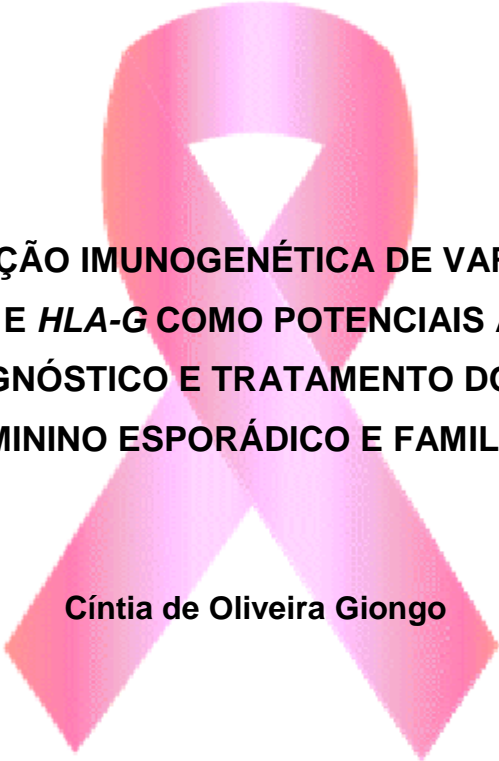


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



**CARACTERIZAÇÃO IMUNOGENÉTICA DE VARIANTES DOS
GENES *CCR2*, *CCR5* E *HLA-G* COMO POTENCIAIS ALVOS PARA
DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE
MAMA FEMININO ESPORÁDICO E FAMILIAL**

Cíntia de Oliveira Giongo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre

Novembro de 2012

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Agências financiadoras:

- CNPq
- FAPERGS
- FIPE

Instituição de origem:

- Laboratório de Imunogenética

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituições colaboradoras:

- Laboratório de Medicina Genômica

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força interior que me motiva a ir sempre em frente!

À minha família, Pai e Mãe, que amo muito! Eles são a minha base e meu exemplo! Sou muito grata por todo o apoio e compreensão durante o período do Mestrado.

Ao meu irmão querido que também tanto amo, Matheus. Sou grata pela sua grande amizade, pelo companheirismo e pelas risadas que deixaram esta fase muito mais leve!

Ao meu orientador Zéca, por ter aceitado me orientar, por sua dedicação, e pela paciência principalmente no período final do mestrado. Sou muito grata pela confiança e por ter tido a oportunidade de trabalhar com ele no Laboratório de Imunogenética.

Ao PPGBM, especialmente ao Elmo, profissional exemplar, que é sempre prestativo e disposto a ajudar.

Às fontes financiadoras, principalmente ao CNPq, que deram o suporte financeiro a este trabalho.

À Patrícia Ashton Prolla, pela confiança concedida ao “abrir as portas” do HCPA para que parte deste trabalho pudesse ser desenvolvido.

A todo o pessoal do Laboratório de Medicina Genômica do HCPA, por ter me recebido tão bem durante o período em que lá estive. Principalmente à Ana Paula, sem ela, com certeza o desenrolar desse trabalho seria bem mais difícil. Agradeço muito pelo seu apoio e auxílio!

A todo o pessoal do Laboratório de Imunogenética da UFRGS, cada um da sua forma me enriqueceu muito profissionalmente e pessoalmente. Aprendi valiosas lições que levarei para toda a vida. Agradeço em especial, aos grandes amigos que lá fiz!

À Gabi, Gui, Bruno, Paula. Muito do que aprendi dentro do laboratório, devo a eles e nossa amizade foi além do profissional. Estas pessoinhas se tornaram grandes amigos fora do laboratório também e, portanto, agradeço pela amizade, apoio, companheirismo, e pelas incontáveis risadas!

À Dine, também pelo apoio, companheirismo e pela grande amizade, mas também pelas nossas longas conversas e confidências. Sou muito grata por ter conhecido e convivido com essa amiga tão querida e especial! À Tássia, que conheço há menos tempo, mas foi o suficiente para nos tornarmos grandes e verdadeiras amigas! Agradeço pelo seu apoio, grande amizade, pelas risadas e pela parceria nos sábados de trabalho que os tornaram muito mais agradáveis! À querida Jacque, pela amizade, pelos momentos de descontração e por me auxiliar tantas vezes, com palavras de apoio e dicas com os experimentos! Certamente estas amizades que surgiram irão perdurar por toda a vida!

Ao Tiago Veit e ao Tiago Dalberto, pelos conselhos profissionais, pelo apoio, e pelo auxílio prestado diversas vezes. Suas experiências foram de grande valor para mim! À Fe Rabaioli, à Pati, à Prizinha, à Bel, à Marcia, ao Pedro, pessoas especiais, que deixavam o ambiente de trabalho muito mais leve e agradável. Às colegas de disciplinas, Camila e Juliana! Ao pessoal da bioinformática, Dinler, Meg, Maurício, Dani, principalmente ao Gustavo, sempre prestativo e animado. À Francis pelo coleguismo dentro do laboratório.

Aos meus irmãos de coração, grandes e melhores amigos, Gissele, Felipe, Priscila, Pierre, Carla, Fernanda, Juliana, Cristhine, Leonardo que perto ou longe, sempre estão no meu coração! Agradeço, pelo apoio, pela amizade, pelas risadas, pelas confidências, por sempre estarem ao meu lado, em situações boas ou ruins. Amigos de uma vida, para a vida inteira!

A todas as mulheres portadoras de câncer de mama que aceitaram, apesar de suas dificuldades, participar deste estudo!

A todas as outras pessoas que não foram citadas, por algum deslize da memória, mas que sabem o quanto são especiais e o quanto eu sou grata!

Enfim, agradeço de coração a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, e que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível!

A TODOS, MUITO OBRIGADA!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE TABELAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Câncer de Mama: Epidemiologia e Etiologia	20
1.2 Características e Genética do Câncer	21
1.2.1 Instabilidade Genômica	26
1.2.1.1 Mutações e Câncer de Mama Familiar	29
1.2.1.2 Mutações e Câncer de Mama Esporádico	30
1.2.2 Câncer e Sistema Imunológico: Um Novo Marcador no Desenvolvimento Tumoral	32
1.3 Fatores de Diagnóstico e Prognóstico no Câncer de Mama	37
1.3.1 Tipo e Grau Histológico	39
1.3.2 Tamanho do Tumor e Comprometimento dos Linfonodos	42
1.3.3 Micrometástases na Medula Óssea	43
1.3.4 Classificação TNM	43
1.3.5 Receptores Hormonais de Estrogênio, Progesterona e Oncogene <i>HER2</i>	46
1.3.6 Classificação Molecular	49
1.3.7 Novos Fatores: Catepsina D, Ciclina D1, Ciclina E e Proteína Ki67	50
1.3.8 História Familiar	52
1.3.9 Idade	52
1.3.10 Fatores Ambientais	53
1.4 Diagnóstico do Câncer de Mama	55

1.5 Novos Genes Candidatos ao Diagnóstico e Prognóstico do Câncer de Mama	56
1.5.1 Receptores de Quimiocinas	56
1.5.1.1 CCR2	59
1.5.1.1.1 CCR2 e Doenças	60
1.5.1.2 CCR5	61
1.5.1.2.1 CCR5 e Doenças	63
1.5.2 HLA-G	64
1.5.2.1 <i>HLA-G 14pb</i>	66
1.5.2.2 <i>HLA-G +3142</i>	66
1.5.2.3 HLA-G e Doenças	67
1.6 Tratamento do Câncer de Mama e Medidas Profiláticas	68
2. OBJETIVOS	73
2.1 Objetivo Geral	73
2.2 Objetivos Específicos	73
3. MATERIAS E MÉTODOS	74
3.1 Delineamento do Estudo	74
3.2 Amostra	74
3.2.1 Critérios de Inclusão	74
3.2.2 Análise dos Polimorfismos	
3.3 Análise Estatística dos Dados	74
3.4 Aspectos Éticos	78
4. RESULTADOS	81
5. DISCUSSÃO	97
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
7. ANEXOS	113
ANEXO 1. Carta de Aprovação do CEP	113
ANEXO 2. Termo de Compromisso	114
ANEXO 3. Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AJI	Artrite Juvenil Idiopática
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
<i>ATM</i>	Gene que Codifica a Proteína Quinase Ataxia Telangiectasia Mutada
ATM	Proteína Quinase Ataxia Telangiectasia Mutada
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Proteína Quinase Ataxia Telangiectasia Relacionada
BER	Reparo por Excisão de Base
BIRADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
<i>BRCA1</i>	Gene do Câncer de Mama 1
<i>BRCA2</i>	Gene do Câncer de Mama 2
<i>BRIP1</i>	Gene Associado a <i>BRCA1</i> na Região Carboxiterminal da Helicase 1
C°	Grau Celsius
C-Terminal	Carboxiterminal
CCL2	Ligante 2 de Quimiocina CC
CCL5	Ligante 5 de Quimiocina CC
CCL7	Ligante 7 de Quimiocina CC
CCL8	Ligante 8 de Quimiocina CC
CCL13	Ligante 13 de Quimiocina CC
<i>CCND1</i>	Gene que Codifica a Ciclina D1
<i>CCR2</i>	Gene que Codifica o Receptor 2 de Quimiocina CC
CCR2	Receptor 2 de Quimiocina CC
<i>CCR5</i>	Gene que Codifica o Receptor 5 de Quimiocina CC
CCR5	Receptor 5 de Quimiocina CC
CCR6	Receptor 6 de Quimiocina CC
CD	Carcinoma Ductal
CD4	Cluster 4 de Diferenciação

CD25	Cluster 25 de Diferenciação
CDI	Carcinoma Ductal Invasor
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
<i>CDH1</i>	Gene que Codifica a Caderina Epiteial
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGH	Técnica de Hibridização Genômica Comparativa
<i>CHEK2</i>	Gene que Codifica a Quinase de Ponto de Checagem 2
CHK1	Quinase de Ponto de Checagem 1
CHK2	Quinase de Ponto de Checagem 2
CL	Carcinoma Lobular
CLI	Carcinoma Lobular Invasor
CLIS	Carcinoma Lobular <i>In Situ</i>
cm	Centímetros
CM	Carcinoma Medular
COX1	Enzima Ciclooxygenase do Tipo 1
COX2	Enzima Ciclooxygenase do Tipo 2
CPE	Centro de Pesquisa Experimental
CT	Carcinoma Tubular
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
CTL1	Linfócitos T Citotóxicos Tipo 1
CTL2	Linfócitos T Citotóxicos Tipo 2
CXCL12	Ligante 12 de Quimiocina CXC
CXCR3	Receptor 3 de Quimiocina CXC
CXCR6	Receptor 6 de Quimiocina CXC
DC	Célula Dendrítica
DDR	Resposta ao Dano do DNA
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfato
DSB	Quebra de Fita-dupla
E-Caderina	Caderina Epiteial
ECL2	Segundo Domínio Extracelular do CCR5
ECM	Matriz Extracelular

EGF	Fator de Crescimento Tumoral
EMT	Transição Mesenquimal-Epitelial
FCF2	Fator 2 de Crescimento de Fibroblasto
FoxP3	Fator de Transcrição da Proteína P3 Ligado ao X
GPCR	Receptores Acoplados à Proteína G
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H ₂ O	Molécula de Água
<i>HER2</i>	Gene do Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HER2	Proteína do Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-A	Antígeno Leucocitário Humano A
HLA-B	Antígeno Leucocitário Humano B
HLA-C	Antígeno Leucocitário Humano C
<i>HLA-G</i>	Gene que Codifica o Antígeno Leucocitário Humano G
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G
HPV	Papilomavírus Humano
HR	Recombinação Homóloga
IFN γ	Interferon Gama
IL1	Interleucina 1
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL17	Interleucina 17
IL23	Interleucina 23
IL35	Interleucina 35
IL1 α	Interleucina 1 Alfa
ILT2	Receptor Humano Inibitório 2
ILT4	Receptor Humano Inibitório 4
IMC	Índice de Massa Corporal

kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton
Ki67	Antígeno 67 Sinalizador de Proliferação Celular
LOH	Perda de Heterozigosidade
LS	Linfonodo Sentinela
MCP1	Proteína 1 Quimiotática de Monócitos
MCP2	Proteína 2 Quimiotática de Monócitos
MCP3	Proteína 3 Quimiotática de Monócitos
MCP4	Proteína 4 Quimiotática de Monócitos
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
μL	Microlitro
min	Minutos
MIP1α	Proteína 1 Alfa Inflamatória de Macrófagos
MIP1β	Proteína 1 Beta Inflamatória de Macrófagos
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP9	Metaloproteinase 9 de Matriz
mRNA	RNA Mensageiro
MYC	Gene que Codifica a Oncoproteína C-Myc
N-Terminal	Aminoterminal
NER	Reparo por Excisão de Nucleotídeos
NHEJ	Junção de Extremidades Não Homólogas
NK	Célula <i>Natural Killer</i>
Noxa	Proteína Pró-Apoptótica
p53	Proteína Supressora Tumoral 53
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PAG	Punção Aspirativa por Agulha Grossa
PALB2	Gene Associado e Colocalizador de <i>BRCA2</i>
pb	Pares de Bases

PCR-RFLP	Reação em Cadeia da Polimerase para Polimorfismo baseado no Tamanho do Fragmento de Restrição
PCR-SSP	Reação em Cadeia da Polimerase baseada na Sequência de <i>Primers</i> Específicos
PGE2	Prostaglandina E2
pmol	Picomol
PRE	Elemento de Resposta da Progesterona
<i>PTEN</i>	Gene Homólogo da Fosfatase e Tensina
Puma	Proteína Moduladora de Apoptose Regulada pela p53
RANTES	Quimiocina “Regulada por Ativação, Expressa e Secretada por Linfócitos T”
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
RS	Rio Grande do Sul
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo
ssDNA	DNA de Fita Simples
<i>STK11</i>	Gene 11 da Proteína Serina/Treonina Cinase
TGFβ	Fator Beta Transformador de Crescimento
Th1	Linfócitos T Auxiliares do Tipo 1
Th2	Linfócitos T Auxiliares do Tipo 2
Th17	Linfócitos T Auxiliares do Tipo 17
TIL	Linfócito T Infiltrante
TM	Domínio Transmembrana
TNM	Sistema que Integra o Tamanho Tumoral, Comprometimento dos Linfonodos e Metástase
TNFα	Fator Alfa de Necrose Tumoral
<i>TP53</i>	Gene Supressor Tumoral 53
Treg	Linfócitos T Regulatórios
Tris-HCl	Hidroximetilaminometano com Ácido Clorídrico
UCN-01	7-Hidróxi-Estaurosporina
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USG	Ultrassonografia

UTR	Região Não Traduzida
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGF-A	Fator A de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alterações cromossômicas mais frequentes em câncer de mama esporádico	32
Tabela 2.	Tipos de câncer de mama de acordo com a histologia	40
Tabela 3.	Gradações utilizadas para a classificação TNM	45
Tabela 4.	Estadiamento tumoral de acordo com as combinações das graduações do sistema TNM	46
Tabela 5.	Variáveis clínicas analisadas e número de casos para cada variável	83
Tabela 6.	Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as variantes do <i>CCR2</i> e <i>CCR5</i>	86
Tabela 7.	Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as variantes do <i>HLA-G</i>	87
Tabela 8.	Frequências genóticas e alélicas das variantes do <i>CCR2</i> e <i>CCR5</i>	88
Tabela 9.	Frequências genóticas e alélicas das variantes do <i>HLA-G</i>	89
Tabela 10.	Frequências haplotípicas das variantes do <i>CCR2</i> e <i>CCR5</i>	90
Tabela 11.	Frequências haplotípicas das variantes do <i>HLA-G</i>	91
Tabela 12.	Comparação dos tipos histológicos entre as mulheres com câncer de mama esporádico e câncer de mama familiar	92

Tabela 13. Relação do tipo histológico e a variante rs1799864 do <i>CCR2</i> , entre as mulheres com câncer de mama esporádico e câncer de mama familiar	94
Tabela 14. Relação entre os haplótipos das variantes do <i>CCR2</i> (rs1799864) e <i>CCR5</i> (rs333) e tipo histológico, entre as mulheres com câncer de mama esporádico e câncer de mama familiar	95
Tabela 15. Relação entre a ausência (negativo) ou presença (positivo) da expressão do receptor de progesterona e a variante rs1704 do <i>HLA-G</i> , entre as mulheres com câncer de mama esporádico e mulheres com câncer de mama familiar	96

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres. Sua etiologia é complexa, onde tanto fatores ambientais como genéticos podem contribuir para o desenvolvimento tumoral. Estima-se que 5 a 10% dos casos de carcinomas de mama sejam representados pelos carcinomas de mama familiar e 90 a 95% sejam representados pelos carcinomas de mama esporádicos. Independente da etiologia, um dos principais agravantes é consequência da habilidade das células tumorais metastizar. Mutações podem levar a mudança ou perda de expressão de diferentes genes e isto possibilita que as células adquiram particularidades genéticas e fenotípicas que contribuem para a progressão do tumor através da aquisição de vantagens que medeiam a sua sobrevivência. Dentre estas vantagens adquiridas está a capacidade das células tumorais de escaparem da destruição pelas células imunológicas ou, até mesmo, utilizarem estas células a seu favor, na promoção de um microambiente tumoral inflamatório que pode auxiliar o desenvolvimento da angiogênese que posteriormente facilitará a metástase. As características dos carcinomas de mama são as principais ferramentas para avaliação do diagnóstico e prognóstico da doença. Portanto, o objetivo de nosso trabalho foi a análise de quatro variantes polimórficas de genes que codificam importantes moléculas do sistema imunológico, duas relacionadas aos genes que codificam os receptores de quimiocinas, *CCR2* e *CCR5*, e duas relacionadas ao gene *HLA-G* em 188 mulheres com carcinoma de mama (105 com câncer de mama familiar e 83 com câncer de mama esporádico) e em 151 mulheres sem carcinoma e sem história familiar de câncer (grupo controle), como possíveis marcadores de diagnóstico e prognóstico do carcinoma de mama. Para a análise da variante do *CCR2*, denominada *CCR264I*, e para a análise de uma das variantes que codifica a molécula de HLA-G, denominada *+3142*, utilizou-se a técnica PCR-RFLP. Para a análise da variante do gene *CCR5*, denominada *CCR5delta32* e para a análise da outra variante do *HLA-G*, caracterizada pela inserção de 14pb na região 3'UTR do gene, utilizou-se a técnica PCR. As

frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas foram estimadas e comparadas entre os grupos de mulheres, usando o Teste Qui-Quadrado ou o Teste Exato de Fisher e, posteriormente, foram relacionadas a fatores de diagnóstico e prognóstico. Observou-se maiores frequências dos alelos selvagens do *CCR2*, *Val* ($p=0,040$, OR 0,61, IC 95% = 0,38 – 0,98) e do *CCR5*, *Wt* ($p=0,032$, OR 0,46, IC 95% = 0,23 – 0,94) e maior frequência do haplótipo duplo selvagem *Wt/Val* destas mesmas variantes gênicas dos genes *CCR2* e *CCR5*, nas mulheres do grupo controle ($p=0,030$) em relação às mulheres com câncer de mama familiar. Quando as variantes foram avaliadas em conjunto com os parâmetros clínicos, observou-se que as mulheres com carcinoma de mama esporádico apresentavam a doença em idade mais elevada ($57,29 \pm 8,457$ anos e $44,23 \pm 12,092$ anos para mulheres com câncer de mama esporádico e familiar, respectivamente, $p < 0.001$) e de forma mais agressiva, com maior frequência dos carcinomas invasores ($p = 0,001$) que as mulheres com carcinoma de mama familiar. Além disso, as variantes de inserção/deleção de 14 pb do HLA-G e *CCR264I*, mostraram relação positiva com a agressividade tumoral nestas mulheres ($p = 0,039$ e $p = 0,005$). Nossos dados sugerem que os carcinomas invasores possam estar relacionados a uma maior infiltração de células imunológicas e com o aumento da inflamação no microambiente tumoral, mediados pelo receptor CCR2 e pela molécula HLA-G, respectivamente.

Palavras-chave: Câncer de Mama Familiar; Câncer de Mama Esporádico; Invasão; Variantes.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer among women. Its etiology is complex, where genetic, environmental and endocrine factors contribute to tumor development. It is estimated that 5 to 10% of the breast cancers are represented by familial breast cancers and 90 to 95% are represented by sporadic breast cancers. Independent of the etiology, the major aggravating consequence is the ability of tumor cells to metastasize. Mutations can lead to a change or loss of expression a different genes and this allows the appearance of genetic and phenotypic features which contribute to tumor progression. Among these features is the ability of tumor cells to evade from the immune cells or even use immune cells in the promotion of a inflammatory microenvironment promotion which may help angiogenesis and, later, metastasis. The aim of our study was to evaluate four important polymorphic variants of genes which encode important immune system molecules, two related genes encoding chemokine receptors, *CCR2* and *CCR5*, and two related to *HLA-G* gene in 188 women with breast cancer (105 women with familial breast cancer and 83 with sporadic breast cancer) and 151 women without cancer and family history of cancer (control group), such as potential markers for diagnosis and prognosis of breast cancer. *CCR2* polymorphism, *CCR264I*, and one *HLA-G* polymorphism, +3142, were genotyped by PCR-RFLP. *CCR5delta32* and 14pb *HLA-G* polymorphism were genotyped by PCR. Allelic, genotypic and haplotypic frequencies were estimated and compared between the groups using the Chi-square test or Fisher's exact test and subsequently were associated to diagnostic and prognostic factors. We observed a higher allelic frequency of the *CCR2* wild type allele, *Val* ($p = 0.040$, OR 0.61, 95% CI = 0.38 - 0.98) e *CCR5* wild type allele, *Wt* ($p = 0.032$, OR 0.46, CI 95% = 0.23 - 0.94) and higher haplotype frequency of the double wild type variants (*Wt/Val*) of these same genes (*CCR2* and *CCR5*) in women in the control group ($p = 0.030$) compared to women with familial breast cancer. All polymorphisms were evaluated together with the clinical parameters and it was observed that women

with breast cancer showed sporadic cancer latter (57.29 ± 8.457 years and 44.23 ± 12.092 years for women with sporadic breast cancer and familial breast cancer, respectively, $p < 0.001$) and more invasiveness ($p = 0.001$) as compared to women with familial breast cancer. Moreover, the *HLA-G* 14pb and *CCR264I* polymorphism, showed a positive association with tumor aggressiveness in women with sporadic breast cancer ($p = 0.039$ and $p = 0.005$, respectively). Our data suggest that invasive cancers may be associated with increased immune cells infiltration and inflammation in the tumor microenvironment mediated by both CCR2 receptor and HLA-G molecule.

Keywords: Familial Breast Cancer; Sporadic Breast Cancer; Invasiveness; Polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama: epidemiologia e etiologia

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres (Mohammed *et al.*, 2008). Ele é a maior causa de morte por câncer em mulheres no mundo todo. Estima-se que para cada 100 mulheres, 12 irão desenvolver a doença e 5 provavelmente irão morrer em decorrência dela (Iorio *et al.*, 2008; Mohammed *et al.*, 2008).

Atualmente há um aumento na incidência do câncer de mama tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento. No Brasil, as taxas de mortalidade continuam aumentando, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados o que a torna um grave problema de saúde pública (<http://www.inca.gov.br>; Caleffi *et al.*, 2009). Estimativas para o ano de 2012 mostravam uma incidência em torno de 52.680 novos casos. O estado do Rio Grande do Sul (RS) possui uma das maiores taxas de incidência e mortalidade deste carcinoma no país, com estimativa de 81 novos casos para cada 100 mil mulheres. Especificamente para Porto Alegre, estimou-se aproximadamente 128 novos casos para cada 100 mil mulheres (<http://www.inca.gov.br>).

