre IL-10 e variáveis clínicas

Foi observado que a presença do receptor HER2 e do receptor de progesterona influencia a produção de IL-10 ou que a produção de IL-10 favorece o tipo de receptor, porém em relação ao receptor de estrógeno, estadiamento, metástase e subtipo não foi observado nenhuma correlação com a produção de IL-10 (Tabela 6).

Tabela 6 – Correlação entre IL-10 e variáveis clínicas

IL-10	
Variáveis clínicas	p
HER2	0,046*
ER	0,078
PR	0,034*
Estadiamento	0,429
Metástase	0,887
Subtipo	0,684

Nota – HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; ER: Receptor de estrógeno; PR: Receptor de progesterona; P: valor de p; *: Valor estatisticamente significativo.

5. DISCUSSÃO

A interleucina 10 é uma citocina anti-inflamatória secretada por células cancerígenas em diversos tipos de cânceres, capaz de gerar um ambiente imunossupressor e favorecer o desenvolvimento do tumor (MOCELLIN et al., 2004). As células tumorais podem apresentar diferentes tipos de receptores em sua superfície, e a presença ou ausência deles poderiam influenciar a produção da citocina (PONDE, ZARDAVAS and PICCART, 2019).

Nossos resultados indicaram que a interleucina 10 foi mais expressa em pacientes que apresentavam receptor de estrógeno e progesterona e ausência do receptor HER2, além disso foi observado uma correlação entre a produção da interleucina 10 com o receptor de progesterona e HER2, indicando que a presença da citocina pode influenciar no tipo de receptor e vice versa. Porém, um estudo que quantifica a concentração de citocinas por meio de biópsia do câncer de mama contradiz esses resultados, uma vez que indicam que a IL-10 é superexpressa em câncer de mama que não apresenta receptores de estrógeno e de progesterona (CHAVEY et al., 2007). Uma possível explicação para a diferença entre os resultados pode ser devido a diferença de obtenção das amostras, uma vez que em um foi realizado a dosagem a partir do soro e o outro pela biópsia do tecido.

De acordo com as análises realizadas não foi possível identificar nenhuma relação entre a IL-10 e metástase, assim como não há nenhuma evidência de que a presença de metástase influencia na produção de interleucina 10 e vice-versa. Porém, um estudo utilizando modelos animais de câncer de mama tratados com IL-10 descreveu que houve diminuição da atividade metastática (KUNDU et al., 1996). Esses mesmos resultados foram descritos em um estudo feito com melanoma, em que foi observado uma diminuição da metástase na presença de IL-10 (HUANG et al., 1999). Não foi possível estabelecer uma relação dos nossos resultados, provavelmente, por causa da metodologia utilizada, uma vez que a análise realizada foi a partir do soro dos pacientes e que o N amostral era pequeno.

Nossas análises não detectaram nenhuma relação entre a IL-10 e os subtipos de câncer de mama. Porém, um estudo utilizando biópsia do tecido tumoral de mama quantificou a IL-10 por imuno-histoquímica e detectou que a citocina foi mais expressa em pacientes com subtipo HER2+ (BHATTACHARJEE et al., 2016), sendo a expressão de interleucina 10 relacionada à câncer de mama mais agressivo (LLANES-FERNANDEZ et al., 2006). Essa diferença entre nossos resultados e os da literatura pode ser devido ao tipo de amostras submetidas à análise e aos testes utilizados para quantificação da IL-10.

De acordo com nossas análises foi possível observar que não há nenhuma relação entre a produção de IL-10 e o estadiamento e grau do tumor, portanto um não depende do outro. Evidências mostraram que ao comparar pacientes em estágio inicial com pacientes em estágio avançado foi observado que houve um aumento da IL-10 sérica em câncer de mama avançado (WANG, 2017). Além disso, outro estudo comparando líquido intersticial tumoral com líquido intersticial normal detectou o aumento de citocinas séricas, como a IL-10, em estágios iniciais de câncer (ESPINOZA et al., 2016). De acordo com Lv et al. a expressão de IL-10 está relacionada aos estágios II e III de desenvolvimento do tumor. Os resultados obtidos podem não apresentar nenhuma relação devido ao tipo de amostra utilizada.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que a produção da interleucina 10 está relacionada a presença de receptores nas células cancerígenas. Porém, para as outras variáveis clínicas, como metástase, estadiamento, subtipo e grau do tumor, não existe nenhuma relação com a IL-10. Além disso, foi observado uma correlação apenas entre IL-10, receptor de progesterona e HER2. A partir disso, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de entender a relação entre a IL-10 e os receptores e as possíveis vias de sinalização.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N. et al. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 4, p. 537-549, 2018.

ALTHUIS, M. D. et al. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 10, p. 1558-1568, 2004.