A etiologia do câncer de mama é complexa (Iorio *et al.*, 2008) onde fatores ambientais, como a exposição à radiação (Strumylaite *et al.*, 2010) e ao estrogênio à longo prazo (Abreu & Koifman, 2002), ingestão de álcool (Pieta *et al.*, 2012) e obesidade (Wolin *et al.*, 2010) e, fatores genéticos, como a predisposição hereditária associada a mutações em determinados genes (Tsuda, 2009), podem contribuir para as complicações da doença.

Independente dos tratamentos disponíveis, a maior causa de morbidade e mortalidade no câncer de mama é consequência da habilidade das células tumorais metastizar e conseqüentemente formar colônias tumorais em outros

tecidos e órgãos (Mohammed *et al.*, 2008). No começo, o tumor primário é formado por células não invasivas e não metastáticas. No entanto, durante a progressão tumoral, mutações podem levar a mudanças ou perda da expressão de diferentes genes (Algarra *et al.*, 2004) que fazem com que as células tornem-se metastáticas através da aquisição de particularidades genéticas e fenotípicas que não são características biológicas presentes no tumor primário (Algarra *et al.*, 2004; Mohammed *et al.*, 2008).

Ao contrário das células do tumor primário, as células metastáticas são menos suscetíveis à eliminação via terapia aplicada externamente ou à eliminação pelos mecanismos de defesa do organismo (Kleinberg *et al.*, 2006), e isto ocorre mesmo com uma resposta imunológica ativa e aparentemente normal de um sistema imunológico saudável (Algarra *et al.*, 2004; Mohammed *et al.*, 2008). Sendo assim, para que as células normais evoluam progressivamente para o estado neoplásico e posteriormente tornem-se malignas, elas necessitam adquirir diferentes características durante o curso da carcinogênese que irão conferir vantagens que permitirão a sobrevivência e a proliferação tumoral (Kleinberg *et al.*, 2006; Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2 Características e Genética do Câncer

Até pouco tempo, seis características celulares eram consideradas como as principais responsáveis pelo desenvolvimento tumoral: a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa; a capacidade de evadir dos supressores tumorais; a resistência à morte celular; a imortalidade replicativa; a indução da angiogênese; e finalmente, a capacidade de invasão que permite a disseminação metastática (Luo *et al.*, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

De modo geral, as células cancerígenas desregulam os sinais que controlam o ciclo de divisão e crescimento celular e isto provoca um colapso na homeostase tecidual e conseqüentemente nas suas funções e arquitetura. Além de desregular a sinalização celular, as células cancerígenas são capazes de

produzir outros sinais que as levarão a proliferar, como os fatores de crescimento tumorais (EGF) para os quais elas respondem via a expressão de receptores específicos. Este processo é denominado de estimulação proliferativa autócrina. Estes sinais proliferativos produzidos pelas células cancerígenas também são capazes de estimular as células saudáveis que estão dentro do estroma associado ao tumor, que de forma recíproca, suprem as células cancerígenas com mais EGFs. Tanto a alteração nos níveis dos EGFs, quanto à alteração nos níveis de expressão dos receptores, podem beneficiar o desenvolvimento tumoral. Destas formas, as células cancerígenas obtêm o controle do crescimento, do desenvolvimento e de outras propriedades biológicas (Berz & Wanebo, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011).

Para que o crescimento e a proliferação das células cancerígenas sejam contidos, são necessários reguladores capazes de inativar esses processos denominados de proteínas supressoras tumorais. No câncer de mama, uma das proteínas supressoras tumorais mais estudadas é a proteína supressora tumoral 53 (p53). Esta proteína é capaz de controlar a proliferação celular ou ativar os mecanismos de senescência e apoptose através da captação de sinais que são liberados em situações de estresse celular e de anormalidades intracelulares (Ohgaki & Kleihues, 2009; Tsuda, 2009). Se, por exemplo, os sinais que promovem o crescimento ou que controlam os níveis de oxigenação das células não estiverem ideais, a proteína p53 pode parar o ciclo celular até que estes níveis voltem aos normais. Se ocorrer um dano extremamente prejudicial à célula ou irreparável, a proteína p53 engatilha a apoptose. A apoptose induzida por esta proteína é regulada pela expressão de outras proteínas denominadas Noxa e Puma, que são produzidas em resposta as quebras no DNA e a outras anormalidades cromossômicas. Se a proteína p53 perder sua função, o sensor de dano que induz a morte celular é eliminado e a célula cancerígena consegue seguir a proliferação (Vousden & Ryan, 2009).

A ausência da morte celular em caso de dano, descrita anteriormente, destaca a importância da morte celular por apoptose para evitar a proliferação de

células potencialmente tumorais. Quando as células são capazes de evitar a apoptose ou a senescência, elas tornam-se imortais, ou seja, com a capacidade de se replicar ilimitadamente. Esta capacidade também é atribuída principalmente à superexpressão da telomerase. A telomerase é uma enzima polimerase de ácido desoxirribonucléico (DNA), especializada, que adiciona segmentos repetidos na extremidade do DNA telomérico. Nas células saudáveis, ao contrário das células tumorais, as extremidades dos telômeros encurtam progressivamente a cada divisão, o que limita o número de divisões celulares e conseqüentemente o tempo de vida da célula (Hanahan & Weinberg, 2011).

Outro mecanismo celular importante para o desenvolvimento tumoral é a autofagia, que ao contrário da apoptose pode favorecer a proliferação das células tumorais. Este mecanismo é induzido em certos estados de estresse celular, como a deficiência de nutrientes. A autofagia faz com que as células quebrem suas organelas, como os ribossomos e mitocôndrias. Como consequência, os catabólitos resultantes destas quebras são reciclados e utilizados na biossíntese e no metabolismo energético celular. No início da tumorigênese a autofagia parece eliminar as células cancerígenas, no entanto, no decorrer do processo de desenvolvimento do carcinoma, a autofagia é essencial para a manutenção da sobrevivência celular cancerígena em ambientes com nutrientes limitados (Luo *et al.*, 2009).

Assim como os tecidos normais, os tecidos tumorais também necessitam de nutrientes, oxigênio e precisam liberar o lixo metabólico e o dióxido de carbono produzido. Para suprir essas necessidades, uma nova vasculatura associada ao tumor é formada. Esta neovascularização é denominada de angiogênese. A angiogênese é regulada por proteínas sinalizadoras, como o fator A de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), que se ligam aos receptores celulares presentes nas superfícies das células endoteliais vasculares. Além disso, em alguns tumores, os sinais que induzem a angiogênese são liberados por oncogenes, e em outros, podem ser liberados indiretamente por células

inflamatórias imunológicas (Luo *et al.*, 2009; Berz & Wanebo, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011).

Após a angiogênese as células tornam-se aptas a invadir e metastizar outros tecidos e órgãos. As cascatas de invasão tecidual e disseminação metastática correspondem a uma sucessão de mudanças biológicas que tem início com a proliferação celular local, seguida pela intravasão das células cancerígenas nos vasos sanguíneos e linfáticos próximos, e do tráfego destas células no organismo através dos sistemas linfático e hematogênico. Isto possibilita o escape das células de alguns dos vasos para tecidos distantes do parênquima, processo denominado de extravasão. Assim, formam-se pequenos nódulos de células cancerígenas denominadas micrometástases e, finalmente, o crescimento das lesões micrometastáticas em tumores macroscópicos, processo este denominado de colonização (Hanahan & Weinberg, 2011).

No câncer de mama, metástases macroscópicas podem surgir décadas após o tumor primário ser removido cirurgicamente ou ter sido farmacologicamente destruído. Este crescimento tumoral metastático é consequência de micrometástases dormentes. Uma das possíveis explicações para esta dormência é que a privação de nutrientes poderia induzir intensa autofagia que causaria a diminuição das células cancerígenas, fazendo-as adotar um estado reversível de dormência. O crescimento e a proliferação celular apenas retornam quando mudanças no microambiente tecidual, como o acesso a mais nutrientes, permitem. Outros mecanismos de dormência micrometastáticas podem também envolver sinais anticrescimento incorporados no tecido normal da matriz extracelular (ECM) e ações de supressão tumoral do sistema imunológico (Luo *et al.*, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

A progressão das células para a neoplasia maligna é reflexo da invasão tecidual e da presença de metástases à distância. Para que ocorra essa progressão, as células cancerígenas desenvolvem alterações na sua forma, assim como, no contato com outras células e com a ECM. A alteração das células cancerígenas mais bem caracterizada envolve a perda da caderina epitelial (E-

caderina), que é uma importante molécula de adesão celular (Korkola *et al.*, 2003; Tsuda, 2009). A diminuição da expressão da E-caderina é conhecida por potencializar a invasão e metástase. Outra modificação importante, que propicia a invasividade e metástase, é a transição das células epiteliais para células mesenquimais (EMT). Esta modificação torna as células facilmente adaptáveis e hábeis para invadir, resistir a apoptose e disseminar (Luo *et al.*, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

As modificações e adaptações que as células irão sofrer durante o curso da tumorigênese são ditadas pelo tipo de disseminação cancerígena e pela natureza do microambiente tecidual. No entanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que regulam a invasão e metástase, principalmente no que se refere à preferência do microambiente metastático à distância (Zlotnik, 2006).

Órgãos como o pulmão, fígado, medula óssea e linfonodos são locais frequentes de metástase de muitos cânceres, enquanto outros órgãos como estômago e rins, raramente são destinos metastáticos (Zlotnik, 2006). Em um estudo realizado por Zlotnik, observou-se que alguns cânceres que expressam o ligante 12 de quimiocina CXC (CXCL12), possuem sítios metastáticos em comum, o que sugere que a preferência metastática possa estar relacionada à interação das quimiocinas e seus respectivos receptores nesses sítios, e desta forma, pode-se supor também, que alterações nestas quimiocinas ou nos receptores poderiam definir também a ausência ou presença da metástase, já que as expressões alteradas das moléculas relacionadas à migração celular refletem consequências na progressão, nas mudanças das condições de crescimento e, no microambiente tumoral (Davidson *et al.*, 2005; Zlotnik, 2006).

Adjacente às características descritas anteriormente, que capacitam a célula para o desenvolvimento tumoral, na última década adicionou-se a capacidade de reprogramação do metabolismo energético, que permite a produção de energia para as células tumorais, tanto com a presença de oxigênio, quanto em condições de hipóxia. O mecanismo de reprogramação torna as

células cancerígenas mais econômicas, ou seja, estas células reprogramadas energeticamente necessitam de menor produção de adenosina trifosfato (ATP) pela glicólise para obter energia. Este processo é denominado de glicólise anaeróbica e está associado com a ativação de oncogenes e supressores tumorais mutados (Hanahan & Weinberg, 2011).

A aquisição de todas as características que proporcionam às células as capacidades de sobreviver, proliferar e disseminar só é possível devido principalmente a duas características permissivas (Luo *et al.*, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011). Essas características são a instabilidade genômica, que gera mutações randomizadas, incluindo-se as raras mutações genéticas que podem comandar as outras modificações celulares e gerar a diversidade genética que acelera a aquisição tumoral e; a inflamação consequente das lesões pré-malignas e malignas (Tsuda, 2009). Estas duas características permissivas por ser o foco deste trabalho, serão mais bem detalhadas posteriormente, junto com outra nova característica que capacita o desenvolvimento tumoral, que é a evasão das células tumorais da destruição imunológica.

1.2.1 Instabilidade Genômica

A manutenção da estabilidade genômica é de vital importância para proteger as células contra as perigosas consequências do dano ao DNA. Esta manutenção é realizada por um grande arsenal de enzimas de reparo do DNA que removem uma ampla variedade de lesões do genoma. Quando este reparo é ineficiente ou impreciso dá-se início a instabilidade genômica, que como descrito anteriormente, pode levar ao desenvolvimento de tumores ou à morte celular (Luijsterburg & Attikum, 2011).

O reparo e a consequente neutralização dos efeitos adversos das lesões no DNA ocorrem através da ativação da resposta ao dano do DNA (DDR), que implica em uma série coordenada de eventos que irão controlar a progressão do

ciclo celular e então reparar as lesões. Em condições normais, quando estas lesões não são reparadas, vias de sinalização são engatilhadas e atrasam ou impedem o ciclo celular antes que ocorra a replicação do DNA, ou antes, que ocorra a divisão celular (Luijsterburg & Attikum, 2011).

O DNA encontra-se sob uma forma empacotada por interação com histonas e proteínas não histonas, em uma estrutura condensada, frequentemente inacessível, chamada cromatina e, portanto, para que a maquinaria de reparo atue eficientemente na lesão do DNA, ela necessita ultrapassar esta estrutura que se torna uma barreira física à maquinaria de reparo. Para isso, as células utilizam mecanismos pós-traducionais de modificação de histonas, como a acetilação, a metilação, a fosforilação e a ubiquitilação, e fatores de remodelagem da cromatina, que irão proporcionar o acesso da maquinaria de reparo às lesões (Luijsterburg & Attikum, 2011).

Após acessar as lesões, a maquinaria de reparo utiliza diferentes mecanismos: danos que provocam oxidação, desaminação, alquilação ou troca de bases, são removidos por excisão de base (BER), no qual o dano e a região que flanqueia o DNA são removidos e a lacuna resultante é sintetizada novamente, de forma correta, usando a complementariedade da fita de DNA como modelo; danos induzidos por radiação ultravioleta (UV), que distorcem a hélice do DNA, são reparados por excisão de nucleotídeos (NER) e; danos que afetam ambas as fitas de DNA, como as quebras de fita-dupla (DSB), são removidos por recombinação homóloga (HR), que retira os fragmentos de DNA e utiliza as cromátides-irmãs que estão presentes após a replicação como modelo para direcionar o reparo. Alternativamente, na ausência de uma fita molde, os DNAs quebrados podem se unir por um mecanismo denominado junção de extremidades não homólogas (NHEJ). O reparo de NHEJ das DSBs é um modo livre de erros e é uma via de reparo dominante nas células mamíferas (Maynard *et al.*, 2009; Luijsterburg & Attikum, 2011).

Para que estes mecanismos de reparo ocorram, é necessário que duas proteínas quinases importantes atuem após a sinalização que é induzida pelo

dano no DNA: a proteína quinase ataxia telangiectasia mutada (ATM) e a proteína quinase ataxia telangiectasia relacionada (ATR). Ambas coordenam a montagem da maquinaria de reparo e das proteínas nos pontos de checagens nos locais do dano. Enquanto a proteína ATM é ativada pelas DSBs, a ativação da proteína ATR ocorre sobre as regiões de DNA de fita única (ssDNA), que surgem devido as paradas na forquilha de replicação ou devido ao processamento das DSBs ou pelas lesões induzidas por UV. Além disso, a sinalização induzida pelo dano irá ativar a proteína p53, já descrita anteriormente, e outras proteínas importantes que irão controlar a atividade dos reguladores celulares e das enzimas que coordenarão o reparo do DNA, como a proteína quinase de ponto de checagem 1 (CHK1) e a proteína quinase de ponto de checagem 2 (CHK2) (Turnbull & Rahman, 2008).

Caso ocorra alguma falha, em qualquer passo do processo de reparo, que faça com que ele não atue eficientemente, ocorrerão às mutações. Certos genótipos mutantes conferem vantagens seletivas aos clones celulares, permitindo seu crescimento e eventual dominância em um ambiente tecidual. No curso da aquisição de genes mutantes necessários para promover a tumorigênese, as células cancerígenas podem aumentar as taxas de mutação. Esta mutabilidade pode ser alcançada, por exemplo, através do aumento da sensibilidade a agentes mutagênicos. Além disso, o acúmulo de mutações pode ser acelerado pelo comprometimento do sistema de vigilância que normalmente monitora a integridade genômica e força geneticamente as células danificadas a senescência ou apoptose (Hanahan & Weinberg, 2011).

Alguns fenótipos herdáveis, como genes supressores tumorais inativados, também podem ser adquiridos não por mutações e sim através de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações de histonas, além disso, algumas expansões clonais podem ser engatilhadas por mudanças não mutacionais que afetam a regulação da expressão gênica (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.2.1.1 Mutações e Câncer de Mama Familiar

Estima-se que 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama sejam hereditários. Vários genes envolvidos no controle da proliferação celular e da integridade genômica podem apresentar mutações na linhagem germinativa que causam uma pré-disposição hereditária à doença e poderão ser responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do carcinoma (Tsuda, 2009). A maioria dos carcinomas hereditários está associado a mutações germinativas no gene do câncer de mama 1 (*BRCA1*) e no gene do câncer de mama 2 (*BRCA2*) (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994; Offit, 1998; De Jong *et al.*, 2002). Estudos populacionais para estes genes estimam que o risco de desenvolver a doença em torno dos 70 anos de idade pode ser de 65% e 45% para portadores das mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente. Mutações nestes genes também estão associadas com aumento do risco de câncer ovariano (Antoniou *et al.*, 2008).

Além do *BRCA1* e do *BRCA2*, que são genes de predisposição de alta penetrância, ou seja, conferem uma maior probabilidade que a doença seja expressa nos indivíduos que apresentam as mutações nesses genes, mutações em outros genes também estão relacionadas com a predisposição ao câncer de mama familiar (Antoniou *et al.*, 2008). Mutações no gene supressor tumoral 53 (*TP53*), por exemplo, também estão associadas a um alto risco de desenvolver tumores, entre eles o câncer de mama familiar. Outros genes como o gene que codifica a quinase *CHK2* (*CHEK2*), o gene que codifica a proteína *ATM* (*ATM*), o gene associado a *BRCA1* na região carboxiterminal da helicase 1 (*BRIP1*) e o gene associado e colocalizador de *BRCA2* (*PALB2*), estão relacionados a mutações raras e conferem um risco intermediário ao câncer de mama familiar (Ye *et al.*, 2007; Turnbull & Rahman, 2008). Além disso, estudos de associação identificaram oito variantes comuns de baixa penetrância, localizadas nas seguintes regiões cromossômicas: no braço longo do cromossomo 10, na região 26 (10q26); no braço longo do cromossomo 16, na região 12 (16q12); no braço longo do cromossomo 2, na região 35 (2q35); no braço longo do cromossomo 8,

na região 25 (8q25); no braço curto do cromossomo 5, na região 12 (5p12); no braço curto do cromossomo 11, na região 15 (11p15); no braço longo do cromossomo 5, na região 11 (5q11) e; no braço longo do cromossomo 2, na região 33 (2q33). Há ainda, os genes de penetrância desconhecida, como o gene homólogo da fosfatase e tensina (*PTEN*), o gene 11 da proteína serina/treonina cinase (*STK11*), e o gene que codifica a E-Caderina (*CDH1*). No entanto, apesar de todas essas descobertas, 70% da predisposição hereditária do câncer de mama familiar permanecem sem explicações (Turnbull & Rahman, 2008).

1.2.1.2 Mutações e Câncer de Mama Esporádico

Os carcinomas de mama esporádicos representam aproximadamente 90 a 95% dos carcinomas das mulheres com câncer de mama. Estes carcinomas apresentam-se sobre diversas formas em termos de estágio e comportamento clínico, características histológicas e alterações moleculares. Um grande número de alterações gênicas e cromossômicas já foi identificado nas células somáticas destes carcinomas. As alterações genéticas geralmente encontradas são mutações pontuais, ampliações gênicas e alterações cromossômicas estruturais e numéricas, como deleções, duplicações e recombinações, como os isocromossomos e as translocações (Tsuda, 2009).

As mutações pontuais são substituições de bases únicas, que causam a substituição de um único aminoácido que poderá levar a formação de um códon de terminação precoce com a consequente produção de um produto gênico truncado. Estas mutações podem contribuir para a inativação de genes supressores tumorais ou para a ativação de proto-oncogenes, como certas mutações no gene *TP53* e no gene *CDH1* (Tsuda, 2009).

As ampliações gênicas do DNA podem produzir milhares de cópias de proto-oncogenes que estão localizados na unidade de amplificação, que ao serem ativados provocarão a superexpressão da proteína. Estas ampliações podem

ocorrer com mais de centenas de milhares de kilobases (kb) nas células cancerígenas. O gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER2*), localizado no braço longo do cromossomo 17, região 11.2 (17q11.2); o gene que codifica a ciclina D1, (*CCND1*), localizado no braço longo do cromossomo 11, região 13 (11q13) e; o gene que codifica a oncoproteína c-myc, (*MYC*), localizado no braço longo do cromossomo 8, região 24 (8q24), são exemplos de alvos de ampliações gênicas bem conhecidas em câncer de mama esporádico (Tsuda, 2009).

As alterações cromossômicas numéricas, que foram inicialmente detectadas como perdas de heterozigosidades (LOH), estão relacionadas à perda de um dos dois alelos do gene. A LOH nos braços curto e longo do cromossomo 1 (1p e 1q, respectivamente), no braço curto do cromossomo 3 (3p), no braço curto do cromossomo 7 (7p), no braço curto do cromossomo 11 (11p), no braço longo do cromossomo 13 (13q), no braço longo do cromossomo 16 (16q), nos braços curto e longo do cromossomo 17 (17p e 17q, respectivamente) e no braço longo do cromossomo 18 (18q), são reportadas com frequência nas células dos carcinomas. Duplicações nos braços longos dos cromossomos 1, 8, 11, 17 e 20 (1q, 8q, 11q, 17q, e 20q, respectivamente) e deleções nos braços curtos dos cromossomos 1, 8, 17 e 22 (1p, 8p, 17p, e 22p, respectivamente) e nos braços longos dos cromossomos 11 e 16 (11q e 16q, respectivamente), são as alterações mais frequentemente encontradas por hibridização genômica comparativa (CGH) (Tsuda, 2009), uma técnica molecular citogenética capaz de detectar alterações cromossômicas através da marcação com fluoróforos. Na Tabela 1, encontram-se as alterações cromossômicas mais frequentes e o índice da frequência de cada uma delas.

Tabela 1. Alterações cromossômicas mais frequentes em câncer de mama esporádico

Tipos de Alterações	Gene ou Braço Cromossômico	Incidência (%)
Amplificações Gênicas	<i>HER2</i> (17q11.2-q12)	15-25
	<i>CCND1</i> (11q13)	13
	<i>MYC</i> (8q24)	4
Mutações Pontuais	<i>TP53</i> (17p13.1)	30-35
	<i>CDH1</i> (16q22.1)	47
Perda de Heterozigosidade	1p, 1q, 3p, 7q, 11p, 13q, 16q, 17p, 17q, 18q	10-50
Duplicações nos Braços Cromossômicos	1p, 8q, 11q, 17q, 20q	-
Deleções nos Braços Cromossômicos	1p, 8p, 11q, 16q, 17p, 20q, 22p	-
Rearranjos Cromossômicos	i(1)(q10)	21
	der(1;16)(q10;p10) ou der(16)t(1;16)	17-38

Nota: i refere-se à isocromossomo; der refere-se à cromossomo derivativo; t refere-se à translocação. Fonte: Adaptado de Tsuda, 2009.

1.2.2 Câncer e Sistema Imunológico: um novo marcador do desenvolvimento tumoral

Para a melhor compreensão das funções do sistema imunológico relacionadas ao câncer, primeiramente serão descritos, de modo geral, alguns conceitos básicos em imunologia.

Os mecanismos de defesa utilizados pelo organismo são mediados pela imunidade inata, também conhecida como imunidade natural ou nativa e, pela imunidade adaptativa, também conhecida como imunidade específica. A imunidade inata consiste de mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam no organismo antes do estabelecimento da patologia e que estão programados para responder rapidamente. Os principais componentes desta resposta imunológica são: 1) barreiras físicas e químicas; 2) células fagocitárias,

como os neutrófilos e macrófagos, e células *natural killer* (NK); 3) proteínas do sangue, como frações do sistema complemento, que servem para opsonizar antígenos e induzir a resposta inflamatória, além de outros mediadores da inflamação e; 4) proteínas denominadas citocinas. A imunidade adaptativa é estimulada pela exposição a certos antígenos. Os principais componentes dessa imunidade são os linfócitos e os seus produtos, como os anticorpos. Além disso, a imunidade adaptativa pode ainda ser dividida em imunidade humoral e celular: a imunidade humoral é mediada por anticorpos que são produzidos pelos linfócitos B e é eficiente na destruição de antígenos extracelulares; já a imunidade celular é mediada pelos linfócitos T que são capazes de destruir antígenos intracelulares ou destruir as células infectadas (Abbas *et al.*, 2008).

Em relação aos carcinomas, o sistema imunológico parece conseguir tanto antagonizar, quanto favorecer o desenvolvimento e a progressão tumoral. Segundo a teoria da imunovigilância, todas as células e tecidos são constantemente monitorados por um sistema imunológico sempre alerta que reconhece e elimina a grande maioria das células que poderiam resultar em tumores. Este processo é denominado imunoedição. A hipótese da imunoedição divide a resposta imunológica ao câncer em três fases: 1) Fase destrutiva, de “eliminação do tumor”; 2) Fase estável, de equilíbrio entre a resposta imunológica e o desenvolvimento tumoral e; 3) Fase de escape caracterizada pela progressão tumoral (Hanahan & Weinberg, 2011).

Geralmente a resposta imunológica que elimina o tumor ou atrasa o seu desenvolvimento envolve a produção de interferon gama (IFN-gama), que é uma importante citocina que exerce efeitos antitumorais e envolve a proliferação de linfócitos T citotóxicos (CTL), que apresentam reatividade às células tumorais (Dougan & Dranoff, 2009). Porém, algumas células tumorais escapam da detecção da imunidade inata e adaptativa e, conseqüentemente, não são erradicadas. Além disso, as células inflamatórias que infiltram os tumores parecem induzir e ajudar a sustentar a angiogênese tumoral, através da estimulação da proliferação das células cancerígenas facilitando a invasão

tecidual e dando suporte à disseminação metastática (Hanahan & Weinberg, 2011; Tsai *et al.*, 2012).

Tanto microambientes tumorais pró-inflamatórios, quanto microambientes tumorais anti-inflamatórios podem influenciar na progressão tumoral. As células inflamatórias que parecem favorecer o desenvolvimento do tumor abrangem tanto células da linhagem mielóide, quanto células da linhagem linfóide. Estas células liberam moléculas de sinalização que inibem a resposta imunológica e ao mesmo tempo, servem como efetores tumorais através da indução do crescimento da neovascularização, das modificações na arquitetura tecidual e do recrutamento de mais células imunossupressoras. As principais moléculas de sinalização liberadas são: o EGF; o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); outros fatores pró-angiogênicos, como o fator 2 de crescimento de fibroblasto (FCF2) e enzimas de degradação de matriz, como a metaloproteinase 9 de matriz (MMP9); as proteases catepsinas, cisteínas e heparanases; as quimiocinas e citocinas e; os sinais indutíveis que levam a ativação da EMT (Berz & Wanebo, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011).

Dentre todas as células imunológicas envolvidas no desenvolvimento tumoral, os linfócitos T parecem ter uma função central tanto na evasão das células tumorais, quanto na relação entre ambiente inflamatório e a progressão tumoral (Algarra *et al.*, 2004).

Os linfócitos T apresentam uma especificidade restrita para alguns antígenos. Eles reconhecem apenas peptídeos antigênicos ligados a proteínas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que é expresso na superfície de outras células que são denominadas de células apresentadoras de antígenos (APCs) (Abbas *et al.*, 2008). Os dois principais grupos de linfócitos T são: os linfócitos TCD4 e os linfócitos TCD8. Parte dos linfócitos TCD4+ pode diferenciar-se em linfócitos T regulatórios (Tregs) e em outras três linhagens efetoras baseadas na expressão das citocinas: de forma simplificada, se as células produzem IFN-gama e fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa), são consideradas linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1); se as células

produzem interleucina 4 (IL4), são consideradas linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2) e; se as células produzem interleucina 17 (IL17), são consideradas linfócitos T auxiliares do tipo 17 (Th17). Assim como os linfócitos TCD4+, os linfócitos TCD8+ também se diferenciam em subgrupos: linfócitos T citotóxicos tipo 1 (CTL1) e linfócitos T citotóxicos tipo 2 (CTL2), que secretam citocinas do tipo Th1 ou Th2, respectivamente (Hanahan & Weinberg, 2011).

Em relação à evasão, um dos mecanismos conhecidos, mais utilizados pelas células tumorais para escapar da erradicação imunológica mediada pelos linfócitos T, envolve a diminuição da expressão do MHC que faz com que as células não sejam reconhecidas pelos CTLs (Abbas *et al.*, 2008). Além disso, as células tumorais conseguem paralisar a infiltração dos CTLs e das células NK, pela secreção do fator transformador do crescimento beta (TGF-beta) e outros fatores imunossupressores (Algarra *et al.*, 2004; Hanahan & Weinberg, 2011).

Em relação ao microambiente inflamatório, os linfócitos T podem ser suprimidos ou recrutados para o microambiente tumoral, de acordo com as células e fatores funcionais prevalentes naquele meio (Dougan & Darnoff, 2009).

Em alguns tumores, a presença de algumas citocinas, e em especial de algumas quimiocinas, via sua detecção por receptores específicos, podem recrutar os linfócitos T efetores circulantes para infiltrar no tecido tumoral (Borroni *et al.*, 2010). A infiltração destas células parece gerar um ambiente extremamente inflamatório que auxilia o desenvolvimento da tumorigênese. Contudo, além de promover um ambiente pró-inflamatório, as citocinas também parecem ter a capacidade de promover um ambiente anti-inflamatório, através do recrutamento de linfócitos Tregs para os tecidos tumorais (Oldham *et al.*, 2012). Estes linfócitos são caracterizados pela expressão do fator de transcrição da proteína P3 ligado ao X (FoxP3) e pela expressão das moléculas do cluster 4 de diferenciação (CD4) e do cluster 25 de diferenciação (CD25). Eles favorecem a supressão da resposta imunológica através da secreção do TGF-beta e da interleucina 35 (IL35). A infiltração dos linfócitos Tregs é geralmente correlacionada com mau prognóstico e já foi encontrada em diversos tipos de câncer, como câncer de ovário, câncer de

fígado, câncer de mama (Dougan & Dranoff, 2009) e câncer de células renais (Borroni *et al.*, 2010).

Ainda em relação ao microambiente tumoral inflamatório, uma importante citocina liberada pelos linfócitos T que tem função essencial em muitos cânceres é o TNF-alfa. O aumento em seus níveis já foi relacionado com o mieloma múltiplo, com o câncer de mama e com o câncer gástrico, na promoção do crescimento celular, da sobrevivência das células tumorais, da angiogênese e do recrutamento das células imunológicas efetoras (Hanahan & Weinberg, 2011).

Outras citocinas inflamatórias também capazes de auxiliar o desenvolvimento do câncer incluem a interleucina 6 (IL6), a interleucina 1 (IL1) e, principalmente, a interleucina 23 (IL23) que já foi encontrada em vários tumores e sua produção também dá suporte à diferenciação do subgrupo de linfócitos T que preferencialmente produzem a IL17, conhecida por ser superexpressa em câncer cervical (Dougan & Darnoff, 2009).

A morte celular, da mesma forma que as citocinas, também parece ter um importante papel na inflamação e no desenvolvimento do câncer. Quando as células tumorais morrem por apoptose, são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos e células dendríticas (DC), e este processo, promove a produção de citocinas anti-inflamatórias. No entanto, quando as células morrem através de necrose, ocorre a produção de sinais pró-inflamatórios que estimulam o desenvolvimento tumoral (Dougan & Dranoff, 2009). Entre os fatores regulatórios bioativos liberados pelas células necróticas, encontra-se a interleucina 1 alfa (IL1alfa) que tem a capacidade de diretamente estimular a proliferação celular. Portanto, neoplasias em formação e tumores potencialmente metastáticos, podem ganhar vantagem se tolerarem algum grau de morte necrótica celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

A relação entre o sistema imunológico e os carcinomas ainda é bastante controversa. Enquanto sugere-se que as células tumorais possam evadir ou manipular a resposta imunológica como visto em relação à inflamação e o

microambiente tumoral; outras evidências sugerem a existência de uma resposta imunológica antitumoral que pode ocorrer de forma espontânea e é correlacionada com bom prognóstico. Esta correlação é particularmente forte nos casos dos carcinomas de origem viral e para as células cancerígenas que são infiltradas por linfócitos TCD8+ e por linfócitos T de memória (Dougan & Dranoff, 2009). Tumores de cólon e ovariano que são fortemente infiltrados pelas CTLs e pelas células NKs, possuem melhor prognóstico do que aqueles que não apresentam tal abundância destes linfócitos. Além disso, observa-se que em alguns órgãos imunossuprimidos de transplantados há o desenvolvimento de carcinomas derivados dos doadores, o que sugere que nos doadores livres do tumor, as células cancerígenas estavam controladas, em um estado dominante por um sistema imunológico completamente funcional (Hanahan & Weinberg, 2011).

Ainda há muito para compreender sobre a função das células imunológicas no desenvolvimento e na erradicação do câncer. Os complexos mecanismos imunológicos podem ter implicações importantes no tratamento do tumor e, até mesmo, podem ser utilizados para auxiliar o diagnóstico e definir o prognóstico dos carcinomas (Dougan & Dranoff, 2009). Um exemplo de marcador imunológico que pode ser utilizado para estes fins é a inflamação, já que em alguns casos, esta situação parece ser evidência dos estágios iniciais da progressão neoplásica (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.3 Fatores de Diagnóstico e Prognóstico no Câncer de Mama

Com o passar das décadas, grandes avanços foram feitos rumo à elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no câncer de mama e na identificação de novas moléculas biomarcadoras de diagnóstico e prognóstico (Iorio *et al.*, 2008). Porém, os mecanismos moleculares que levam a metástase e a consequente progressão do tumor, ainda são pouco conhecidos (Turnbull & Rahman, 2008). Isto se deve principalmente ao fato do câncer de mama ser uma

doença heterogênea com variada aparência morfológica, com diferentes perfis moleculares, comportamentos biológicos e respostas à terapia (Turnbull & Rahman, 2008; Rakha *et al.*, 2010; Weigel & Dowsett, 2010).

O câncer de mama é um tipo tumoral que se desenvolve de forma relativamente lenta, portanto a possibilidade do estabelecimento de um diagnóstico ainda em fase precoce é elevada. O tempo médio de duplicação celular é de 100 dias, ou seja, um tumor leva cerca de oito anos para alcançar um centímetro (cm) de diâmetro (Abreu & Koifman, 2002). Sendo assim, o comportamento do câncer de mama e as modificações celulares e teciduais, que ocorrerão durante o desenvolvimento da doença, são utilizados como fatores de diagnóstico e como fatores prognósticos, para dar suporte clínico a uma melhor avaliação do tumor e para auxiliar na decisão sobre as opções de tratamento (Rakha *et al.*, 2010; Weigel & Dowsett, 2010).

Dentre as principais variáveis utilizadas na avaliação do diagnóstico e prognóstico clínico estão: a histologia tumoral; o grau histológico; o tamanho do tumor; a avaliação da presença de metástases para os linfonodos axilares e; a presença de micrometástases na medula óssea. Juntas, estas variáveis integram o sistema TNM (T refere-se às características do tumor primário, N refere-se às características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão que o tumor se localiza e M refere-se à presença ou ausência de metástases à distância), que irá definir a classificação tumoral segundo o estágio em que o tumor se encontra. Também são avaliadas outras variáveis clínicas importantes, como a expressão tumoral endócrina dos receptores hormonais de estrogênio (RE); dos receptores hormonais de progesterona (RP) e; da proteína do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Juntas, estas variáveis irão definir a classificação tumoral segundo o perfil molecular do tumor da mama. Fatores como a análise da expressão da proteína p53, dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, já descritos anteriormente; a análise da expressão da cathepsina D, ciclina D1 e ciclina E, e a análise da expressão do antígeno 67 sinalizador de proliferação celular (Ki67), também podem ser usados como marcadores de

diagnóstico e prognóstico; além da história familiar; idade e da influência de fatores ambientais externos (Abreu & Koifman, 2002; Rakha *et al.*, 2010; Weigel & Dowsett, 2010; Sanpaolo *et al.*, 2011).

1.3.1 Tipo e Grau Histológico Tumoral

Os carcinomas de mama são morfologicamente subdivididos de acordo com o seu padrão de crescimento e grau de diferenciação e semelhança às células epiteliais normais da mama. Estas subdivisões são denominadas tipo histológico e grau histológico, respectivamente (Rakha *et al.*, 2010).

As mamas são duas glândulas envolvidas em toda sua extensão por tecido adiposo, com exceção da região das auréolas, nas quais se localizam exteriormente as papilas, também denominadas mamilos. Internamente, as mamas são divididas em 15 a 20 lóbulos mamários independentes que são separados um do outro por tecido fibroso, de forma que cada lóbulo tenha sua via de drenagem que converge para os mamilos através de um sistema de ductos formados por células epiteliais. A partir desta constituição é que foram definidos os diferentes tipos do carcinoma de mama. Os carcinomas de mama mais frequentes são derivados do epitélio que reveste os ductos e os lóbulos e, portanto, são classificados como carcinoma ductal (CD) e carcinoma lobular (CL), respectivamente (Korkola *et al.*, 2003). Na Tabela 2 encontram-se listados os tipos de carcinomas mamários existentes, com a Doença de Paget inclusa, que se refere a um tipo tumoral que acomete a auréola e o mamilo.

Tabela 2. Tipos de câncer de mama de acordo com a histologia

Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
Carcinoma Lobular <i>In Situ</i>
Carcinoma Ductal Invasivo
Carcinoma Lobular Invasivo
Carcinoma Papilotubular
Carcinoma Micropapilar Invasivo
Carcinoma Tubular Sólido
Carcinoma Cirroso
Carcinoma Mucinoso
Carcinoma Medular
Carcinoma Adenóide Cístico
Carcinoma de Células Escamosas
Carcinoma Celular Difuso
Carcinoma Apócrino
Carcinoma com Metaplasia para Cartilagens e/ou Ossos
Carcinoma Tubular
Carcinoma Secretor
Carcinoma Produtor de Matriz
Doença de Paget

Fonte: Tsuda *et al.*, 2009.

No contexto das anormalidades proliferativas, as lesões mamárias evoluem da hiperplasia para hiperplasia atípica e, posteriormente, para os carcinomas *in situ* e invasivo, sucessivamente. Os carcinomas denominados *in situ* são aqueles que não invadiram os tecidos vizinhos; já os carcinomas invasivos, como o próprio nome diz, invadem os tecidos adjacentes. Os carcinomas invasivos são as formas mais frequentes dos carcinomas de mama e representam o último estágio do processo de desenvolvimento tumoral (Tsuda, 2009; Cichon *et al.*, 2010). Acredita-se que aproximadamente 15% dos CDs e 80% dos CLs sejam invasivos e geralmente apresentam um maior envolvimento linfático e pior prognóstico que aqueles verificados nas pacientes com tipos menos frequentes de carcinomas

invasivos de mama. Além disso, os tumores ductais são mais coesivos e geralmente apresentam maior crescimento e progressão que os tumores lobulares (Korkola *et al.*, 2003; Rakha *et al.*, 2010). Tumores malignos de mama do tipo carcinoma tubular (CT) e do tipo carcinoma medular (CM), sem comprometimento dos linfonodos axilares, são os que apresentam o melhor prognóstico (Abreu & Koifman, 2002).

As lesões iniciais no epitélio da mama parecem se desenvolver no contexto de uma membrana basal intacta, que normalmente exerce funções de supressão tumoral pelo controle da arquitetura tecidual (Muschler & Streuli, 2010). A classificação da lesão hiperplásica para o estágio final de invasividade requer uma análise cuidadosa da arquitetura e citologia tecidual e muitas vezes gera inconsistências principalmente no que se refere às lesões iniciais. Como já descrito anteriormente, as modificações celulares são ditadas por modificações gênicas e cromossômicas e, portanto, a análise molecular pode ser utilizada para auxiliar nessa diferenciação das lesões.

Em relação ao grau histológico, os carcinomas de mama são classificados em três grupos que refletem o potencial de malignidade do tumor através da análise da diferenciação das células. Os carcinomas de mama considerados de Grau 1, são aqueles nos quais as células encontram-se bem diferenciadas. Estes carcinomas são considerados como os de melhor prognóstico. Os carcinomas de mama de Grau 2, são aqueles nos quais as células encontram-se moderadamente diferenciadas. Os carcinomas de Grau 3, são aqueles nos quais as células encontram-se pouco diferenciadas (Tsuda, 2009; Rakha *et al.*, 2010).

O grau histológico é um importante fator prognóstico, seja independente ou em combinação com outros fatores, como o tamanho tumoral e o comprometimento linfonodal (Rakha *et al.*, 2010; Buitrago *et al.*, 2011).

1.3.2 Tamanho do Tumor e Comprometimento dos Linfonodos

O tamanho do tumor e a condição dos linfonodos axilares são os dois mais importantes indicadores prognósticos para o câncer de mama. Na ausência de comprometimento metastático dos linfonodos, o tamanho tumoral é considerado o melhor preditor de recidiva do câncer (Abreu & Koifman, 2002; Rakha *et al.*, 2010).

O comprometimento dos linfonodos, principalmente os axilares, é importante para a avaliação do carcinoma devido ao fato das mamas serem irrigadas por uma extensa rede linfática na qual as células tumorais podem trafegar ao tornarem-se metastáticas. Além disso, aproximadamente 60% de toda a linfa que percorre as mamas é drenada pelos linfonodos axilares (Guyton & Hall, 2002). O número absoluto de linfonodos comprometidos demonstrará o grau de agressividade biológica do tumor e, portanto, está inversamente relacionado com o tempo de sobrevida. Quando há comprometimento dos linfonodos, maiores são as chances da presença de metástases em outros órgãos. Se há ausência de comprometimento metastático dos linfonodos, melhor é o prognóstico, tanto para a sobrevida global quanto para a sobrevida livre de doença (Abreu & Koifman, 2002; Rakha *et al.*, 2010).

Tumores de menor tamanho também estão relacionados a um melhor prognóstico, tanto para a sobrevida global quanto para a sobrevida livre de doença. Geralmente os tumores de menor tamanho pertencem a estágios menos avançados do carcinoma e respondem melhor aos tratamentos aplicados. Quanto maior o tamanho do tumor, também são maiores as chances de comprometimento metastático dos linfonodos loco-regionais (Buitrago *et al.*, 2011).

1.3.3 Micrometástases na Medula Óssea

Quando o carcinoma torna-se invasivo, a medula óssea é um dos locais metastáticos mais comuns de tumores sólidos. Acredita-se que cerca de 20 a 40% dos tumores de origem epitelial, como o carcinoma de mama, apresentem sítios metastáticos ocultos na medula óssea mesmo na ausência do comprometimento dos linfonodos ou de qualquer outra evidência da presença de metástase (Woelfle *et al.*, 2003).

Ainda não se sabe ao certo porque isto ocorre, mas acredita-se que por ser um importante sítio de células-tronco do organismo, a medula óssea seja capaz de provocar modificações nas células e, ao mesmo tempo, criar um microambiente propício para a progressão das células tumorais, denominado assim de nicho pré-metastático (Molino *et al.*, 2008).

Portanto, devido a essas evidências, a presença das micrometástases na medula óssea parece ser preditora da presença de metástases em outros órgãos e indicativa do estabelecimento dos estágios iniciais do câncer. Para os casos em que o carcinoma já esteja estabelecido, as micrometástases na medula óssea podem ser sinais da probabilidade de recidiva precoce (Abreu & Koifman, 2002).

1.3.4 Classificação TNM

Independente das variações específicas de cada tipo tumoral do carcinoma de mama, todos eles parecem seguir uma sequência biológica para a sua formação e desenvolvimento, com início na proliferação e fim na invasão. Devido a isso, estabeleceu-se um sistema que agrupa variáveis de diagnóstico e prognóstico importantes, como o tamanho do tumor, o comprometimento dos linfonodos e a presença de metástases, que facilita a classificação dos tumores e conseqüentemente a escolha terapêutica. Este sistema foi denominado de TNM. O sistema TNM é composto de graduações que podem ser associadas entre si para definir a classificação tumoral segundo o estadiamento (Rakha *et al.*, 2010;

Buitrago *et al.*, 2011). Na Tabela 3, encontram-se as graduações utilizadas para definir o critério TNM e na Tabela 4 encontra-se a classificação tumoral, derivada da combinação dos critérios TNM que definem o estadiamento.

Tabela 3. Graduações utilizadas para a classificação TNM

T (Tumor)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>In Situ</i> : Carcinoma Ductal ou Lobular <i>In Situ</i> ou Doença de Paget
T1a	Tumor $\leq 0,5$ cm de diâmetro
T1b	Tumor $> 0,5$ cm e ≤ 1 cm de diâmetro
T1c	Tumor > 1 cm e ≤ 2 cm de diâmetro
T2	Tumor > 2 cm e ≤ 5 cm de diâmetro
T3	Tumor > 5 cm de diâmetro
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão à parede torácica ou à pele
T4a	Extensão para a parede torácica
T4b	Edema ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites, confinados a mesma mama
T4c	T4a e T4b associados
T4d	Carcinoma inflamatório
N (Linfonodos Regionais)	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases nos linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) auxiliar(es) homolateral(is) móvel(is)
N2	Metástase nos linfonodos auxiliares homolaterais fixos uns aos outros ou a outras estruturas
N3	Metástase nos linfonodos da cadeia mamária interna homolateral
M (Metástases à Distância)	
MX	A presença de metástases à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância (incluindo metástases nos linfonodos supraclaviculares)

Fonte: Barros *et al.*, 2001.

Tabela 4. Estadiamento tumoral de acordo com as combinações das graduações do sistema TNM

Estádio	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIa	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIb	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIa	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estádio IIIb	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Barros *et al.*, 2001.

A classificação tumoral segundo o estadiamento representa um dos meios mais utilizados pelos oncologistas para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico do carcinoma de mama.

1.3.5 Receptores Hormonais de Estrogênio, Progesterona e, Oncogene *HER2*

Os hormônios sexuais femininos, estrogênio e progesterona, têm papéis fundamentais no desenvolvimento do câncer de mama e a avaliação de seus receptores é comumente utilizada após o diagnóstico e para a avaliação do prognóstico (Guyton & Hall, 2002).

O estrogênio é considerado o principal hormônio sexual feminino. Ele é responsável pela proliferação celular e por estimular o desenvolvimento dos órgãos sexuais e das mamas, além de influenciar várias outras características sexuais secundárias. Com relação ao desenvolvimento das mamas, o estrogênio auxilia o desenvolvimento tecidual e é responsável pelo crescimento dos ductos e pela deposição de gordura mamária (Guyton & Hall, 2002).

Nas mulheres não grávidas, o estrogênio só é secretado em grandes quantidades pelos ovários, embora pequenas quantidades também sejam secretadas pelo córtex supra-renal. Além disso, o nível de expressão do estrogênio varia de acordo com o ciclo ovariano. Já nas mulheres grávidas, que não apresentam carcinoma de mama, este hormônio também é secretado em grande quantidade pela placenta (Guyton & Hall, 2002).

A progesterona, assim como o estrogênio, está envolvida no desenvolvimento das células mamárias. Ela é um dos hormônios responsáveis pelo início do crescimento das mamas e do aparelho responsável pela lactação, além disso, auxilia o desenvolvimento dos lóbulos mamários (Guyton & Hall, 2002).