BARNES, D. M. c-erbB-2 amplification in mammary carcinoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 17, p. 132-138, 1993.

BHATTACHARJEE, H. K. et al. Is Interleukin 10 (IL10) Expression in Breast Cancer a Marker of Poor Prognosis? **Indian Journal of Surgical Oncology**, v. 7, n. 3, p. 320-325, 2016.

BIOLEGEND®. "LEGENDplex™, Mouse inflammation panel mix and match subpanel".

BOONSTRA, A. et al. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 11, p. 7551-7558, 2006.

CHAVEY, C. et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. R15, 2007.

CLEGG, L. X. et al. Impact of socioeconomic status on cancer incidence and stage at diagnosis: selected findings from the surveillance, epidemiology, and end results: National Longitudinal Mortality Study. **Cancer Causes Control**, v. 20, n. 4, p. 417-435, 2009.

DENNIS, K. L. et al. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. **Current Opinion Oncology**, v. 25, n. 6, p. 637-345, 2013.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991.

DOWNING, A. et al. Socioeconomic background in relation to stage at diagnosis, treatment and survival in women with breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 5, p. 836-840, 2007.

ESPINOZA, J. A. et al. Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 12, p. e1248015, 2016.

GLOCKER, E. O. et al. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1246, p. 102-107, 2011.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206-2223, 2013.

GROUX, H. et al. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4⁺ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 1, p. 19-29, 1996.

HARBECK, N.; THOMSEN, C.; GNANT, M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. **Breast Care**, v. 8, n.2, p. 102-109, 2013.

HECKEL, M. C. et al. Human breast tumor cells express IL-10 and IL-12p40 transcripts and proteins, but do not produce IL-12p70. **Cellular Immunology**, v. 266, n. 2, p. 143-153, 2011.

HUANG, S.; ULLRICH, S. E.; BAR-ELI, M. Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, n. 7, p. 697-703, 1999.

HUDIS, C. A.; GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. **The Oncologist**, v. 16, p. 1-11, 2011.

JIA, H. et al. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: Existing challenges and exciting prospects. **Drug Resistance Updates**, v. 32, p. 1-15, 2017.

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 Białymst**, v. 48, p. 82-84, 2003.

KUNDU, N. et al. Antimetastatic and antitumor activities on interleukin 10 in a murine model of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 8, p. 536-541, 1996.

LEEK, R. D.; HARRIS, A. L. Tumor-associated macrophages in breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 177-89, 2002.

LLANES-FERNANDEZ, L. et al. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. **Breast**, v. 15, n. 4, p. 482-489, 2006.

LV, Z. et al. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor-alpha levels with human benign and malignant breast diseases. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 6, p. 5475-5480, 2018.

MERINO BONILLA, J. A.; TORRES TABANERA, M.; ROS MENDOZA, L. H. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. **Radiologia**, v. 59, n. 5, p. 368-379, 2017.

MOCELLIN, S. et al. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p. 61-76, 2004.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 801-805, 2004.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.

OVERGAARD, M. et al. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 14, p. 949-955, 1997.

PONDE, N. F.; ZARDAVAS, D.; PICCART, M. Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, n. 1, p. 27-44, 2019.

ROBINSON, E. K.; SNEIGE, N.; GRIMM, E. A. Correlation of interleukin 6 with interleukin 1alpha in human mammary tumours, but not with oestrogen receptor expression. **Cytokine**, v. 10, n. 12, p. 970-6, 1998.

SHAH, S. P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 395-399, 2012.

SIEWE, L. et al. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3248-3255, 2006.

TRAN, B.; BEDARD, P. L. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 221, 2011.

UHLIG, H. H. et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 5852-5860, 2006.

WANG, H.; YANG, X. Association between serum cytokines and progression of breast cancer in Chinese population. **Medicine**, v. 96, n. 49, p. e8840, 2017.

WELLINGS, E.; VASSILIADES, L.; ABDALLA, R. Breast Cancer Screening for High-Risk Patients of Different Ages and Risk - Which Modality Is Most Effective? **Cureus**, v. 8, n. 12, p. e945, 2016.

WOLCZYK, D. et al. TNF-alpha promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 4, p. 353-363, 2016.

WUERSTLEIN, R.; HARBECK, N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 12, n. 2, p. 81-92, 2017.

YALCIN, B. Staging, risk assessment and screening of breast cancer. **Experimental oncology**, v. 35, n. 4, p. 238-245, 2013.

ZHANG, Z. et al. Transmembrane TNF-alpha promotes chemoresistance in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 37, n. 25, p. 3456-3470, 2018.

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Do Participante da Pesquisa

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 imuno-histoquímica 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. E-mail: cep@unitri.edu.br.

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

Participante da pesquisa

Rogério Agenor Araújo
Pesquisador principal

Uberlândia, de de .