Nas mulheres não grávidas, a progesterona só aparece em grandes quantidades durante a segunda metade de cada ciclo ovariano, quando é secretada pelo corpo lúteo. Durante a primeira metade do ciclo ovariano a progesterona ocorre em pequenas quantidades no plasma, e é também secretada em quantidades aproximadamente iguais pelo córtex supra-renal e pelos ovários. Já durante a gravidez, grandes quantidades de progesterona são secretadas também pela placenta, especialmente depois do quarto mês de gestação (Guyton & Hall, 2002).

Ao longo da vida, as mulheres são expostas a estes hormônios desde a primeira menstruação até o início da menopausa, além disso, muitas mulheres utilizam contraceptivos hormonais ou fazem reposição hormonal após a menopausa. Acredita-se que esta exposição excessiva aumenta o risco para o

desenvolvimento do câncer de mama (Goldman & O'Hair, 2009; Buitrago *et al.*, 2011).

Para que os hormônios atuem eficientemente nas mamas é necessário que eles se liguem a receptores específicos nas células mamárias. Portanto, para evitar que os hormônios, estrogênio e progesterona, sirvam como fatores de crescimento para as células tumorais, terapias endócrinas são utilizadas na prática clínica para impedir a ligação destes hormônios com os seus receptores nas células mamárias e, desta forma, atrasar ou impedir o desenvolvimento ou progressão do carcinoma.

Portanto, conhecer a condição da expressão dos receptores hormonais no tumor, em especial do receptor de estrogênio (RE), é importante para a avaliação após o diagnóstico do câncer de mama principalmente para estabelecer a modalidade terapêutica (Abreu & Koifman, 2002; Turnbull & Rahman, 2008; Rakha *et al.*, 2010). O RE quando negativo, ou seja, quando não expresso nas células tumorais, é correlacionado com prognóstico desfavorável e conseqüentemente com menor sobrevida, enquanto tumores RE positivos, ou seja, tumores que expressam os receptores RE, parecem apresentar melhores prognósticos e conseqüentemente conferir maior sobrevida (Abreu & Koifman, 2002).

Tumores positivos para RE correspondem a 80% dos carcinomas de mama e tornam-se alvos diretos para a terapia endócrina (Weigel & Dowsett, 2010). Porém, no carcinoma de mama familiar, já foi reportado que mais de 90% dos tumores mamários que apresentam mutações em *BRCA1*, não expressam os REs, enquanto tumores de mama com mutações em *BRCA2* possuem distribuição dos REs similar ao da população geral, na qual a maioria expressa estes receptores (Antoniou *et al.*, 2008; Turnbull & Rahman, 2008).

Em relação ao receptor de progesterona (RP), ele parece ter um papel secundário na avaliação do carcinoma de mama (Abreu & Koifman, 2002). Mas já foi demonstrado que sua expressão é fortemente dependente da presença do RE:

tumores expressando os RPs, mas que não expressam os REs são incomuns e representam menos de 1% de todos os carcinomas de mama (Weigel & Dowsett, 2010).

Os receptores hormonais, RE e o RP, também possuem relação com um importante oncogene para o câncer de mama denominado de *HER2*. Este oncogene é responsável por codificar uma proteína também denominada HER2, que é importante para o desenvolvimento das células epiteliais na ausência do carcinoma de mama. Porém, quando o carcinoma está presente, esta proteína permite o crescimento das células tumorais. Quando a expressão desta proteína está aumentada há uma correlação com mau prognóstico (Abreu & Koifman, 2002; Tsuda, 2009). A superexpressão de HER2 ocorre em aproximadamente 20% de todos os carcinomas de mama primários (Abreu & Koifman, 2002; Weigel & Dowsett, 2010) e seu status de amplificação tem sido considerado um biomarcador de diagnóstico da doença. Além disso, os tumores HER2 positivos, ou seja, os tumores que expressam esta proteína beneficiam-se significativamente da terapia anti-*HER2* (Goldman & O'Hair, 2009; Weigel & Dowsett, 2010).

1.3.6 Classificação Molecular

A partir da descoberta das funções dos receptores hormonais, RE e RP, e do oncogene *HER2*, no desenvolvimento do carcinoma de mama, estudos de perfis de expressões gênicas foram realizados para distinguir em nível molecular os subtipos tumorais e, a partir de então, surgiu uma nova classificação tumoral de acordo com o perfil molecular dos tumores mamários. Esta avaliação pelo perfil molecular permitiu classificar os tumores em cinco tipos diferentes, denominados: luminal A; luminal B; superexpressão de HER2; basal e; normal *breast-like* (Vieira *et al.*, 2008; Tsuda, 2009; Weigel & Dowsett, 2010).

Os subtipos, luminal A e luminal B, apresentam as melhores taxas de sobrevivência e menos metástases à distância. Ambos os subtipos expressam RE e RP, porém a maioria dos tumores de subtipo luminal A são histologicamente de baixo grau, enquanto os tumores de subtipo luminal B tendem a ser histologicamente de alto grau e, conseqüentemente, apresentam o pior prognóstico (Vieira *et al.*, 2008; Sanpaolo *et al.*, 2011).

Tumores com superexpressão de HER2 e tumores do subtipo basal, não expressam os receptores hormonais, RE e RP e, portanto, são considerados os de pior prognóstico, com as piores taxas de sobrevivência e maior quantidade de metástases à distância (Vieira *et al.*, 2008; Weigel & Dowsett, 2010; Sanpaolo *et al.*, 2011).

Tumores de subtipo luminal A e luminal B respondem bem às terapias adjuvantes, como a quimioterapia e a terapia hormonal, enquanto o subtipo basal e o subtipo tumoral que superexpressa HER2 parecem ser resistentes às terapias adjuvantes (Sanpaolo *et al.*, 2011).

1.3.7 Novos Fatores: Catepsina D, Ciclina D1, Ciclina E e Proteína Ki67

Com o avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos no carcinoma de mama, novos fatores de diagnóstico e prognóstico capazes de auxiliar a avaliação da doença foram identificados. Dentre estes, destacam-se a catepsina D, a ciclina D1, a ciclina E e a proteína Ki67.

A catepsina D é uma protease lisossomal que promove a lise da membrana basal. Ela é encontrada em diversos tecidos e tem sua expressão regulada pelo estrogênio. Devido às características biológicas da catepsina D, esta protease parece ter uma importante função no processo de proliferação e de invasão das células tumorais e, portanto, pode ser utilizada como indicadora do prognóstico (Abreu & Koifman, 2002).

A ciclina D1 é superexpressa a nível de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e à nível de proteína em mais de 50% dos casos de câncer de mama. Os mecanismos celulares através dos quais a ciclina D1 se expressa nas neoplasias humanas não estão bem estabelecidos. Ela ganhou evidência na avaliação dos carcinomas por sua habilidade de regular a proliferação das células responsivas ao estrogênio e, portanto, apresentar forte correlação com os receptores de estrogênio e de progesterona (Buitrago *et al.*, 2011). A amplificação da ciclina D1 parece estar associada com recorrência precoce e mau prognóstico (Weigel & Dowsett, 2010).

A ciclina E age de forma similar à ciclina D1, como um regulador do ciclo celular. A amplificação da ciclina E é detectada em diversas linhagens do câncer de mama, mas parece não ter função na tumorigênese (Buitrago *et al.*, 2011). A proteína alterada a nível pós-traducional resulta em formas de baixo peso molecular que são detectáveis somente em células tumorais e correlaciona-se com estágios e graus mais avançados do câncer de mama (Weigel & Dowsett, 2010).

A Ki67 é uma proteína nuclear considerada um marcador de proliferação celular (Weigel & Dowsett, 2010). Esta proteína é expressa em células em proliferação e está ausente em células em repouso (Buitrago *et al.*, 2011). Porém, pouco se sabe sobre suas funções na divisão celular. Com relação aos outros biomarcadores, a Ki67 parece ter boa correlação com o grau tumoral e correlação inversa com o RE. Em tumores positivos para o RE, esta proteína apresenta baixa atividade proliferativa. Há indícios que a expressão da proteína Ki67 após a quimioterapia seja um forte preditor de sobrevivência global e livre de recorrência e, portanto, sua aplicação nos tratamentos parece predizer uma boa resposta à quimioterapia sistêmica (Weigel & Dowsett, 2010).

1.3.8 História Familiar

A história familiar é a mais importante ferramenta para diagnóstico e avaliação do risco para o desenvolvimento do câncer de mama (Rich *et al.*, 2004; Majdak-Paredes & Fatah, 2008; Palacios *et al.*, 2008).

Geralmente as mulheres com maior risco de desenvolver o carcinoma são aquelas com história familiar de pelo menos um parente de primeiro grau, mãe, irmã ou filha, com diagnóstico de câncer de mama abaixo dos 50 anos de idade; mulheres com história familiar de pelo menos um parente de primeiro grau, com diagnóstico de câncer de mama bilateral ou câncer de ovário em qualquer faixa etária; mulheres com história familiar de câncer de mama masculino (Ministério Da Saúde, 2004) e; suscetibilidade genética comprovada (Barros *et al.*, 2001).

1.3.9 Idade

A influência da idade no momento do diagnóstico e sua relação com o prognóstico do câncer de mama permanecem ainda controversas.

Aparentemente a incidência do carcinoma de mama é relativamente baixa antes dos 35 anos. A partir desta idade, a taxa de incidência é progressiva. Aproximadamente oito em cada dez casos são diagnosticados em idade superior a 50 anos (<http://www.inca.gov.br>), provavelmente, entre outros fatores, devido ao acúmulo de mutações ao longo da vida.

A idade da menarca, primeira gestação e menopausa também devem ser consideradas como fatores diagnósticos. Geralmente, mulheres com menarca precoce em idade igual ou menor a 12 anos; menopausa tardia em idade igual ou superior a 55 anos e; primeira gestação depois de 34 anos, possuem maior risco de desenvolver o carcinoma, principalmente devido à maior exposição hormonal, como descrito anteriormente (Barros *et al.*, 2001; Goldman & O'Hair, 2009; Buitrago *et al.*, 2011).

Em relação ao prognóstico, as pessoas portadoras de câncer de mama pertencentes a quarta e a quinta décadas de vida parecem apresentar o melhor prognóstico. Desta forma, o pior prognóstico estaria reservado ao grupo das pacientes jovens, com idade igual ou inferior a 35 anos e àquelas cujo diagnóstico venha a ser estabelecido a partir dos 75 anos de idade (Abreu & Koifman, 2002).

1.3.10 Fatores Ambientais

Fatores ambientais podem estar relacionados ao risco de desenvolvimento do câncer de mama e, portanto, podem ser utilizados para auxiliar o diagnóstico. Estima-se que o desenvolvimento de aproximadamente 70% dos carcinomas malignos possua alguma relação com os efeitos derivados do estilo de vida, como uso de álcool, tabaco, sedentarismo, dieta e exposição à radiação ionizante (Barros *et al.*, 2001; Strumylaite *et al.*, 2010).

Mulheres que fazem o uso de álcool, mesmo esporadicamente, possuem o risco de desenvolver o carcinoma de mama quase duas vezes maior do que àquelas mulheres que não o utilizam. Este aumento do risco parece ter relação com os níveis de estrogênio que se encontram alterados em consumidoras de álcool. Além disso, durante o processo de metabolização do álcool carcinógenos são liberados no organismo. Os carcinógenos químicos provocam mutações nas células normais, convertendo-as em células pré-cancerígenas e, mais tarde, em células cancerígenas. O tabaco, outro importante fator de risco, contém aproximadamente 40 tipos de carcinógenos diferentes e tem suas propriedades carcinogênicas potencializadas pelo consumo de álcool (Pieta *et al.*, 2012).

Dentre os carcinógenos responsáveis pelo desenvolvimento do carcinoma de mama, a radiação ionizante é considerada o mais bem estabelecido. Esta constatação surgiu após a observação do aumento da incidência de câncer de mama em mulheres expostas de forma aguda à radiação da bomba atômica no Japão e da observação do aumento da incidência do carcinoma em pessoas que

estiveram expostas a doses cumulativas da radiação ionizante associadas com alguns tratamentos, como a radioterapia. Além disso, a exposição a muitas radiografias diagnósticas também pode favorecer o desenvolvimento do carcinoma. A radioterapia aplicada no câncer de mama parece contribuir para o desenvolvimento de carcinoma principalmente em mulheres expostas à radiação em idade jovem, com menos de 35 anos e especialmente entre aquelas com história familiar de câncer de mama (Strumylaite *et al.*, 2010).

Outro fator de risco que é sinônimo de alerta para as mulheres é a obesidade. Acredita-se que ela esteja relacionada com aproximadamente 20% de todos os casos de carcinomas. Em mulheres na menopausa, a obesidade é diretamente relacionada aos níveis de estrogênios circulantes, que por si só, estão relacionados ao risco de desenvolvimento do câncer de mama (Pieta *et al.*, 2012). Para as mulheres obesas que tem o câncer de mama estabelecido, a obesidade é relacionada com mau prognóstico. Os adipócitos liberam marcadores inflamatórios que podem favorecer a progressão do carcinoma. Além disso, nestas mulheres, há uma preocupação em relação às modalidades terapêuticas, principalmente com a administração das drogas quimioterápicas. O índice de massa corporal (IMC) é utilizado para calcular a dose e, portanto, pacientes obesas requerem altas doses, o que pode resultar em excesso de toxicidade. Portanto, a perda de peso, particularmente nestas mulheres, reduz o risco da progressão do carcinoma e melhora a qualidade de vida (Wolin *et al.*, 2010).

Poucas são as evidências sobre o efeito de fatores ambientais isolados e o risco de desenvolvimento do câncer de mama, portanto, para avaliação de risco e diagnóstico do carcinoma de mama, estes fatores são analisados em conjunto com a história familiar, análise da vida reprodutiva e outros fatores importantes descritos anteriormente.

1.4 Diagnóstico do Câncer de Mama

O exame clínico da mama deve ser o primeiro exame a ser realizado para a prevenção e verificação de um possível tumor. Ele é que irá servir de base para a solicitação de exames complementares e para a avaliação dos importantes fatores de diagnóstico e prognóstico descritos anteriormente (Ministério Da Saúde, 2004).

Fisicamente, podem surgir alterações na pele que recobre a mama, como abaulamentos ou retrações, inclusive no mamilo, ou aspecto semelhante à casca de laranja. Secreção no mamilo também é um sinal de alerta. O sintoma do câncer de mama palpável é o nódulo no seio, acompanhado ou não de dor mamária. Nódulos palpáveis também podem surgir na axila (<http://www.inca.gov.br>).

Para a mama com lesões palpáveis, a ultrassonografia (USG) é o método escolhido para o diagnóstico em mulheres abaixo dos 35 anos. Em mulheres acima desta idade, o método de escolha é a mamografia. Na suspeita da presença de lesões o diagnóstico deve ser confirmado citologicamente por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF); histologicamente, quando for utilizada a punção aspirativa por agulha grossa (PAG), ou ainda, por biópsia cirúrgica convencional (Ministério Da Saúde, 2004).

Na presença de lesões não palpáveis na mama, utiliza-se o sistema denominado de *Breast Imaging Reporting and Data System* (BIRADS), método utilizado para padronizar os laudos das mamografias e para estabelecer de que forma será realizado o diagnóstico e o controle do tumor. Este método visa orientar o médico sobre a conduta a ser tomada de acordo com os achados mamográficos. Geralmente esses métodos informam se os tumores são negativos para malignidade; benignos; provavelmente benignos; suspeitos para a malignidade; altamente suspeitos para malignidade e; com malignidade comprovada. A classificação para essas características segue uma graduação de 1 a 6. As categorias BIRADS de 1 a 3 são consideradas negativas, porém, as

lesões da categoria 3 devem ser cuidadosamente monitoradas por representar um pequeno risco de malignidade. As lesões que se encaixam na categoria BIRADS 3 são submetidas a exames radiológicos com intervalo semestral, seguidos de exames radiológicos com intervalo anual. Para as lesões que se encaixam nas categorias BIRADS 4 e 5 indica-se estudo histopatológico, que pode ser realizado por meio de PAG, mamotomia ou biópsia cirúrgica. Por se tratar de uma lesão não palpável o procedimento escolhido deve ser precedido de uma marcação, que pode ser através de raios X (Ministério Da Saúde, 2004).

1.5 Novos Genes Candidatos ao Diagnóstico e Prognóstico do Câncer de Mama

Estudos recentes (Singer *et al.*, 2003; Zafiropoulos *et al.* 2004; Iorio *et al.*, 2008), têm sugerido quatro variantes com importantes funções na regulação da resposta imunológica, que estariam relacionadas à progressão do câncer de mama: a) duas variantes relacionadas aos genes que codificam o receptor 2 de quimiocinas CC (*CCR2*), rs1799864, e o receptor 5 de quimiocinas CC (*CCR5*), rs333 e; b) duas variantes do gene do antígeno leucocitário humano G (*HLA-G*), rs1704 e rs1063320.

1.5.1 Receptores de Quimiocinas

As quimiocinas são pequenas proteínas solúveis formadas por aproximadamente setenta resíduos de aminoácidos com peso molecular de oito a dez kilodaltons (kDa). Estas pequenas proteínas solúveis possuem quatro resíduos de cisteínas que formam uma estrutura tridimensional que é altamente conservada e dividida em: uma região flexível aminoterminal (N-terminal); três fitas antiparalelas β -folha e; uma α -hélice na região carboxiterminal (C-terminal). Na estrutura típica, os primeiros dois resíduos de cisteínas estão situados próximos um do outro na região N-terminal; o terceiro resíduo de cisteína reside

no centro da molécula e; o quarto resíduo de cisteína é localizado próximo à região C-terminal. Com base nas posições dos dois primeiros resíduos de cisteínas, as quimiocinas podem ser subdivididas em quatro famílias: CC; CXC; CX3C e C. Nestas nomenclaturas, a letra C refere-se à cisteína e a letra X refere-se aos aminoácidos presentes entre os resíduos de cisteínas. Destas quatro famílias, as mais estudadas são CXC e CC: as quimiocinas da família CXC são principalmente envolvidas na ativação dos neutrófilos; enquanto as quimiocinas da família CC estimulam outros leucócitos, como os monócitos, os linfócitos e os basófilos (Choi & An, 2011).

As quimiocinas podem ainda ser agrupadas em dois grupos funcionais: em quimiocinas inflamatórias e em quimiocinas homeostáticas. As quimiocinas inflamatórias são aquelas que controlam o recrutamento de linfócitos para o local de inflamação e para os tecidos lesionados; enquanto as quimiocinas homeostáticas são aquelas que possuem a função *housekeeping* e de recrutar os leucócitos para dentro de órgãos linfóides secundários, como os linfonodos (Deshmane *et al.*, 2009; Choi & An, 2011).

Devido à habilidade das quimiocinas de regular a migração de algumas células do sistema imunológico, levantou-se a possibilidade de que essas moléculas possam também controlar a migração de células tumorais no organismo, o que facilitaria a metástase (Mañes *et al.*, 2003; Degerli *et al.*, 2005; Zlotnik, 2006). Além disso, a infiltração de linfócitos e macrófagos no tecido tumoral, mediada pelas quimiocinas, parece ter uma importante função na angiogênese e conseqüentemente no desenvolvimento do tumor (Salsedo *et al.*, 2000; Zafiroopoulos *et al.*, 2004; Deshmane *et al.*, 2009). Isto parece ser corroborado por um estudo realizado por Oldham *et al.* (2012), que detectaram um aumento da expressão de certos receptores de quimiocinas nos linfócitos T infiltrantes (TILs) do carcinoma de células renais, comparadas às células saudáveis. Ao analisarem a distribuição dessas células que expressavam os receptores de quimiocinas, verificaram que a maioria estava localizada ao redor

dos vasos presentes no tumor. Além disso, detectaram que nestes locais, as quimiocinas com afinidade para esses receptores também eram expressas.

Especificamente no carcinoma de mama, já foi demonstrado que as células epiteliais tumorais produzem a quimiocina “regulada por ativação, expressa e secretada por células T” (RANTES), também conhecida como ligante 5 de quimiocina CC (CCL5) e esta expressão pode estar relacionada com a progressão da doença por ser considerada a maior determinante da infiltração de macrófagos e linfócitos nestes carcinomas (Mañes *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2003; Nath *et al.*, 2006; Karnoub *et al.*, 2007;). Além disso, a infiltração das células imunológicas e a angiogênese mediada por elas aumenta a expressão de outra quimiocina nas células tumorais, a proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP1), também conhecida como ligante 2 de quimiocina CC (CCL2), portanto, esta molécula parece da mesma forma que RANTES/CCL5 estar significativamente associada há extensão do tumor e a sobrevida do câncer de mama (Salcedo *et al.*, 2000; Deshmane *et al.*, 2009).

O recrutamento e ativação das células reguladas por quimiocinas, como a MCP1/CCL2 e RANTES/CCL5, que são membros da família de quimiocinas CC e codificadas por genes localizados no cromossomo 17 (Zafiroopoulos *et al.*, 2004), só ocorrem pela interação das quimiocinas com os receptores.

Os receptores de quimiocinas são um grupo de proteínas com sete hélices transmembrana (TM) que pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Chies & Hutz, 2003; Choi & An, 2011). Através da proteína G heterodimérica é que os receptores transmitem os sinais dos ligantes extracelulares para as vias biológicas intracelulares (Choi & An, 2011). O receptor de quimiocinas para a quimiocina MCP1/CCL2 é o CCR2, enquanto o principal receptor para a quimiocina RANTES/CCL5 é o CCR5 (Zafiroopoulos *et al.*, 2004; Foresti *et al.*, 2009).

1.5.1.1 CCR2

O receptor de quimiocinas CCR2 é geralmente expresso nos monócitos, linfócitos T e células de memória (Zafiroopoulos *et al.*, 2004). Ao ligar-se a quimiocina MCP1/CCL2, este receptor pode regular a migração e infiltração de outros monócitos, linfócitos T e de células NK para as regiões de inflamação. Também já foi demonstrado que quando o receptor CCR2 é ativado através da quimiocina MCP1/CCL2, ele é capaz de direcionar o movimento das células da neuroglia, denominadas de astrócitos (Foresti *et al.*, 2009).

Além de ligar-se na quimiocina MCP1/CCL2, o CCR2 pode ligar-se a outras proteínas quimiotáticas de monócitos, como na proteína 2 quimiotática de monócitos (MCP2), também denominada ligante 8 de quimiocina CC (CCL8); na proteína 3 quimiotática de monócitos (MCP3), também denominada ligante 7 de quimiocina CC (CCL7) e; na proteína 4 quimiotática de monócitos (MCP4), também denominada ligante 13 de quimiocina CC (CCL13). Porém a quimiocina MCP1/CCL2 é o ligante do CCR2 mais extensivamente estudado e o CCR2, por sua vez, é considerado seu receptor exclusivo (Zhao, 2010).

O receptor de quimiocinas CCR2 é codificado pelo gene *CCR2* localizado no braço curto do cromossomo 3, na região 21 (3p21) (Navratilova, 2006), e parece desencadear tanto efeitos pró-inflamatórios, mediados pelas APCs e pelos linfócitos T; quanto efeitos anti-inflamatórios, mediados pelos linfócitos Tregs (Zhang *et al.*, 2010).

Este receptor possui duas isoformas: CCR2A, composta de 360 aminoácidos e CCR2B, composta de 374 aminoácidos. Ambas isoformas diferem somente em suas regiões carboxiterminais, portanto, acredita-se que elas sejam formadas por *splicing* alternativo. O CCR2B é geralmente encontrado na superfície celular, enquanto a maior parte do CCR2A é localizada no citoplasma. A sequência de aminoácidos localizada na cauda carboxiterminal é que irá promover o transporte do CCR2B para a superfície celular (Navratilova, 2006).

Diversos polimorfismos já foram descritos para o gene *CCR2*, no entanto, a mais conhecida alteração no gene que codifica o receptor *CCR2* está localizada no éxon 1. Tal alteração leva a troca de uma base nitrogenada guanina por uma base nitrogenada adenina (G→A) na posição 190, o que leva a uma mudança de aminoácidos no códon 64, do aminoácido valina para o aminoácido isoleucina. A variante responsável por essa situação denomina-se *CCR264I* (rs1799864) (Zafiroopoulos *et al.*, 2004).

A distribuição desta variante possui uma frequência que varia de 0,1 a 0,25 em várias populações (Mariani *et al.*, 1999). Dados sobre a influência deste polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) na expressão do *CCR2* são controversos. Há na literatura evidências para diferentes efeitos funcionais da variante rs1799864, assim como para a ausência de efeito na expressão do receptor (Navratilova, 2006). Em relação à população brasileira não há dados de frequências desta variante.

1.5.1.1.1 CCR2 e Doenças

Consistente com o importante papel do *CCR2* no tráfego de células imunológicas, este receptor parece direcionar a inflamação em várias doenças, como na artrite reumatoide, na rejeição de transplantes, na aterosclerose (Zhao, 2010), na hipertensão pulmonar e na fibrose pulmonar (Zhang *et al.*, 2010).

Células que expressam a quimiocina MCP1/CCL2 e o receptor *CCR2*, também já foram observadas em diversas regiões do cérebro, como o hipocampo, no qual os padrões de expressão do *CCR2* são alterados em condições humanas neuropatológicas e em condições de neuroinflamação. Como exemplo dessas condições tem-se a esclerose múltipla, doença de Alzheimer, epilepsia e encefalopatia associada ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Foresti *et al.*, 2009).

Em relação ao HIV, apesar da baixa eficiência da infecção via o receptor CCR2, parece haver uma relação entre a variante rs1799864 com a progressão mais lenta desta doença em adultos. Além disso, em um estudo de transmissão vertical do HIV tipo 1 (HIV-1), realizado por Mabuka *et al.* (2009), demonstrou-se que mães que portavam ao menos um alelo mutante, tinham carga viral significativamente menor em 32 semanas de gestação em relação às mães não portadoras do alelo. Isto sugere que o alelo mutante materno pode parcialmente proteger contra a transmissão materno-fetal do HIV-1 (Mabuka *et al.*, 2009).

Nos carcinomas, especificamente no carcinoma de mama, pouco se sabe sobre a regulação do CCR2 (Zhang *et al.*, 2010).

1.5.1.2 CCR5

O receptor de quimiocinas CCR5 é geralmente expresso nos linfócitos T, tanto em linfócitos TCD4+, quanto em linfócitos TCD8+, nos monócitos e em DCs (Chies & Hutz, 2003; Muntinghe *et al.*, 2003). Este receptor é codificado pelo gene CCR5 localizado no cromossomo 3 (Chies & Hutz, 2003). Estruturalmente o CCR5 consiste de 352 resíduos de aminoácidos que formam a região N-terminal e a região do segundo domínio extracelular, denominada de ECL2. O ECL2 é responsável pela seletividade da ligação do receptor que irá determinar a variedade de quimiocinas as quais ele responderá funcionalmente (Choi & An, 2011).

Para que ocorra a interação do receptor CCR5 com as quimiocinas, primeiramente a porção central das quimiocinas CC liga-se aos domínios extracelulares do CCR5 através de atrações eletrostáticas e, subsequentemente, a região N-terminal liga-se em um segundo sítio de ligação que abrange as hélices TM para ativar o receptor. Esta transdução de sinal entre a quimiocina e o receptor é conhecida por ter um importante papel em processos fisiológicos e patológicos, como a inflamação e a hematopoiese (Choi & An, 2011).

O CCR5 pode ligar-se a diversas quimiocinas, como à proteína 1 alfa inflamatória de macrófagos (MIP1alfa); à proteína 1 beta inflamatória de macrófagos (MIP1beta); à quimiocina RANTES/CCL5 e; à quimiocina MCP2. Em relação a estes ligantes, a quimiocina RANTES/CCL5 e a quimiocina MIP1alfa podem ligar-se em outros receptores de quimiocinas CC, enquanto a quimiocina MIP1beta é conhecida por ser mais específica para o receptor CCR5 (Choi & An, 2011).

Diversos polimorfismos já foram descritos para o gene que codifica o receptor CCR5, no entanto, o exemplo mais conhecido de variante genética consiste de uma deleção de 32 pares de bases (pb) que provoca a formação de um códon de terminação precoce que irá interferir na tradução da proteína e consequentemente gerará um receptor de membrana não funcional. A variante responsável por esta situação recebe o nome de *CCR5delta32* (rs333) (Zafiroopoulos *et al.*, 2004; Rinke *et al.*, 2006). Esta variante genética é localizada no cromossomo 3p21 e há indícios que a presença da deleção em um único alelo já seja suficiente para comprometer a função do receptor CCR5 (Muntinghe *et al.*, 2003).

O alelo mutante é frequente em caucasóides e raro ou ausente em outros grupos étnicos, como os nativos africanos e ameríndios. Especificamente na população brasileira, demonstrou-se que a prevalência do alelo mutante é de 4,4% em descendentes de europeus e é de 1,3% na população de descendentes de africanos. A presença do alelo variante entre os indivíduos brasileiros de ascendência africana pode ser facilmente explicada pelo fluxo gênico europeu dentro da população (Chies & Hutz, 2003).

O receptor CCR5 funcional, sem a deleção dos 32pb, engatilha preferencialmente uma resposta imunológica envolvendo um padrão de citocinas Th1 (Nath *et al.*, 2006; Deshmane *et al.*, 2009), que é associada à inflamação (Chies & Hutz, 2003). Isto já foi demonstrado no carcinoma de células renais, no qual os TILs são representados por células do tipo Th1, produzem IFN-gama e expressam tanto o receptor 3 de quimiocina CXC (CXCR3), quanto o receptor

CCR5 e além disso, as quimiocinas para esses receptores são frequentemente encontradas nos locais de inflamação tumoral (Oldham *et al.*, 2012).

No entanto, em animais, já foi demonstrado que a deficiência do CCR5, ou seja, o receptor não funcional é associado a uma resposta imunológica mais pronunciada do tipo Th2. Um destes estudos, por exemplo, realizado com camundongos ateroscleróticos deficientes para o CCR5, demonstrou uma menor produção TNF-alfa e IFN-gama, que contraria a resposta imunológica do tipo Th1 (Muntinghe *et al.*, 2003) e sugere que isto também possa ocorrer em humanos. Muntinghe *et al.* (2003) resolveram testar esta hipótese, e concluíram em seu estudo que a porcentagem de linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+ que secretam IL4 em indivíduos com o genótipo mutante, ou seja, que possuíam o receptor CCR5 não funcional, foi significativamente maior ($p=0,02$) quando comparada com os indivíduos não portadores deste genótipo, ou seja, que possuíam o receptor CCR5 funcional. Isto indica uma resposta mais direcionada para o tipo Th2, o que confirma a hipótese da alteração na resposta imunológica.

1.5.1.2.1 CCR5 e Doenças

O receptor de quimiocinas CCR5 já foi associado a diversas doenças, como o HIV-1 (Navratilova, 2006), a anemia falciforme (Chies & Hutz, 2003), a aterosclerose (Zhao, 2010) e com alguns tipos de câncer (Navratilova, 2006).

Apesar do conhecimento ainda limitado sobre esses receptores, há vários indícios que quando eles não são funcionais parecem trazer mais benefícios para os indivíduos do que quando completamente funcionais. Portadores do alelo mutante em homozigose apresentam resistência à infecção pelo HIV-1 (Chies & Hutz, 2003; Choi & An, 2011). Além disso, há evidências que os indivíduos heterozigotos para a variante rs333 apresentam uma redução do estado de inflamação crônica, que pode levar a sobrevivência diferencial em certas patologias, como a anemia falciforme (Chies & Hutz, 2003). A proteção da

mortalidade associada à inflamação para os portadores do alelo mutante também já foi demonstrada na doença renal de estágio final e; em populações humanas caracterizadas pelo alto risco cardiovascular, a presença do alelo variante é associada com melhor prognóstico (Muntinghe *et al.*, 2012).

Nos carcinomas de células renais e hepatocelular, o receptor funcional correlaciona-se com mau prognóstico (Oldham *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2012). O receptor CCR5 parece aumentar o estímulo para as células saírem dos vasos sanguíneos e invadir os tecidos alvos (Liang *et al.*, 2003). O recrutamento excessivo dos linfócitos ativado pelos ligantes RANTES/CCL5 e por seu receptor, CCR5, no fígado, parece beneficiar o desenvolvimento e metástase do carcinoma hepatocelular, além disso, promove a destruição tecidual durante a resposta inflamatória induzida pelas quimiocinas (Tsai *et al.*, 2012). Por outro lado, no carcinoma de células renais, o receptor 6 de quimiocina CXC (CXCR6), o receptor CXCR3, o receptor 6 de quimiocina CC (CCR6), juntamente com o receptor CCR5, estão envolvidos no recrutamento dos linfócitos Tregs, responsáveis por diminuir a resposta imunológica, que neste caso, contribui para evasão das células cancerígenas e, portanto, também se tornam preditores de mau prognóstico (Oldham *et al.*, 2012).

1.5.2 HLA-G

O HLA-G é uma molécula tolerogênica e imunomodulatória (Fabris *et al.*, 2010) capaz de interagir com diversos receptores presentes em várias células do sistema imunológico, como nas células NK, nos linfócitos T e B, e nas APCs (Singer *et al.*, 2003; Algarra *et al.*, 2004; Davidson *et al.*, 2005; Carosella *et al.*, 2008). Devido à função imunomodulatória atribuída às moléculas de HLA-G, levantou-se a hipótese que sua expressão possa estar relacionada ao processo de escape das células tumorais da imunovigilância.

A lise das células alvo, mediada pelas células NK ou pelos linfócitos T, é inibida pela presença do HLA-G através da interação com os receptores humanos inibitórios 2 e 4 (ILT2 e ILT4), e a expressão diferencial dos receptores de inibição pode definir a eficácia da resposta imune no tumor (Palmisano *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2005; Kleinberg *et al.*, 2006).

O papel do HLA-G no escape tumoral é corroborado pelo estudo realizado por Ye *et al.* (2007), que encontraram uma correlação inversa significativa entre a expressão do HLA-G e a resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, há a hipótese que a superexpressão da molécula de HLA-G em lesões malignas ocorra devido à alteração no controle genômico durante o processo de transformação das células tumorais. Desta forma, acredita-se que os carcinomas mais agressivos, que tem menor organização do controle genético, possam ter a expressão de HLA-G mais pronunciada (Ye *et al.*, 2007).

Controversamente, o estudo realizado por Fabris *et al.* (2010), mostrou que o HLA-G é induzido pelo IFN-gama nas células mononucleares, o que pode constituir uma via para proteger os tecidos da infiltração excessiva de linfócitos T.

O HLA-G é uma molécula de HLA classe I não clássica que compartilha propriedades estruturais com as moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) clássicas, que são: o antígeno leucocitário humano A (HLA-A); antígeno leucocitário humano B (HLA-B) e; antígeno leucocitário humano C (HLA-C). No entanto, possui distribuição tecidual limitada, e apresenta-se em sete diferentes isoformas geradas por *splicing* alternativo, das quais, quatro isoformas ligam-se à membrana celular (G1-G4) e três apresentam-se sobre a forma solúvel (G5-G7) (Rousseau *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2005; Lemaoult *et al.*, 2005; Carossela *et al.*, 2008). Esta molécula é codificada pelo gene *HLA-G*, que está situado no braço curto do cromossomo 6, na região 21.3 (6p21.3), e é composto por oito éxons, sete íntrons e uma região 3' transcrita e não traduzida (3'UTR) que faz parte do éxon 8 (Rousseau *et al.*, 2003).

As duas variantes polimórficas mais estudadas do *HLA-G* consistem em uma inserção de 14 pb (rs1704) e um SNP na posição +3142 (rs1063320) na região 3'UTR.

1.5.2.1 *HLA-G 14 pb*

O polimorfismo rs1704 do *HLA-G* é conhecido por ter efeito na estabilidade do mRNA (Fabris *et al.*, 2010). A presença da inserção dos 14 nucleotídeos no transcrito gerado pelos alelos do *HLA-G*, na região 3'UTR, pode levar à remoção de 92 bases no início do éxon 8 através de um *splicing* alternativo. Esta remoção influencia a estabilidade do mRNA conferindo-lhe melhor resistência (Rousseau *et al.*, 2003; Fabris *et al.*, 2010). Isto sugere que esta região 3'UTR possa estar envolvida na regulação da expressão gênica a nível pós-transcricional da molécula *HLA-G*. Quando há ausência da inserção dos 14 nucleotídeos, o mRNA se torna mais instável e conseqüentemente há uma menor produção da molécula de *HLA-G* (Rousseau *et al.*, 2003; Iorio *et al.*, 2008).

1.5.2.2 *HLA-G +3142*

Também na região 3'UTR do *HLA-G*, há um SNP C/G na posição +3142 que é conhecido por ser um sítio de ligação para microRNAs (miRNAs) (Consiglio *et al.*, 2011).

Os miRNAs são uma pequena classe de RNAs não codificantes capazes de regular a expressão do gene em nível pós-transcricional (Iorio *et al.*, 2008). Esses miRNAs são altamente específicos para cada tecido e em relação aos estágios do desenvolvimento celular. Eles desempenham importantes funções em processos celulares essenciais como a diferenciação, a proliferação, a resposta ao estresse e a morte celular e, portanto, são estudados em diversas doenças humanas, incluindo o câncer. Evidências mostram que os miRNAs são expressos

em diferentes tipos tumorais e foi sugerido que possam apresentar função causal na tumorigênese (Iorio *et al.*, 2008; Shi & Guo, 2009). Os primeiros miRNAs específicos no câncer de mama foram descritos por Iorio *et al.* (2005), através de uma análise de escala genômica da expressão dos miRNAs sobre um grande conjunto de tecidos de mamas normais e tumores mamários, que resultou na identificação de 29 miRNAs diferencialmente expressos e capazes de classificar os tumores e tecidos normais com uma acurácia de 100% (Iorio *et al.*, 2005; Iorio *et al.*, 2008). Em outro estudo realizado por Valastyan *et al.* (2009), observou-se que o miRNA denominado miR31, possui relação inversa com a metástase em pacientes com câncer de mama, independente do grau e do subtipo tumoral. Sua expressão parece suprimir diversos passos do desenvolvimento do carcinoma de mama, incluindo a invasão, extravasão e a colonização metastática. Porém os mecanismos pelos quais o miR31 suprime a colonização metastática permanecem desconhecidos (Valastyan *et al.*, 2009).

O alelo G, do SNP C/G, na posição +3142 do *HLA-G* parece favorecer a ligação de três miRNAs: miR128a, miR148b e miR152. Esta ligação resulta na repressão da tradução ou até mesmo na degradação do mRNA e, conseqüentemente, gera menor expressão da molécula de *HLA-G*. Enquanto o alelo C parece ser um sítio de ligação com menor afinidade a estes miRNAs (Consiglio *et al.*, 2011).

1.5.2.3 HLA-G e Doenças

A molécula de *HLA-G* é bastante estudada em diversas doenças humanas, como na doença celíaca (Fabris *et al.*, 2010), no lúpus eritematoso sistêmico (Consiglio *et al.*, 2011), no aborto espontâneo recorrente, na pré-eclâmpsia, em doenças cutâneas e alérgicas (Ciprandi *et al.*, 2009), na asma (Tan *et al.*, 2007) e principalmente nos carcinomas (Davidson *et al.*, 2005; Iorio *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2007).

Recentemente, um estudo realizado por Davidson *et al.* (2005), mostrou que o HLA-G é expresso em 61% dos carcinomas ovarianos e 25% dos carcinomas de mama, mas está ausente em tecidos normais e tumores benignos originados desses órgãos. Em outro estudo realizado por YE *et al.* (2007), em tecidos de câncer colorretal, encontrou-se a expressão da molécula HLA-G em 65% das amostras. Este estudo também indicou que o HLA-G pode servir como um marcador clínico para diagnóstico ou até mesmo para prever o prognóstico neste carcinoma (Ye *et al.*, 2007). Além disso, o HLA-G já foi reportado em correlação com alguns parâmetros clínico-patológicos nos carcinomas gástricos, de esôfago e de pulmão (Cao *et al.*, 2011).

1.6 Tratamento do Câncer e Medidas Profiláticas

As modalidades terapêuticas disponíveis para o câncer de mama são: para tratamento localizado, cirurgia e radioterapia e; para tratamento sistêmico, a hormonioterapia, para mulheres que expressam os receptores hormonais RE e RP, e a quimioterapia (Ministério Da Saúde, 2004).

A cirurgia pode ser conservadora com ressecção de apenas um segmento da mama seguida da retirada dos gânglios linfáticos ou não conservadora, que se refere à retirada completa da mama, conhecida como mastectomia (Barros *et al.*, 2001).

Nos carcinomas de mama ductais *in situ* (CDIS), a mastectomia cura 98% dos casos. Nos carcinomas invasores que possuem diâmetro igual ou superior a três cm, a mastectomia também deve ser realizada. No entanto, nos carcinomas invasores que possuem diâmetro inferior a três cm, sem comprometimento aparente dos linfonodos, pode-se utilizar a técnica dos linfonodos sentinelas (LS) que visa identificar aqueles linfonodos que necessitam ser submetidos à linfadenectomia. Nos casos em quem o tumor possui diâmetro inferior a dois cm e margens cirúrgicas livres de comprometimento, eles poderão ser ressecados e

tratados com radioterapia. Além disso, o uso de hormonioterapia adjuvante com tamoxifeno, por um período de cinco anos, pode ser considerado (Ministério Da Saúde, 2004).

A radioterapia é utilizada com o objetivo de destruir as células remanescentes após a cirurgia ou para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia. Após a mastectomia, ela é indicada para os casos em que os tumores são iguais ou superiores a cinco cm de diâmetro, com comprometimento da pele, margens comprometidas e com quatro ou mais linfonodos comprometidos (Barros *et al.*, 2001; Ohgaki & Kleihues, 2009).

A radiação provoca alguns efeitos adversos na pele que são consequências fisiológicas da morte celular vascular e epitelial, com a subsequente exposição da membrana basal que pode favorecer a infecção por bactérias oportunistas. A ausência de células endoteliais e epiteliais após a radiação é em parte devido à ativação de células inflamatórias, à produção de quimiocinas e citocinas tóxicas, e à apoptose celular. A supressão da radiação ou da apoptose poderia reduzir o dano agudo no tecido (Liang *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por Liang *et al.* (2003), mostrou que a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias é mediada, ao menos em parte, pela prostaglandina E2 (PGE2). Durante a radiação há a indução da superprodução de citocinas e quimiocinas, que conseqüentemente aumenta a produção de PGE2 localmente e sistemicamente. As duas enzimas chaves na conversão do ácido araquidônico para PGE2 são a ciclooxigenase tipo 1 (COX1) e a enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX2). Portanto, inibidores dessas enzimas, como o celecoxibe, que é um inibidor da enzima COX2, poderiam ser efetivos nestes casos. Além disso, este inibidor também parece diminuir a infiltração de monócitos e neutrófilos no tumor irradiado localmente e ao redor do tecido normal (Liang *et al.*, 2003).

A quimioterapia envolve, atualmente, uma combinação de compostos como o agente alquilante ciclofosfamida que parece ter como efeito adverso o aumento

da toxicidade ovariana e conseqüentemente provocar amenorréia. A incidência global de amenorréia induzida por quimioterapia varia de 53% a 89%, e se esta amenorréia será temporária ou permanente depende da idade da paciente, da dose e do tipo de droga utilizada. Em geral, mulheres acima de 40 anos têm maior probabilidade de ter menopausa permanente quando comparadas às mulheres com menos de 40 anos. Porém, a quimioterapia provavelmente tem efeitos de longo prazo sobre a função ovariana, ou seja, mesmo nas mulheres que fazem o retorno da menstruação após o tratamento, ainda há o risco de menopausa precoce. Além das irregularidades menstruais, há relatos que o tratamento com tamoxifeno pode provocar cistos ovarianos benignos, hiperplasia, endometriose e adenocarcinoma, principalmente nas mulheres pós-menopáusicas. Estes efeitos colaterais adversos estão presentes em 60% destas mulheres (Goldman & O'Hair, 2009).

Nos últimos anos, novas drogas surgiram e demonstraram menos efeitos adversos e uma maior eficácia quando comparadas ao tamoxifeno. Estas drogas são os inibidores de aromatase: letrozol, anastrozol e exemestane. Porém, estes fármacos provocam outros efeitos desagradáveis que são relatados com grande incidência, como dores ósseas e articulares, e efeitos negativos sobre a densidade óssea que pode levar ao aumento do risco de osteoporose e fraturas (Goldman & O'Hair, 2009).

Quando as mulheres são diagnosticadas com câncer de mama durante a gravidez, a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia devem ser reconsideradas. A radioterapia, por exemplo, induz a morte celular por ionização direta através da interação com radicais livres. Mesmo com os devidos cuidados há a dispersão interna para o feto, e a exposição à radiação pode levar à restrição do crescimento intrauterino, a malformações congênitas e, até mesmo, à morte fetal. Há também, teoricamente, riscos futuros de câncer na infância (Goldman & O'Hair, 2009).

Devido aos efeitos adversos e as diferentes respostas tumorais aos tratamentos, têm-se investigado novas modalidades terapêuticas com menor

toxicidade e maior especificidade, conhecidas como terapias alvo. Dentre as terapias alvo, a imunoterapia tem se destacado e está em uso como tratamento padrão em vários tipos de carcinomas, através do uso de adjuvantes imunológicos; anticorpos monoclonais; vacinas contra vírus oncogênicos, como a vacina contra o papilomavírus humano (HPV); além da ativação imunológica, como ocorre no transplante de medula óssea para doenças hematológicas. Estas novas estratégias terapêuticas foram desenvolvidas baseadas nos avanços do entendimento das interações entre os tumores e o sistema imunológico, e visam favorecer a imunidade e romper com os circuitos regulatórios imunológicos que são importantes para a manutenção da tolerância tumoral (Dougan & Dranoff, 2009).

Além disso, outras terapias alvo anticâncer, como substâncias que bloqueiam o crescimento e a metástase do câncer através da intervenção com moléculas específicas, como o uso dos inibidores de angiogênese e drogas indutoras de apoptose, também foram recentemente descritas (Berz & Wanebo, 2011).

Ainda no espectro de novos agentes, encontra-se em uso contra o carcinoma de mama e com bons resultados, o anticorpo monoclonal trastuzumabe, comercialmente conhecido como Herceptin®. Este anticorpo monoclonal é utilizado em pacientes que expressam a proteína HER2, e seu mecanismo de ação parece envolver também a regulação negativa dos receptores de quimiocinas (Choi & An, 2011).

A associação dos receptores de quimiocinas com o câncer de mama aponta para um importante papel desses receptores na metástase e, portanto, se extensivamente explorados poderão também ser alvos de intervenção terapêutica. Além disso, devido as suas características biológicas, a quantificação da expressão dos receptores de quimiocinas em amostras tumorais, pode ser utilizada como um potencial biomarcador da agressividade tumoral (Zlotnik, 2006).

Outra molécula que, se mais extensivamente estudada pode vir a ser um biomarcador e alvo de terapia é o HLA-G. Um estudo de análise de expressão do HLA-G, realizado por Davidson *et al.* (2005), sugere que antes de iniciar o tratamento, esta molécula pode predizer o prognóstico e indicar a eficiência do tratamento, já que células com maior expressão do HLA-G parecem ser mais suscetíveis à quimioterapia. Se estes achados estão diretamente relacionados à resposta imunológica é incerto até o momento. Além disso, acredita-se que a detecção da expressão do HLA-G possa ser benéfica no planejamento da terapia adjuvante, especialmente quando a imunoterapia já foi planejada. Já foi demonstrado que a expressão desta molécula nas células tumorais é significativamente menor em efusões obtidas durante ou após a quimioterapia. Isto sugere que o status do HLA-G também pode ser um marcador para o monitoramento da quimioterapia (Ye *et al.*, 2007).

Além de todos esses possíveis alvos e terapias, novos agentes estão em fases de ensaio 1, utilizados como um agente único ou em combinação com uma ampla variedade de agentes quimioterápicos, como o irinotecan, o topotecan, a cisplatina, a carboplatina, o 5-fluorouracil ou a citarabina. Um desses promissores agentes é o 7-hidróxi-estaurosporina (UCN-01), que é um inibidor não seletivo de CHK1, uma proteína quinase, que participa dos mecanismos que garantem a integridade genômica quando a célula está em situações de estresse. Embora originalmente desenvolvidos para selecionar tumores deficientes de p53, os inibidores de CHK1 podem ser igualmente efetivos na erradicação de tumores com a via da p53 intacta (Ma *et al.*, 2011).

Com o aumento da compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer será possível desenvolver novos agentes antitumorais. Portanto, determinar o perfil molecular dos tumores e realizar estudos de correlação para validar a especificidade do alvo, pode ser a chave para o sucesso do desenvolvimento desses agentes (Ye *et al.*, 2007). Considerando-se a alta incidência e mortalidade do câncer de mama no Brasil, particularmente no estado do Rio Grande do Sul, a caracterização imunogenética

dos indivíduos com câncer de mama que pertencem a este estado, através da análise de variantes polimórficas, torna-se especialmente interessante na busca de novos biomarcadores que atuem através da regulação ou indução da resposta imunitária. Além disso, os diferentes perfis moleculares do câncer de mama, baseado na análise de suas variantes genéticas, podem ser utilizados como fator prognóstico e como fator preditivo para dar suporte clínico no tratamento da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi analisar quatro variantes genéticas: duas relacionadas aos genes que codificam os receptores de quimiocinas CCR2 (rs1799864) e CCR5 (rs333) e; duas variantes relacionadas ao gene *HLA-G* (rs1704 e rs1063320), como potenciais novos biomarcadores moleculares populacionais de diagnóstico e prognóstico em amostras de câncer de mama esporádico e familiar do sul do Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos das referidas variantes gênicas em três grupos de pacientes: (1) Mulheres diagnosticadas com câncer de mama esporádico; (2) Mulheres diagnosticadas com câncer de mama familiar, e; (3) Grupo de mulheres sem câncer de mama e sem histórico familiar de câncer.
- Relacionar as frequências analisadas das diferentes variantes com as características clínicas importantes para avaliação do potencial diagnóstico e prognóstico desses polimorfismos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do Estudo

O estudo foi delineado em: (1) Estudo do tipo caso-controle para atingir o primeiro objetivo, e (2) Estudo de casos para o segundo objetivo.

3.2 Amostra

Como descrito no item 2.2, as amostras foram divididas em três grupos: (1) Grupo composto de mulheres com câncer de mama esporádico; (2) Grupo composto de mulheres com câncer de mama familiar e; (3) Grupo composto de mulheres sem câncer de mama e histórico familiar de câncer.

As amostras dos Grupos 1 e 2 estavam parcialmente disponíveis. Estas pacientes foram recrutadas e caracterizadas em projetos de pesquisa previamente aprovados pelos devidos comitês de ética institucionais. As amostras de casos do Grupo 1 foram provenientes do ambulatório de oncologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA); as amostras de casos do Grupo 2 foram provenientes do ambulatório de oncogenética do HCPA e do Núcleo Mama Porto Alegre; as amostras controles (Grupo 3) foram constituídas de mulheres atendidas no Núcleo Mama Porto Alegre e no HCPA, tendo sido recrutadas e caracterizadas previamente para outras variantes em projeto de pesquisa já aprovado pelo GPPG (vide Aspectos Éticos, item 3.4).

3.2.1. Critérios de Inclusão

- Grupo caso 1: 83 mulheres com câncer de mama esporádico. Neste grupo foram incluídas mulheres diagnosticadas com câncer de mama com idade

igual ou superior a 50 anos e que não tinham, até o momento da coleta, história familiar de primeiro ou segundo grau de câncer de mama ou outro tumor que sugerisse o diagnóstico de síndrome de predisposição hereditária ao câncer;

- Grupo caso 2: 105 mulheres com câncer de mama familiar. Neste grupo foram incluídas mulheres diagnosticadas com câncer de mama, que tinham história familiar de câncer de mama e outros tumores, cujo heredograma possuía os critérios para as síndromes de carcinomas hereditários mais comuns, como por exemplo, a Síndrome de Li-Fraumeni, que é causada por mutações germinativas no gene *TP53* e predispõe os afetados a diversos tumores em idade jovem;

- Grupo controle: 151 mulheres com idade semelhante ao grupo de casos (Grupo 1 e Grupo 2) que realizaram mamografia nos últimos 12 meses antes da coleta da amostra e que não tinham história familiar, evidência clínica e/ou suspeita de câncer de mama.

3.2.2. Análise dos Polimorfismos

O material analisado foi o DNA genômico extraído a partir de sangue periférico.

Tanto o DNA genômico previamente disponível, quanto o DNA genômico obtido prospectivamente, foi proveniente de amostras de sangue periférico coletadas em dois tubos de 5 mililitros (mL) com EDTA e submetidas à extração de DNA com Kit de Extração GE (GE *Healthcare Lifesciences* BR) a partir da fração leucocitária do sangue. Posteriormente o DNA genômico foi quantificado em equipamento Nanodrop, disponível na Unidade de Análise Molecular e de Proteínas do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA e armazenado a -20°C no Laboratório de Medicina Genômica do HCPA.

As técnicas utilizadas para as genotipagens foram:

1. Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo baseado no Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP): para identificação da variante do gene *CCR2*, rs1799864 e; para a identificação da variante rs1063320 do *HLA-G*.

A genotipagem da variante rs1799864 (do gene *CCR2*) foi realizada utilizando-se os seguintes *primers*: Direto: 5' TTGTGGGCAACATGATGG 3' e; Reverso: 5' GAGCCCACAATGGGAGAGTA 3' (Mwg Operon). Cada amostra para a reação da PCR foi preparada para um volume final de 25 microlitros (μL) nas seguintes condições: 1 μL de DNA [50 nanogramas (ng)]; 2,5 μL de tampão de PCR 10X [200 milimolar (mM) de hidroximetilaminometano com ácido clorídrico (Tris-HCl) pH 8.4 e 500 mM de cloreto de potássio (KCl)] (Invitrogen); 1 μL de cloreto de magnésio (MgCl_2) (Invitrogen) à 50 mM; 1 μL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP) (Invitrogen) à 5 mM; 1 μL de cada *primer* na concentração de 10 picomoles (pmol) e 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) à 5 unidades por microlitro (U/ μL), completados com 18,3 μL de água (H_2O) para atingir o volume final. O programa de amplificação consistiu em 1 ciclo para a desnaturação inicial do DNA à 94 graus Celsius ($^\circ\text{C}$) por 1 minuto (min); seguido de 40 ciclos também para a desnaturação do DNA à 94 graus $^\circ\text{C}$ por 1 min; 40 ciclos à 55 $^\circ\text{C}$ por 1 min para o anelamento dos *primers*; 40 ciclos de 72 $^\circ\text{C}$ por 1 min para a extensão dos novos fragmentos de DNA e; 1 ciclo para uma extensão final à 72 $^\circ\text{C}$ por 3 min. O produto da amplificação foi submetido à clivagem pela enzima *BsaBI overnight* à 37 $^\circ\text{C}$ e produziu fragmentos com 110 pb e 18 pb para o alelo variante *64I* ou um fragmento único de 128 pb, não digerido, para o alelo selvagem que não possui a substituição da base nitrogenada guanina pela base nitrogenada adenina, que levaria a consequente troca do aminoácido valina pelo aminoácido isoleucina. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV, em gel de poliacrilamida 6%, corado com brometo de etídeo.

A genotipagem da variante rs1063320 do *HLA-G* foi realizada utilizando-se os seguintes *primers*: Direto: 5' TCATGCTGAACTGCATTCCTTCC 3' e; Reverso: 5' CTGGTGGGACAAGGTTCTACTG 3' (Mwg Operon). Cada amostra para a

reação da PCR foi preparada para um volume final de 25 µL nas seguintes condições: 1 µL de DNA [50 ng]; 2,5 µL de tampão de PCR 10X [200 mM de Tris-HCl pH 8.4 e 500 mM de KCl] (Invitrogen); 1 µL de MgCl₂ (Invitrogen) à 50 mM; 1 µL de dNTP (Invitrogen) à 5 mM; 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 pmol e; 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) à 5 U/µL, completados com 17,3 µL de H₂O para atingir o volume final. O programa de amplificação consistiu em 1 ciclo para a desnaturação inicial do DNA à 94 °C por 5 min; seguido de 32 ciclos também para a desnaturação do DNA à 94 °C por 30 segundos (s); 32 ciclos de 65,5 °C por 30 s para o anelamento dos *primers*; 32 ciclos de 72°C por 1 min para a extensão dos novos fragmentos de DNA e 1 ciclo para uma extensão final à 72 °C por 5 min. O produto de amplificação foi submetido à clivagem com a enzima de restrição *Bae*GI por 3 horas (hrs) à 37 °C e, produziu fragmentos de 406 pb para o alelo selvagem C e fragmentos de 316 pb e 90 pb para o alelo mutado G. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV, em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo;

2. Reação em Cadeia da Polimerase baseada na Sequência de *Primers* Específicos (PCR-SSP): para a identificação da variante do gene *CCR5*, rs333 e para a identificação do polimorfismo rs1704, do *HLA-G*.

A genotipagem da variante rs333 (do gene *CCR5*) foi realizada utilizando-se os seguintes *primers* específicos previamente descritos por CHIES & HUTZ (2003): Direto: 5' GAAGTTCCTCATTACACCTGCAGCTCTC 3' e; Reverso: 5' CTTCTTCTCATTTTCGACACGAAGCAGAG 3' (Mwg Operon). Cada amostra para a reação da PCR foi preparada para um volume final de 25 µL nas seguintes condições: 1 µL de DNA [50 ng]; 2,5µL de tampão de PCR 10X [200 mM de Tris-HCl pH 8.4 e 500 mM de KCl] (Invitrogen); 1,5 µL de MgCl₂ (Invitrogen) à 50 mM; 1 µL de dNTP (Invitrogen) à 5 mM; 1 µL de cada *primer* na concentração de 10 pmol e; 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) à 5 U/µL, completados com 16,8 µL de H₂O para atingir o volume final. O programa de amplificação consistiu em 1 ciclo para a desnaturação inicial do DNA à 94 °C por 4 min; seguido de 40 ciclos também para a desnaturação do DNA à 94 °C por 1 min; 40 ciclos à 55 °C

por 1 min para o anelamento dos *primers*; 40 ciclos à 72 °C por 1 min para a extensão da novo fragmento de DNA e; 1 ciclo para uma extensão final à 72 °C por 7 min. O produto de amplificação produziu fragmentos de 137 pb para o alelo selvagem sem a deleção dos 32 pb ou fragmentos de 102 pb para o alelo mutante *delta32*. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV, em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo.

A genotipagem do polimorfismo rs1704 do *HLA-G* foi realizada utilizando-se dos seguintes *primers* específicos: Direto: 5' GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC 3' e; Reverso: 5' GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA 3' (Mwg Operon). Cada amostra para a reação da PCR foi preparada para um volume final de 25 µl, nas seguintes condições: 1 µL de DNA [50 ng]; 2,5 µL de tampão de PCR 10X [200 mM de Tris-HCl pH 8.4 e 500 mM de KCl] (Invitrogen); 0,75 µL de MgCl₂ (Invitrogen) à 50 mM; 2 µL de dNTPs (Invitrogen) à 5 mM; 1 µL de cada *primer* e; 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) à 5 U/µL. O programa de amplificação consistiu em 1 ciclo para a desnaturação inicial do DNA à 94 °C por 2 min; seguido de 35 ciclos também para a desnaturação do DNA por 30 s; 35 ciclos à 64 °C por 1 min para o anelamento dos *primers*; 35 ciclos à 72 °C por 2 min para a extensão da nova fita de DNA e; 1 ciclo para uma extensão final à 72 °C por 10 min. O produto de amplificação produziu fragmentos de 224 pb para o alelo com a inserção dos 14 pb ou fragmentos de DNA de 210 pb para o alelo selvagem com a ausência da inserção. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV, em gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídeo.

A análise dos polimorfismos foi realizada no Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.3 Análise Estatística dos Dados

As frequências alélicas e genóticas dos diferentes grupos de mulheres com câncer de mama, Grupo 1 (esporádico) e Grupo 2 (familiar) e; do Grupo 3 (controle), foram estimadas por contagem direta e posteriormente as frequências genóticas foram comparadas de acordo com a expectativa de Hardy-Weinberg utilizando-se o Teste Qui-quadrado (χ^2). Tanto as frequências alélicas, quanto as frequências genóticas das quatro variantes analisadas (rs1799864, rs333, rs1063320 e rs1704), foram comparadas por χ^2 ou Teste Exato de Fisher. Os ajustes residuais e a estimativa de razão de chances [*Odds Ratio* (OD)] também foram calculados. As correlações entre os parâmetros laboratoriais e clínicos das mulheres dos Grupos 1 e 2 (esporádico e familiar) e as frequências polimórficas, foram realizadas também por χ^2 ou Teste de Exato de Fisher para as variáveis qualitativas e para as variáveis quantitativas utilizou-se o Teste t. A correção de Bonferroni foi utilizada para comparações múltiplas quando houve um valor de *p* significativo. O nível de significância considerado foi de 0,05 e, todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS, versão 20.0 (SPSS Inc., Estados Unidos) e com o programa estatístico winPEPI (ABRAMSOM, 2004).

3.4 Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica e pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA (Anexo 1) para sua realização (projeto de número 110572). Todos os pesquisadores envolvidos assinaram um termo de compromisso para a análise e uso de dados clínicos registrados nos prontuários (Anexo 2), comprometendo-se a preservar a privacidade das pacientes e utilizar os dados clínicos obtidos exclusivamente para este estudo. Parte da amostra referente ao Grupo 1 (mulheres com câncer de mama esporádico) foi proveniente de estudo já aprovado no GPPG, que previa em seu consentimento original o armazenamento e uso posterior do material biológico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de número 08-

070). As demais mulheres convidadas que aceitaram participar do estudo posteriormente, assinaram o TCLE em anexo (Anexo 3). As amostras referentes ao Grupo 2 (mulheres com câncer de mama familiar) foram provenientes de projetos do HCPA (projetos aprovados no GPPG sob número 08-022 e 09-115) e do “*Projeto Genética Núcleo Mama Porto Alegre*” que também foi aprovado pelos comitês de ética dos hospitais participantes e pelo CONEP. O “*Projeto Genética Núcleo Mama Porto Alegre*” foi delineado em 2003 para determinar a prevalência de indivíduos com maior risco para desenvolver câncer de mama hereditário e, para determinar a prevalência de mutações germinativas em genes específicos de predisposição genética ao câncer de mama em uma amostra populacional do sul do Brasil selecionada com base na história familiar de câncer. Todas as pacientes encaminhadas para a avaliação do risco genético assinaram o TCLE, e os pesquisadores envolvidos também assinaram o termo de compromisso para revisão de prontuários e para avaliar informações presentes nos registros médicos/hospitalares (projeto aprovado no GPPG sob o número 08-070). As amostras do Grupo 3 (controles) foram derivadas do projeto número 08-182, vigente, também aprovado pelo CEP do HCPA e que previa o estudo de variantes polimórficas potencialmente relacionadas ao câncer de mama e o armazenamento de materiais biológicos para estudos futuros.

4. RESULTADOS

Foi analisado um total de 188 mulheres com câncer de mama e 151 sem câncer de mama e sem histórico familiar de câncer (grupo controle), para as variantes polimórficas rs1799864 e rs333 dos genes que codificam os receptores de quimiocinas, *CCR2* e *CCR5*, respectivamente, e para a variante polimórfica do *HLA-G* rs1063320. Dentre estas mulheres portadoras do carcinoma, 83 possuem câncer de mama esporádico e 105 possuem câncer de mama familiar. Além disso, 79 mulheres com câncer de mama esporádico e 78 mulheres com câncer de mama familiar foram também genotipadas para a variante rs1704 do *HLA-G*.

Para o melhor entendimento da relação das variantes deste estudo com o carcinoma de mama, os grupos foram analisados da seguinte forma: grupo controle versus mulheres com câncer de mama esporádico; grupo controle versus mulheres com câncer de mama familiar; grupo controle versus mulheres com câncer de mama esporádico e mulheres com câncer de mama familiar, agrupados, e; mulheres com câncer de mama esporádico versus mulheres com câncer de mama familiar.

A média de idade do grupo controle foi $52,44 \pm 6,141$ anos; do grupo de mulheres com câncer de mama esporádico foi $57,29 \pm 8,457$ anos e; do grupo de mulheres com câncer de mama familiar foi de $44,23 \pm 12,092$ anos. Quando comparadas as idades das mulheres entre os grupos portadores de câncer de mama (esporádico e familiar), observou-se que as mulheres pertencentes ao grupo com câncer de mama familiar são significativamente mais jovens, $p < 0,001$.

Além disso, a idade da menopausa por ser considerada uma importante variável clínica do carcinoma de mama, também foi avaliada e, do mesmo modo, quando comparadas as idades das mulheres entre os grupos portadores de câncer de mama (esporádico e familiar), observou-se que as mulheres

pertencentes ao grupo com câncer de mama familiar apresentaram a menopausa em idade mais precoce, $p = 0,001$. A média da idade da menopausa do grupo controle foi $47,59 \pm 5,045$ anos; das mulheres com câncer de mama esporádico foi $47,87 \pm 3,859$ anos e; das mulheres com câncer de mama familiar foi de $44,58 \pm 6,153$ anos.

Uma das limitações deste trabalho foi não termos acesso aos dados clínicos de todas as mulheres para poder avaliar outras variáveis consideradas importantes para diagnóstico e prognóstico do carcinoma de mama. Portanto, apenas um pequeno número de mulheres foi avaliado quanto às características clínicas, que foram: presença de metástases à distância ($n=110$); tipo histológico ($n=83$); grau histológico ($n=50$); comprometimento linfonodal ($n=61$); número de linfonodos comprometidos ($n=55$); expressão dos receptores de estrogênio ($n=61$) e progesterona ($n=60$) e; expressão das proteínas HER2 ($n=49$) e p53 ($n=49$) (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis clínicas analisadas e número de casos para cada variável

	Metástase			N Total
	Ausência	Presença		
Câncer de Mama Esporádico	26	19		45
Câncer de Mama Familiar	32	33		65
N Total	58	52		110

	Tipo Histológico					N Total
	CDIS	CDI	CLI	CM	Carcinoma Bilateral	
Câncer de Mama Esporádico	3	35	7	1	1	47
Câncer de Mama Familiar	2	21	1	-	12	36
N Total	5	56	8	1	13	83

	Grau Histológico			N Total
	Grau Histológico 1	Grau Histológico 2	Grau Histológico 3	
Câncer de Mama Esporádico	5	22	10	37
Câncer de Mama Familiar	4	3	6	13
N Total	9	25	16	50

	Comprometimento Linfonodal		N Total
	Não	Sim	
Câncer de Mama Esporádico	24	18	42
Câncer de Mama Familiar	8	11	19
N Total	32	29	61

Tabela 5. Variáveis clínicas analisadas e número de casos para cada variável (Continuação)

	Quantidade de Linfonodos Comprometidos									N Total
	0	1	2	3	4	6	7	8	13	
Câncer de Mama Esporádico	24	3	3	-	4	-	1	1	1	37
Câncer de Mama Familiar	8	2	3	1	2	2	-	-	-	18
N Total	32	5	6	1	6	2	1	1	1	55

	Receptores de Estrogênio		N Total
	Ausência	Presença	
Câncer de Mama Esporádico	10	32	42
Câncer de Mama Familiar	9	10	19
N Total	19	42	61

	Receptores de Progesterona		N Total
	Ausência	Presença	
Câncer de Mama Esporádico	12	30	42
Câncer de Mama Familiar	6	12	18
N Total	18	42	60

	Expressão de HER2		N Total
	Ausência	Presença	
Câncer de Mama Esporádico	28	13	41
Câncer de Mama Familiar	6	2	8
N Total	34	15	49

Tabela 5. Variáveis clínicas analisadas e número de casos para cada variável (Conclusão)

	Expressão da Proteína p53		N Total
	Ausência	Presença	
Câncer de Mama Esporádico	32	9	41
Câncer de Mama Familiar	4	4	8
N Total	36	13	49
	Quimioterapia		N Total
	Não	Sim	
Câncer de Mama Esporádico	2	42	44
Câncer de Mama Familiar	1	22	23
N Total	3	64	67
	Radioterapia		N Total
	Não	Sim	
Câncer de Mama Esporádico	13	31	44
Câncer de Mama Familiar	1	18	19
N Total	14	49	63

Nota: Na variável Tipo Histológico, CDIS refere-se a carcinoma ductal *in situ*, CDI refere-se a carcinoma ductal invasor, CLI refere-se a carcinoma lobular invasor e CM refere-se a carcinoma medular.

Em relação às variantes polimórficas analisadas, todas as frequências genotípicas estão de acordo com o esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6. Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as variantes do *CCR2* e *CCR5*

Variantes	Grupo Controle	Mulheres com Câncer de Mama Esporádico	Mulheres com Câncer de Mama Familiar
CCR2 (rs1799864)			
Val/Val			
Observado	111	56	64
Esperado	112,8	57,4	66,4
64I/Val			
Observado	39	26	39
Esperado	35,4	23,3	34,2
64I/64I			
Observado	1	1	2
Esperado	2,8	2,4	4,4
Total (n)	151	83	105
Qui-Quadrado (χ^2) p	0,216182	0,286553	0,149925
CCR5 (rs333)			
Wt/Wt			
Observado	137	72	86
Esperado	137,3	72,4	86
Delta32/Wt			
Observado	14	11	18
Esperado	13,4	10,3	18,1
Delta32/Delta32			
Observado	0	0	1
Esperado	0,3	0,4	1
Total (n)	151	83	105
Qui-Quadrado (χ^2) p	0,550278	0,517925	0,956990

Nota: Se $p > 0,05$ é consistente com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 7. Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as variantes do *HLA-G*

Variantes	Grupo Controle	Mulheres com Câncer de Mama Esporádico	Mulheres com Câncer de Mama Familiar
rs1704			
-14pb/-14pb			
Observado	35	30	23
Esperado	32,6	26,8	23,4
+14pb/-14pb			
Observado	39	32	38
Esperado	43,7	38,4	39,2
+14pb/+14pb			
Observado	17	17	17
Esperado	14,6	13,8	16,4
Total (n)	91	79	78
Qui-Quadrado (χ^2) p	0,303091	0,136956	0,860896
rs1063320			
C/C			
Observado	34	13	23
Esperado	30,6	13,5	23,6
C/G			
Observado	68	41	52
Esperado	74,8	40	52,8
G/G			
Observado	49	29	30
Esperado	45,6	29,5	29,6
Total (n)	151	83	105
Qui-Quadrado (χ^2) p	0,266835	0,812179	0,958305

Nota: Se $p > 0,05$ é consistente com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências genótípicas, alélicas (Tabela 8 e Tabela 9) e haplotípicas (Tabela 10 e Tabela 11) das variantes estudadas foram estimadas para o grupo controle, grupo de mulheres com câncer de mama esporádico e grupo de mulheres com câncer de mama familiar.

Tabela 8. Frequências genótípicas e alélicas das variantes do *CCR2* e *CCR5*

	Grupo Controle	Mulheres com Câncer de Mama Esporádico	Mulheres com Câncer de Mama Familiar
CCR2 (rs1799864)			
<i>Val/Val</i>	111 [0,7351]	64 [0,6095]	56 [0,6747]
<i>64I/Val</i>	39 [0,2583]	39 [0,3714]	26 [0,3133]
<i>64I/64I</i>	1 [0,0066]	2 [0,0191]	1 [0,0120]
Alelos			
¹ <i>Val</i>	261 [0,8642]*	138 [0,8313]	167 [0,7952]*
<i>64I</i>	41 [0,1358]	28 [0,1687]	43 [0,2048]
¹ Fisher p = 0,040 ; OR 0,61, IC 95% 0,38-0,98			
CCR5 (rs333)			
<i>Wt/Wt</i>	137 [0,9073]	72 [0,8675]	86 [0,8191]
<i>Delta32/Wt</i>	14 [0,0927]	11 [0,1325]	18 [0,1714]
<i>Delta32/Delta32</i>	-	-	1 [0,0095]
Alelos			
² <i>Wt</i>	288 [0,9536]*	155 [0,9337]	190 [0,9048]*
<i>Delta32</i>	14 [0,0464]	11 [0,0663]	20 [0,0952]
² Fisher p = 0,032 ; OR 0,46, IC 95% 0,23-0,94			

Nota: Estão descritas as frequências absolutas e [relativas] dos genótipos e alelos.

Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas das variantes do *HLA-G*

Variantes do <i>HLA-G</i>	Grupo Controle	Mulheres com Câncer de Mama Esporádico	Mulheres com Câncer de Mama Familiar
rs1704			
-14pb/-14pb	35 [0,3846]	30 [0,3797]	23 [0,2949]
+14pb/-14pb	39 [0,4286]	32 [0,4051]	38 [0,4872]
+14pb/+14pb	17 [0,1868]	17 [0,2152]	17 [0,2179]
Alelos			
-14pb	109 [0,5989]	92 [0,5823]	84 [0,5385]
+14pb	73 [0,4011]	66 [0,4177]	72 [0,4615]
rs1063320			
C/C	34 [0,225]	13 [0,1567]	23 [0,2191]
C/G	68 [0,450]	41 [0,4939]	52 [0,4952]
G/G	49 [0,325]	29 [0,3494]	30 [0,2857]
Alelos			
C	136 [0,4503]	67 [0,4036]	98 [0,4667]
G	166 [0,5497]	99 [0,5964]	112 [0,5333]

Nota: Estão descritas as frequências absolutas e [relativas] dos genótipos e alelos.

Tabela 10. Frequências haplotípicas das variantes do *CCR2* e *CCR5*

Haplótipos	Grupo Controle	Mulheres com Câncer de Mama Esporádico	Mulheres com Câncer de Mama Familiar
<i>Wt/64I</i>	1 [0,0066]	1 [0,0120]	2 [0,0191]
¹ <i>Wt/Val</i>	99 [0,6556]*	49 [0,5904]	49 [0,4667]*
<i>Wt/Htz</i>	37 [0,2450]	22 [0,2650]	35 [0,3333]
<i>Htz/Val</i>	12 [0,0795]	7 [0,8434]	14 [0,1333]
<i>Duplo Htz</i>	2 [0,0133]	4 [0,0482]	4 [0,0381]
<i>Delta32/Val</i>	-	-	1 [0,0095]
<i>Delta32/64I</i>	-	-	-
Total (n)	151 [1]	83 [1]	105 [1]

¹ Pearson **p = 0,030**

Nota: Estão descritas as frequências absolutas e [relativas] dos haplótipos. *Wt* refere-se ao homocigoto selvagem e *Delta32* ao homocigoto mutante da variante rs333 do *CCR5*; *Val* refere-se ao homocigoto selvagem e *64I* ao homocigoto mutante da variante rs1799864 do *CCR2*. *Htz* refere-se à heterocigoto.

Tabela 11. Frequências haplotípicas das variantes do *HLA-G*

Haplótipos	Grupo Controle	Mulheres com Câncer de Mama Esporádico	Mulheres com Câncer de Mama Familiar
-14pb/C	17 [0,1868]	13 [0,1266]	15 [0,1923]
-14pb/CG	15 [0,1648]	16 [0,2025]	5 [0,0641]
-14pb/G	3 [0,0330]	1 [0,0126]	3 [0,0385]
+14pb/C	3 [0,0330]	-	-
+14pb/CG	-	-	1 [0,0128]
+14pb/G	14 [0,1538]	17 [0,2152]	16 [0,2051]
<i>Htz</i> /C	2 [0,0220]	-	1 [0,0128]
Duplo <i>Htz</i>	25 [0,2747]	22 [0,2785]	30 [0,3846]
<i>Htz</i> /G	12 [0,1319]	10 [0,1266]	7 [0,0898]
Total (n)	91 [1]	79 [1]	78 [1]

Nota: Estão descritas as frequências absolutas e [relativas] dos haplótipos. -14pb refere-se ao genótipo homocigoto selvagem, sem a inserção dos 14pb e +14pb refere-se ao genótipo homocigoto mutante com a inserção dos 14pb, da variante rs1704; C refere-se ao homocigoto selvagem e G ao homocigoto mutante da variante rs1063320. *Htz* refere-se à heterocigoto.

Como pode ser observado na Tabela 8 e na Tabela 10, encontrou-se diferença estatística significativa entre as frequências alélicas, das variantes do *CCR2* e *CCR5*, e dos haplótipos destas mesmas variantes quando comparados o grupo controle com o grupo de mulheres com câncer de mama familiar. Observou-se maior frequência do alelo selvagem *Val* da variante rs1799864 ($p=0,040$, OR 0,61, IC 95% = 0,38 – 0,98); maior frequência da do alelo selvagem *Wt* da variante rs333 ($p=0,032$, OR 0,46, IC 95% = 0,23 – 0,94) e; maior frequência do haplótipo duplo selvagem *Wt/Val* ($p=0,030$) destas mesmas variantes, nas mulheres do grupo controle. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as frequências alélicas e haplotípicas das variantes do *HLA-G* para os grupos estudados.

Quando avaliados, individualmente, os fatores clínicos para os grupos com câncer de mama (esporádico e familiar), não se observou diferenças estatísticas

em relação à presença de metástases à distância, ou seja, ambos os grupos apresentaram frequência similar de metástases. O mesmo pode ser observado em relação ao grau histológico; expressão dos receptores RE e RP, e das proteínas HER2 e p53; comprometimento linfonodal e número de linfonodos comprometidos. No entanto, em relação ao tipo histológico, observou-se maior frequência ($p = 0,001$) (Tabela 12) do carcinoma ductal invasor (CDI) e do carcinoma lobular invasor (CLI), em mulheres com câncer de mama esporádico e maior frequência do carcinoma bilateral, em mulheres com câncer de mama familiar. Apesar de desconhecermos, neste estudo, o tipo histológico dos carcinomas bilaterais, eles foram incluídos nesta categoria porque independente do tipo histológico eles geralmente estão associados às mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que representam um grupo de maior risco para o desenvolvimento de carcinomas. Infelizmente os dados referentes a estes genes de predisposição não puderam ser avaliados.

Tabela 12. Comparação dos tipos histológicos entre as mulheres com câncer de mama esporádico e com câncer de mama familiar

	Tipo Histológico					Pearson P
	CDIS	CDI	CLI	CM	Carcinoma Bilateral	
Câncer de Mama Esporádico (n)	1	35*	7*	1	1	0,001
Ajuste Residual		2,0	2,0		-3,7	
Câncer de Mama Familiar (n)	3	21	1	-	12*	
Ajuste Residual		-2,0	-2,0		3,7	

Nota: *Ajuste residual > 1,96 considera-se que há associação significativa.

Em relação às modalidades terapêuticas (quimioterapia e radioterapia), observou-se que a radioterapia foi a modalidade mais utilizada para o tratamento nas mulheres com câncer de mama familiar, enquanto nas mulheres com câncer

de mama esporádico observou-se maior frequência do uso de quimioterapia para o tratamento ($p = 0,047$; OD 1,345, IC 95% = 1,080 – 1,673).

Posteriormente as características clínicas foram correlacionadas com os genótipos e com as combinações haplotípicas das variantes polimórficas analisadas. Nenhuma das variantes teve relação com a presença ou ausência de metástases à distância, com comprometimento linfonodal e número de linfonodos comprometidos, grau histológico, expressão de RE, HER2 e p53.

No entanto, em relação ao tipo histológico, observou-se maior frequência do genótipo homozigoto selvagem, *Val/Val*, da variante rs1799864, nas mulheres portadoras do câncer de mama esporádico do tipo CLI comparada às mulheres com câncer de mama familiar que apresentam o mesmo tipo histológico (Tabela 13) ($p = 0,005$) e; observou-se maior frequência do haplótipo *Wt/64I*, dos genes que codificam os receptores de quimiocinas, nas mulheres portadoras do carcinoma de mama familiar do tipo histológico CLI em relação às mulheres com carcinoma esporádico de mesmo tipo histológico ($p = 0,018$) (Tabela 14). Para as demais variantes não foi encontrada qualquer relação estatística significativa entre os grupos estratificados pelo tipo histológico.

Tabela 13. Relação do tipo histológico e a variante rs1799864 do CCR2 entre as mulheres com câncer de mama esporádico e câncer de mama familiar

Tipo Histológico		Genótipos		
		Val/Val (n)	64I/64I (n)	64I/Val (n)
CDIS	Esporádico	1	-	-
	Familiar	2	-	1
CDI	Esporádico	24	-	11
	Familiar	16	-	5
CLI	Esporádico	7 *	-	-
	Ajuste Residual	2,8	-2,8	
	Familiar	-	1*	-
	Ajuste Residual	-2,8	2,8	
CM	Esporádico	1	-	-
	Familiar	-	-	-
Carcinoma Bilateral	Esporádico	1	-	-
	Familiar	8	-	4

Nota: *Ajuste residual > 1,96 considera-se que há associação significativa; Pearson **p = 0,005**.

Tabela 14. Relação entre os haplótipos das variantes do *CCR2* (rs1799864) e *CCR5* (rs333) e tipo histológico entre as mulheres com câncer de mama esporádico e câncer de mama familiar

Tipo Histológico		Haplótipos				
		<i>Wt/64I</i> (n)	<i>Wt/Val</i> (n)	<i>Wt/Htz</i> (n)	<i>Htz/Val</i> (n)	<i>Htz/Htz</i> (n)
CDIS	Esporádico	-	2	1	-	-
	Familiar	-	1	-	-	-
CDI	Esporádico	-	21	8	3	3
	Familiar	-	11	5	5	-
CLI	Esporádico	-	5	-	2	-
	Ajuste Residual	-2,8				
	Familiar	1*	-	-	-	-
	Ajuste Residual	2,8				
CM	Esporádico	-	1	-	-	-
	Familiar	-	-	-	-	-
Carcinoma Bilateral	Esporádico	-	1	-	-	-
	Familiar	-	6	4	2	-

Nota: *Ajuste residual > 1,96 considera-se que há associação significativa; Pearson **p = 0,018**.

Encontrou-se também uma maior frequência de mulheres heterozigotas (+14pb/-14pb) para a variante rs1704, do *HLA-G*, entre as mulheres que não expressam o RP, pertencentes ao grupo com câncer de mama familiar, enquanto uma maior frequência de homozigotas selvagens (-14pb/-14pb) para a mesma variante foi observada entre as mulheres que não expressam o RP pertencentes ao grupo com câncer de mama esporádico (p = 0,039) (Tabela 15).

Tabela 15. Relação entre a ausência (negativo) ou presença (positivo) da expressão do receptor de progesterona e a variante rs1704 do *HLA-G* entre as mulheres com câncer de mama esporádico e mulheres com câncer de mama familiar

Receptor de Progesterona		Genótipos		
		-14pb/ -14pb	+14pb/ +14pb	+14pb/ -14pb
Negativo	Esporádico	6*	1	4
	Ajuste Residual	2,2		-2,5
	Familiar	-	-	6*
	Ajuste Residual	-2,2		2,5
Positivo	Esporádico	9	7	12
	Familiar	3	4	3

Nota: *Ajuste residual > 1,96 considera-se que há associação significativa; Pearson $p = 0,039$.

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença de etiologia complexa (Iorio *et al.*, 2008) que envolve tanto fatores ambientais (Strumylaite *et al.*, 2010; Wolin *et al.*, 2010; Pieta *et al.*, 2012); quanto fatores genéticos (Tsuda, 2009). Estima-se que 5 a 10% dos carcinomas de mama estejam relacionados com mutações na linhagem germinativa, as quais predispõem ao câncer de mama familiar, e que 90 a 95% estejam relacionados a mutações na linhagem somática, as quais desencadeiam o câncer de mama esporádico (Tsuda, 2009).

Na última década, com o avanço da compreensão do desenvolvimento do carcinoma, tem-se dado bastante atenção à relação do sistema imunológico e a progressão da doença. Acredita-se que o sistema imunológico possa tanto antagonizar quanto favorecer o desenvolvimento do carcinoma. As células tumorais parecem utilizar diferentes mecanismos para escapar da vigilância imunológica ou para utilizar as células do sistema imunológico a seu favor, promovendo um microambiente inflamatório que pode auxiliar no desenvolvimento da angiogênese e, posteriormente, permitir a metástase, que é a maior causa de mortalidade da doença.

O carcinoma de mama é um tipo tumoral que se desenvolve de forma relativamente lenta, portanto a possibilidade de estabelecer o diagnóstico ainda em fase precoce é elevada (Abreu & Koifman, 2002). Geralmente o diagnóstico e a avaliação do prognóstico são realizados pela análise dos fatores responsáveis pelo desencadeamento e progressão do carcinoma. Ainda pouco se sabe sobre a relação do sistema imunológico e o desenvolvimento do carcinoma de mama, mas acredita-se que as moléculas envolvidas nos mecanismos imunológicos do hospedeiro, poderiam, se mais extensivamente estudadas, ser utilizadas como alvos para diagnóstico e prognóstico e, até mesmo, na definição de novos tratamentos e terapias.

A região sul do Brasil tem uma das maiores incidências de carcinoma de mama feminino do país, portanto, nosso estudo foi composto de apenas mulheres residentes nessa região. Devido aos carcinomas de mama familiar e esporádico diferirem em origem e características genéticas, nós avaliamos o impacto de importantes genes do sistema imunológico, *HLA-G*, *CCR2* e *CCR5*, em ambos os grupos de carcinoma de mama, familiar e esporádico, separadamente e em conjunto; comparando-os a um grupo de mulheres, também residentes no sul do Brasil que não possuem o carcinoma, nem história familiar de câncer.

O carcinoma de mama é geralmente raro em mulheres jovens, com idade abaixo dos 35 anos. A partir desta idade, a taxa de incidência é progressiva (<http://www.inca.gov.br>). Porém, se as mulheres são portadoras de mutações nos genes de predisposição da doença, a chance dela ocorrer em idade jovem, aumenta. Portanto, mulheres com câncer de mama familiar geralmente apresentam a doença em idade mais jovem do que as mulheres com câncer de mama esporádico. Nas mulheres com câncer de mama esporádico, o carcinoma se apresenta, entre outros fatores, como reflexo do acúmulo de mutações adquiridas ao longo dos anos. Esta questão da idade foi claramente observada em nosso estudo, no qual o grupo de mulheres com câncer de mama familiar apresentou idade média inferior ao grupo de mulheres com carcinoma de mama esporádico.

Ainda em relação à idade, observou-se que as mulheres com câncer de mama familiar entraram no período de menopausa mais precocemente. As idades de menarca e menopausa são consideradas importantes fatores de avaliação clínica, pois refletem o período em que as mulheres estiveram expostas aos hormônios sexuais, estrogênio e progesterona. Estes hormônios são fatores conhecidos por atuar na proliferação celular e participar do desenvolvimento do carcinoma. Acredita-se que as mulheres que tiveram mais tempo de exposição a estes hormônios tenham maior chance de desenvolver a doença. Infelizmente, o tempo de exposição total (período entre a menarca e a menopausa), não pode ser avaliado em nosso estudo por não termos a idade da menarca. Portanto, a

diferença na idade da menopausa observada no nosso trabalho pode envolver duas situações: a) revelar um tempo de exposição menor aos hormônios sexuais; e b) a menopausa pode ter sido causada precocemente no grupo de mulheres com câncer de mama familiar, que são mais jovens que as portadoras de câncer de mama esporádico, devido à exposição ao tratamento do carcinoma, que possui como um dos efeitos adversos mais relatados, a amenorréia, muitas vezes permanente.

Ao analisar os parâmetros clínicos, observamos em nosso estudo que mulheres com câncer de mama familiar apresentaram uma menor frequência dos tipos de carcinoma de mama invasivos, comparadas às mulheres com câncer de mama esporádico. Ou seja, as mulheres pertencentes ao grupo com carcinoma de mama esporádico tiveram maior frequência do CDI e do CLI ($p = 0,001$). Curiosamente, nenhuma das mulheres com carcinoma de mama familiar do tipo CLI era homocigota selvagem (*Val/Val*) para a variante do *CCR2*, diferente das mulheres pertencentes ao grupo com carcinoma de mama esporádico de mesmo tipo histológico. Apesar do número de mulheres com esse tipo histológico ter sido pequeno, estes dados não podem ser descartados, porque fortalecem a hipótese de que nas mulheres com câncer de mama esporádico, com um receptor *CCR2* completamente funcional, pode haver uma relação há uma maior infiltração celular imunológica no microambiente tumoral, permitindo a angiogênese e o desenvolvimento desse carcinoma invasivo específico.

Consistente com essa hipótese, observamos nas mulheres com câncer de mama familiar que apresentaram menor frequência dos carcinomas invasivos, uma frequência estatisticamente significativa do genótipo variante *64I/64I* do *CCR2*, que é responsável por codificar um receptor de quimiocinas não funcional e, portanto, não atua de forma eficiente no recrutamento das células imunológicas que permitiriam maior invasão. Além disso, observou-se nessas mulheres, maior frequência do haplótipo *Wt/64I*, dos genes que codificam os receptores de quimiocinas, *CCR5* e *CCR2*. Isto poderia estar relacionado à menor presença de carcinomas invasivos neste grupo de mulheres, e a presença do genótipo *Wt/Wt*,

que codifica o receptor CCR5 completamente funcional, é que poderia estar relacionado ao recrutamento de células imunológicas nos carcinomas invasivos deste grupo. Por outro lado, acredita-se que o SNP rs1799864, do *CCR2*, possa ter um efeito dominante que interfere na função do *CCR5*. Sendo assim, a combinação haplotípica encontrada, nos sugere que apenas a variante *64I* tem influência no carcinoma de mama familiar. Porém, esta questão haplotípica das variantes dos receptores é ainda controversa. Em indivíduos com HIV, por exemplo, já se demonstrou que a variante rs1799864 não possui efeito na expressão do *CCR5* (Mariani *et al.*, 1999). De todo o modo, considerando nosso tamanho amostral, devemos ter cautela na interpretação.

Nossos dados, em relação às variantes e o carcinoma de mama, são corroborados, em parte, por um estudo realizado em 2004, por Zafiropoulos *et al.* (2004), que verificaram um efeito protetor da variante *64I* em homozigose e heterozigose para o carcinoma de mama esporádico, ou seja, o receptor não funcional conferiu proteção ao desenvolvimento da doença. Em contrapartida, outros estudos realizados com carcinoma cervical (Chatterjee *et al.*, 2010) e carcinoma de bexiga (Narter *et al.*, 2010), com o mesmo polimorfismo de nosso estudo, do *CCR2*, encontraram associação positiva da variante rs1799864 com o desenvolvimento dos carcinomas.

Sobre a variante polimórfica do *CCR5*, da mesma forma que em nosso estudo, o estudo de Zafiropoulos *et al.* (2004) não encontrou associação do alelo mutante nos carcinomas de mama comparado às mulheres saudáveis. No entanto, em um estudo realizado por Mañes *et al.* (2003), observou-se associação da expressão do *CCR5* com o carcinoma de mama, porém esta associação só ocorreu quando analisada de um modo dependente da proteína supressora tumoral p53. Os dados obtidos pelos autores sugerem que o alelo mutante apenas influenciou a progressão do carcinoma nos pacientes cujos tumores expressavam a proteína p53 selvagem (Mañes *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a variante do *CCR5* também foi analisada em relação à expressão da proteína p53, porém nenhuma associação foi encontrada.

Quando as mulheres de todos os grupos do estudo foram avaliadas para os genótipos e haplótipos, independente dos parâmetros clínicos, não se observou diferença estatisticamente significativa entre as mulheres saudáveis e com câncer de mama esporádico ou entre as mulheres com os diferentes carcinomas de mama. No entanto, quando as mulheres pertencentes ao grupo com câncer de familiar foram comparadas com as mulheres pertencentes ao grupo controle, observou-se maior frequência dos alelos selvagens dos polimorfismos rs1799864 e rs333, do *CCR2* e *CCR5*, respectivamente, e do haplótipo destes alelos combinados (*Wt*, *Val* e *Wt/Val*, respectivamente) entre as mulheres do grupo controle. Isto contradiz a hipótese que os receptores completamente funcionais poderiam favorecer o desenvolvimento da doença, porém alerta para a possibilidade que outros mecanismos possam estar atuando na regulação dos genes que codificam os receptores, fazendo com que, na presença do tumor esporádico estes receptores sejam superexpressos agindo de forma prejudicial. Uma forma de avaliar essa possibilidade seria a quantificação da expressão desses receptores nas células tumorais.

Ainda em relação aos tipos dos carcinomas mamários, observamos que mulheres com câncer de mama familiar apresentaram uma maior frequência de carcinoma bilateral. Estes achados estão de acordo com literatura, pois a bilateralidade é mais frequente em mulheres com carcinoma familiar. Quando há a presença de bilateralidade, geralmente suspeita-se de mutações nos genes de predisposição *BRCA1* e *BRCA2*, por ser considerada uma característica fenotípica prevalente e consequente das mutações nesses genes. O carcinoma de mama bilateral é relativamente raro em mulheres que não possuem as mutações nos genes de predisposição. Em nosso estudo, observamos apenas uma mulher com carcinoma de mama esporádico que apresentava bilateralidade, em contrapartida, doze das mulheres com carcinoma de mama familiar apresentaram esta característica. O carcinoma de mama bilateral pode ser sincrônico, detectado simultaneamente em ambas as mamas ou assincrônico, detectado após o diagnóstico de câncer da primeira mama afetada que pode ser de origem metastática. Geralmente a bilateralidade sincrônica é a mais frequente

nas mulheres portadoras das mutações nos genes de predisposição (Borg *et al.*, 2010).

Consistente com os dados obtidos pela avaliação do tipo histológico, verificamos que as mulheres com carcinoma de mama familiar, que apresentaram menor frequência de tumores invasivos, também apresentaram menor frequência de negatividade para os RPs. Geralmente os carcinomas de mama que não expressam esses receptores nas células tumorais são considerados mais invasivos e com pior prognóstico, pois refletem uma maior perda de diferenciação em relação às células normais da mama. Conseqüentemente, por possuírem carcinomas menos invasivos, as mulheres com câncer de mama familiar pertencentes ao nosso estudo utilizaram com maior frequência a radioterapia como modalidade terapêutica. A radioterapia é geralmente utilizada para o tratamento localizado da doença. As mulheres com carcinoma esporádico, pertencentes ao nosso estudo, utilizaram mais frequentemente como modalidade terapêutica, a quimioterapia que é um tratamento sistêmico.

Um dos achados mais interessantes de nosso estudo foi a relação da variante do gene *HLA-G*, rs1704 com a ausência dos RPs. Observamos que as mulheres com câncer de mama familiar que não expressam os RPs foram exclusivamente heterozigotas (+14pb/-14pb) para esta variante do *HLA-G*, enquanto as mulheres com carcinoma de mama esporádico, que não expressam esses RPs foram, na maioria, homozigotas para a deleção dos 14pb do gene *HLA-G* (-14pb/-14pb). Cabe ressaltar que apenas uma mulher, do total de mulheres com carcinoma de mama, apresentou homozigose para a inserção dos 14 pb (+14pb/+14pb) no gene *HLA-G* em conjunto com a característica de não expressão do RP.

Acredita-se que a deleção de 14 pb gera transcritos menos estáveis e, conseqüentemente, menor produção de moléculas de *HLA-G*. A molécula de *HLA-G* é conhecida por conferir resistência à lise pelas células NK e por inibir a atividade dos linfócitos T citotóxicos, além de modificar o balanço entre as citocinas do tipo Th1 e do tipo Th2, favorecendo o desenvolvimento de um

ambiente anti-inflamatório. Quando as moléculas de HLA-G são menos expressas, acredita-se que há um favorecimento da formação do ambiente pró-inflamatório que, no carcinoma de mama, está potencialmente associado à promoção do desenvolvimento tumoral.

A relação que encontramos com a expressão do HLA-G e a progesterona nos faz questionar se este hormônio estaria atuando, de alguma forma, na regulação do gene *HLA-G* nos carcinomas de mama, possibilitando a sua progressão. Ainda não se sabe ao certo, quais são os mecanismos que regulam a expressão do HLA-G. Em condições normais esta molécula é encontrada predominantemente expressa no trofoblasto da placenta, que produz grandes quantidades de progesterona. A progesterona também está presente nas mamas, sendo um dos responsáveis pelo desenvolvimento das células mamárias. Estas informações, juntamente com os achados de nosso estudo, nos sugerem que o *HLA-G* possa efetivamente ser regulado pela progesterona em mulheres. Esta hipótese é corroborada por um estudo realizado por Ye *et al.* (2006). Neste estudo, o objetivo foi verificar os efeitos da progesterona na expressão do HLA-G *in vitro* e, para isso, os autores utilizaram cultura de células de trofoblastos. A partir da análise destas culturas, os autores concluíram que a progesterona teve efeito na regulação do *HLA-G* e que este efeito foi dependente da quantidade do hormônio, o que sugere que este mecanismo possa também ocorrer *in vivo*, no caso de nosso trabalho, em células do carcinoma de mama (Ye *et al.*, 2006).

No entanto, os mecanismos pelos quais a progesterona regula o *HLA-G* e o sistema imunológico, ainda não são completamente conhecidos. Evidências sugerem que a progesterona, durante a gravidez, esteja envolvida em efeitos semelhantes àqueles promovidos pelo HLA-G no sistema imunológico, atuando na supressão da produção de linfócitos T, no bloqueio da atividade citotóxica dos linfócitos T e na redução da atividade das células NK (Ye *et al.*, 2005). Porém, se estes mesmos efeitos ocorrem nas células do carcinoma de mama, permanece por ser elucidado.

De forma parecida com a encontrada em nosso trabalho, um estudo realizado por Veit *et al.* (2008), com portadores de artrite juvenil idiopática (AJI), também verificou uma maior frequência do alelo *-14pb* da variante do *HLA-G* no grupo de mulheres com esta doença, quando comparadas com controles (Veit *et al.*, 2008). Com base nestes dados, os autores sugeriram um possível envolvimento da molécula *HLA-G* na doença no sexo feminino, possivelmente envolvendo regulação mediada por hormônios.

Cabe salientar que nossos achados não foram relacionados diretamente ao hormônio progesterona, e sim ao receptor deste hormônio. No entanto, sabe-se que para a progesterona atuar de forma eficiente é necessária a interação e ativação do seu receptor. Esta ativação ocorre através da ligação do receptor a uma sequência específica de DNA denominada elemento de resposta da progesterona (PRE). Isto nos leva a supor que o *HLA-G* possa ter alguma sequência que responda à progesterona e, da mesma forma, que permita a interação com o receptor. Ou seja, a progesterona poderia regular o *HLA-G* via receptor intracelular. Esta hipótese já foi testada pelo grupo de Ye *et al.* (2006), que encontraram uma sequência de 15 pb na região promotora do *HLA-G*, que contém um sítio de ligação específico para o RP.

No entanto, mais estudos são necessários para verificar os mecanismos exatos pelos quais os RPs podem interferir na região 3'UTR do *HLA-G*, onde encontra-se o polimorfismo rs1704. Aparentemente, a ausência do RP está relacionada a uma menor produção da molécula de *HLA-G*. Em conjunto, os dados sugerem um papel fundamental do *HLA-G* na regulação da resposta imunológica no carcinoma de mama.

Com relação à outra variante estudada do *HLA-G*, rs1063320, nenhuma relação foi encontrada com os parâmetros clínicos, o que nos sugere que este polimorfismo, ao menos nesta patologia, não possui relação com o desenvolvimento da doença. Do mesmo modo, os haplótipos do *HLA-G*, não mostraram nenhuma relação com o desenvolvimento do carcinoma de mama. Porém, este é o primeiro estudo que relaciona as duas variantes do *HLA-G*

(rs1063320 e rs1704) com o carcinoma de mama, portanto, estudos com maior número de amostras devem ser realizados para melhor investigação.

De modo geral, concluímos com nosso estudo que mulheres com carcinoma de mama esporádico apresentam os carcinomas em idade mais elevada e, de forma mais agressiva, que as mulheres com carcinoma de mama familiar. As variantes estudadas, rs1704 do *HLA-G* e rs1799864 do *CCR2*, mostraram relação positiva com a agressividade tumoral nessas mulheres. Mulheres com carcinomas mais agressivos apresentam mais frequentemente as variantes gênicas associada com o receptor CCR2 mais eficiente e com uma menor produção de HLA-G dependente da ausência dos RPs. Assim, é possível inferir que estes achados estejam associados a maior infiltração de células imunológicas no tumor, via CCR2, e da mesma forma, maior estímulo da criação de um microambiente inflamatório, via HLA-G; que possivelmente auxiliam a formação da neovascularização, proporcionando ao tumor a capacidade de tornar-se mais agressivo e conseqüentemente invasivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH e Pillai S (2008) *Imunologia celular e molecular*. 6ª edição. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, pp 3-17.

Abramsom JH (2004) WINPEPI (PEPI-for Windows): computerprograms for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 1:6.

Abreu E e Koifman S (2002) Fatores prognósticos no câncer de mama feminina. *Rev Bras Cancerol* 48:113-131.

Algarra I, García-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F and Garrido F (2004) The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 53:904-910.

Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, Schmutzler RK, Versmold B, Engel C, Meindl A, Arnold N, et al. (2008) Common breast cancer predisposition alleles are associated with breast cancer risk. *Am J Hum Genet* 82:937-948.

Barros ACSD, Barbosa EM e Gebrim LH (2001) Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina 1-15.

Berz D and Wanebo H (2011) Targeting the growth factors and angiogenesis pathways: small molecules in solid tumors. *J Surg Oncol* 103: 574-586.

Borg A, Haile RW, Malone KE, Capanu M, Diep A, Törngren T, Teraoka S, Begg CB, Thomas DC, Concannon P, et al. (2010) Characterization of *BRCA1* and *BRCA2* deleterious mutations and variants of unknown clinical significance in unilateral and bilateral breast cancer: The WECARE study. *Hum Mutat* 31:1200-1240.

Borroni EM, Mantovani A, Locati M and Bonecchi R (2010) Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacol Ther* 127:1-8.

Buitrago F, Uemura G e Sena MCF (2011) Fatores prognósticos em câncer de mama. *Comun Ciênc Saúde Supl* 1:S69-82.

Caleffi M, Ribeiro RA, Filho DLD, Ashton-Prolla P, Junior AJB, Skoniesky PG, Zignani JM, Giacomazzi J, Franco LR, Graudenz M, et al. (2009) A model to optimize public health care and downstage breast cancer in limited-resource

populations in southern Brazil (Porto Alegre breast health intervention cohort). BMC Pub Health 9:83.

Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P and Lemaoult J (2008) Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. Blood 111:4862-4870.

Cao M, Yie SM, Liu J, Ye SR, Xia D and Gao E (2011) Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. Tissue Antigens 78:120-128.

Chatterjee K, Dandara C, Hoffman M, Williamson AL (2010) *CCR2-V64I* polymorphism is associated with increased risk of cervical cancer but not with HPV infection or pre-cancerous lesions in African women. BMC Cancer 10:278.

Chies JA and Hutz MH (2003) High frequency of the *CCR5delta32* variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. Braz J Med Biol Res 36:71-75.

Choi W and An J (2011) Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. Exp Biol Med 236:637-647.

Cichon MA, Degnim AC, Visscher DW and Radisky DC (2010) Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia 15:389-397.

Ciprandi G, Contini P, Murdaca G, Gallina AM and Puppo F (2009) Soluble HLA-G molecule in patients with perennial allergic rhinitis. Int Arch Allergy Immunol 150: 278-281.

Consiglio CR, Veit TD, Monticelio OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC and Chies JA (2011) Association of the *HLA-G* gene +3142 C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. Tissues Antigens 77:540- 545.

Davidson B, Elstrand MB, McMaster MT, Berner A, Kurman RJ, Risberg B, Trope CG and Shih I (2005) HLA-G expression in effusions is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. Gynecol Oncol 96:42-47.

De Jong MM, Nolte IM, Te Meerman GJ, Van Der Graaf WTA, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M and De Vries EGE (2002) Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. J Med Genet 39:225-242.

Degerli N, Yilmaz E and Bardakci F (2005) The $\Delta 32$ allele distribution of the *CCR5* gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population. *Clin Biochem* 38:248-252.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S and Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *J Interferon Cytokine Res* 29:313-326.

Dougan M and Dranoff G (2009) Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 23:83-117.

Fabris A, Segat L, Catamo E, Morgutti M, Vendramin A and Crovella S (2010) *HLA-G* 14 pb deletion/insertion polymorphism in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 106:139-144.

Foresti ML, Arisi GM, Katki K, Montañez A, Sanchez RM and Shapiro LA (2009) Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *J Neuroinflammation* 6:40.

Goldman M and O'Hair K (2009) A review of the gynecologic effects of breast cancer. *Obstet Gynecol Surv* 64:469-480.

Guyton AC, Hall JE (2002) *Tratado de fisiologia médica*. 10ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 790-809.

Hanahan D and Weinberg R (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.

Instituto nacional do câncer (INCA), tipos de câncer, <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama> (15 de setembro de 2011).

Instituto nacional do câncer (INCA), incidência de câncer de mama no Brasil, <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/> (7 de abril de 2012).

Instituto nacional do câncer (INCA), detecção precoce do câncer de mama, http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1932 (20 de junho de 2012).

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, et al. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65:7065-7070.

Iorio MV, Casalini P, Tagliabue E, Ménard S and Croce CM (2008) MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *Eur J Cancer* 44:2753-2759.

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R and Weinberg, RA (2007) Mesenchymal stem cell within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557-565.

Kleinberg L, Florenes VA, Skrede M, Dong HP, Nielsen S, McMaster MT, Nesland JM, Shih I and Davidson B (2006) Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. *Virchows Arch* 449:31-39.

Korkola J, Devries S, Fridlyand J, Hwang ES, Estep ALH, Chen Y, Chew KL, Dairkee SH, Jensen RM and Waldman FM (2003) Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res* 63:7167-7175.

Lemaoult J, Rouas-Freiss N and Carosella ED (2005) Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. *Autoimmun Rev* 4:503-509.

Liang L, Hu D, Liu W, Williams J P, Okunieff P and Ding I (2003) Celecoxib reduces skin damage after radiation. *Am J Clin Oncol* 26:114-121.

Luo J, Solimini NL and Elledge SJ (2009) Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136:823-837.

Luijsterburg MS and Attikum HV (2011) Chromatin and the DNA damage response: the cancer connection. *Mol Oncol* 5:349-367.

Ma CX, Janetka JW and Piwnica-Worms H (2011) Death by releasing the breaks: CHK1 inhibitors as cancer therapeutics. *Trends Mol Med* 17:88-96.

Mabuka JM, Mackelprang RD, Lohman-Payne B, Majiwa M, Bosire R, John-Stewart G, Rowland-Jones S, Overbaugh J and Farquhar C (2009) *CCR2-64I* polymorphism is associated with lower maternal HIV-1 viral load and reduced vertical HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 51:235-237.

Majdak-Paredes EJ and Fatah F (2008) Hereditary breast cancer syndromes and clinical implications. *J Plastic Reconstr Aesthet Surg* 62:181-189.

Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gómez-Mountón C, Jiménez-Baranda S, Garzón A, Lacalle RA, Harshman K, et al. (2003) *CCR5* expression influences the progression of human breast cancer in a p-53-dependent manner. *J Exp Med* 198:1382-1389.

Mariani R, Wong S, Mulder LC, Wilkinson DA, Reinhart AL, LaRosa G, Nibbs R, O'Brien TR, Michael NL, Connor RI, et al. (1999) *CCR2-64I*

polymorphism is not associated with altered CCR5 expression or coreceptor function. *J Virol* 73:2450-9.

Maynard S, Schurman SH, Harboe C, Souza-Pinto NC and Bohr VA (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30:2-10.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D and Futreal PA (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility: gene *BRCA-1*. *Science* 266:66-71.

Ministério Da Saúde (2004) Controle do câncer de mama: documento de consenso. *Rev Bras Cancerol* 50:77-90.

Mohammed RAA, Ellis IO, Lee AHS and Martin SG (2008) Vascular invasion in breast cancer; an overview of recent prognostic developments and molecular pathophysiological mechanisms. *Histopathology* 55:1-9.

Molino A, Giovanninni M, Micciolo R, Auriemma A, Fiorio E, Santo A and Cetto GL (2008) Bone marrow micrometastases in breast cancer patients: a long-term follow-up study. *Clin Med Oncol* 2:487-490.

Muschler J and Streuli CH (2010) Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003202.

Muntinghe FLH, Abdulahad WH, Huitema MG, Damman J, Seelen MA, Lems SPM, Hepkema BG, Navis G and Westra J (2012) *CCR5/132* genotype leads to a Th2 type directed immune response in ESRD patients. *PLoS One* 7:e31257.

Narter KF, Agachan B, Sozen S, Cincin ZB, Isbir T (2010) *CCR2-64I* is a risk factor for development of bladder cancer. *Genet Mol Res* 9:685-692.

Nath A, Chattopadhyaya S, Chattopadhyaya U and Sharma NK (2006) Macrophage inflammatory protein (MIP) 1 α and MIP1 β differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 55:1534-1541.

Navratilova Z (2006) Polymorphisms in *CCL2&CCL5* chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150:191-204.

Offit K (1998) Clinical cancer genetics: risk counseling and management. 1^a edition. Publisher Wiley-Liss pp 1-38, 66-114.

Ohgaki H and Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* 100:2235-2241.

Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, Wallace DM, Deshmukh N, Chaudhri S, Adams DH and Lee SP (2012) T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *Eur Urol* 61:385-394.

Palacios J, Robles-Frías MJ, Castilla MA, López-García MA and Benítez J (2008) The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology* 75:85-94.

Palmisano GL, Pistillo MP, Fardin P, Capanni P, Nicolò G, Salvi S, Spina B, Pasciucco G and Ferrara GB (2002) Analysis of HLA-G expression in breast cancer tissues. *Hum Immunol* 63:969-976.

Pieta B, Chmaj-Wierzchowska K and Opala T (2012) Life style and risk of development of breast and ovarian cancer. *Ann Agric Environ Med* 19:379-384.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, et al. (2010) Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 12:207.

Rich EC, Burke W, Heaton CJ, Haga S, Pinsky L, Short P and Acheson L (2004) Reconsidering the family history in primary care. *J Gen Intern Med* 19:273-280.

Rinke R, Peres A, Machado MB e Chies JAB (2006) Doença inflamatória intestinal – uma abordagem imunogenética. *Ciênc Mov* 15:19-25.

Robinson SC, Scott KA, Wilson JL, Thompson RG, Proudfoot AEI and Balkwill FR (2003) A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res* 63:8360-8365.

Rousseau P, Discorde ML, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED and Moreau P (2003) The 14pb deletion-insertion polymorphism in the 3'UT region of the *HLA-G* gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 64:1005-1010.

Salcedo R, Ponce ML, Young RA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ and Murphy WJ (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96:30-40.

Sanpaolo P, Barbieri V and Genovesi D (2011) Prognostic value of breast cancer subtypes on breast cancer specific survival, distant metastases and local relapse rates in conservatively managed early stage breast cancer: a retrospective clinical study. *Eur J Surg Oncol* 10:876-882.

Shi M and Guo N (2009) MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 35:328-334.

Singer G, Rebmann V, Chen Y, Liu H, Ali SZ, Reinsberg J, McMaster MT, Pfeiffer K, Chan DW, Wardelmann E, et al. (2003) HLA-G Is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 9:4460-4464.

Strumylaite L, Mechonosina K and Tamasauskas S (2010) Environmental factors and breast cancer. *Medicina (Kaunas)* 46:867-873.

Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Lin P, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae D, et al. (2007) Allele-specific targeting of microRNAs to *HLA-G* and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 81:829-834.

Tsai H, Yang S and Chen D (2012) CCL5-28, CCL5-403, and *CCR5* genetic polymorphisms and their synergic effect with alcohol and tobacco consumptions increase susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 29:2771-2779.

Tsuda T (2009) Gene and chromosomal alterations in sporadic breast cancer: correlation with histopathological features and implications for genesis and progression. *Breast Cancer* 16:186-201.

Turnbull C and Rahman N (2008) Genetic predisposition to Breast Cancer: past, present and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:321-345.

Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL and Weinberg RA (2009) A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137:1032-1046.

Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol C, Brenol JCT, Xavier RM, Delgado-Cañedo A, Gutierrez J, Brandalize APC, Schuler-Faccini L, et al. (2008) Association of the *HLA-G* 14pb insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 71:440-446.

Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FCL and Zeferino LC (2008) Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Rev Bras Ginecol Obstet* 30:42-47.

Vousden KH and Ryan KM (2009) P53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* 9:691-700.

Weigel MT and Dowsett M (2010) Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 17:245-262.

Woelfle U, Cloos J and Sauter G (2003) Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63: 5679-5684.

Wolin KY, Carson K and Colditz GA (2010) Obesity and cancer. *Oncologist* 15:556-565.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, et al. (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q 12-13. *Science* 265: 2088-2090.

Ye S, Li L, Li G, Xiao R and Librach CL (2005) Progesterone enhances *HLA-G* gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts *in vitro*. *Hum Reprod* 21:46-51.

Ye S, Xiao R and Librach CL (2006) Progesterone regulates *HLA-G* gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod* 21:2538-2544.

Ye S, Yang H, Li K, Dong D, Lin X and Yie S (2007) Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol* 20:375-383.

Zafiroopoulos A, Crikas N, Passam AM and Spandidos DA (2004) Significant involvement of *CCR2-64I* e *CXCL12-3a* in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 41:e59.

Zhang J, Patel L and Pienta KJ (2010) Targeting chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) as an example of translation of cancer molecular biology to the clinic. *Prog Mol Biol Transl Sci* 95:31-53.

Zhao Q (2010) Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 88:41-55.

Zlotnik A (2006) Chemokines and cancer. *Int J Cancer* 119:2026-2029.

7. ANEXOS

ANEXO 1. Carta de Aprovação do CEP



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110572

Data da Versão do Projeto: 01/11/2011

Data da Versão do TCLE: 27/12/2011

Pesquisadores:

JOSÉ ARTUR BOGO CHIES
CÍNTIA DE OLIVEIRA GIONGO
PATRICIA ASHTON PROLLA

Título: Caracterização imunogenética de variantes dos genes CCR2, CCR5 e HLA-G como potenciais alvos para diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de mama esporádico e hereditário

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 29 de dezembro de 2011.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO 2. Termo de Compromisso

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para a Utilização de Dados

Título do Projeto:

“Caracterização imunogenética de variantes dos genes CCR2, CCR5 e HLA-G como potenciais alvos para terapia e controle da progressão do câncer de mama feminino.”

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

Nome dos pesquisadores	Assinatura

ANEXO 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Caracterização imunogenética de variantes dos genes *CCR2*, *CCR5* e *HLA-G* como potenciais alvos para diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de mama esporádico e hereditário”

Justificativa e Objetivos da Pesquisa: O Câncer de Mama acomete, ao longo de toda a vida, cerca de uma a cada dez mulheres em nosso meio, e sua detecção precoce é muito importante porque aumenta as chances de cura da doença. Atualmente, acredita-se que características genéticas individuais (chamadas polimorfismos em genes de suscetibilidade) podem aumentar ou diminuir as chances de uma pessoa ter câncer de mama independente de outros fatores de risco, como por exemplo, a história de câncer na família. O conhecimento do perfil e da distribuição destes polimorfismos em nosso meio poderá auxiliar o entendimento de fatores de risco, de causa da doença e auxílio no prognóstico de cada pessoa. Este é um estudo que será feito em mulheres que possuem o diagnóstico de câncer de mama esporádico e familiar. Ele tem como objetivo avaliar se há variações genéticas nestas mulheres, e se estas variações podem interferir na progressão e prognóstico de câncer de mama. Inicialmente será estudada uma região específica do DNA de cada paciente. Posteriormente poderão ser estudadas outras regiões que também contribuam para o melhor entendimento de fatores de risco em câncer de mama.

Procedimentos e Riscos ou Desconfortos Potenciais: As informações sobre os fatores de risco para o câncer de mama esporádico serão obtidas através de um questionário de risco e do seu prontuário, existente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). Para o estudo das características genéticas será coletada uma pequena amostra de seu sangue (10 ml), em dois frascos. As amostras serão analisadas no centro de pesquisas do HCPA e no Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). No momento da coleta poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e normalmente de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por pessoas especialmente treinadas para este fim, o que diminui as chances de complicações.

Benefícios esperados: Nós ainda não sabemos se estas variações genéticas realmente tem alguma importância sobre o risco de câncer de mama em mulheres do Rio Grande do Sul, e se tais variações podem influenciar no prognóstico do mesmo. É justamente por isso que estamos desenvolvendo esta pesquisa. Este trabalho poderá ou não beneficiar sua família futuramente. Este benefício provavelmente não será direto a sua pessoa, pois é um estudo inicial cujos resultados deverão ser confirmados posteriormente, em uma análise com muitas mulheres adicionais. Caso algum resultado deste estudo seja importante para você ou sua família, todo o esforço será feito no sentido de informá-los.

Você tem o direito de recusar-se a participar deste projeto e isto não afetará de nenhuma maneira o seu cuidado ou de seus familiares, no HCPA ou NMPOA. Não haverá nenhum custo associado aos exames laboratoriais realizados durante a pesquisa.

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Eu concordo em realizar a análise genética e aceito os riscos. Eu entendo a informação fornecida por este documento e eu tive a oportunidade de esclarecer dúvidas sobre o projeto de pesquisa.

Nome e Assinatura do Paciente

Local e Data

Nome e Assinatura do Pesquisador

Local e Data

Pesquisadores responsáveis: Dra. Patrícia Ashton-Prolla, Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize, Dr. José Artur Bogo Chies, Mestranda Cíntia de Oliveira Giongo.

Laboratório de Medicina Genômica – HCPA – (51) 3359-7661
Laboratório de Imunogenética da UFRGS – (51) 33086737