

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Giovana Bozelo

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE DA
INTERLEUCINA 10 NO CÂNCER DE MAMA**

Florianópolis

2019

Giovana Bozelo

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE DA
INTERLEUCINA 10 NO CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado como requisito para cumprimento da disciplina TCC II (BIO7016) do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Dal-RiLindenau.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bozelo, Giovana

Avaliação da influência de polimorfismos no gene da interleucina 10 no câncer de mama / Giovana Bozelo ; orientadora, Juliana Dal-Ri Lindenau, 2019.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Genética. 3. Câncer de mama. 4. Interleucina 10. 5. Polimorfismos. I. Lindenau, Juliana Dal-Ri. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Giovana Bozelo

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE DA
INTERLEUCINA 10 NO CÂNCER DE MAMA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para o cumprimento da disciplina TCCII (BIO7016) e aprovado em sua forma final pela Banca Examinadora.

Florianópolis, 05 de julho de 2019.

Prof. Carlos Roberto Zanetti, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Juliana Dal-RiLindenau, Dra.
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Norma Machado da Silva, Dra.
Membro Titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Mari Dalva Staffen, MSc.
Membro Titular
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Ilíada Rainha de Souza, Dra.
Membro Suplente
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais, minhas irmãs e meu namorado, por me darem todo apoio para tornar esse sonho possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho. À Universidade Federal de Santa Catarina, da qual me orgulho de ter estudado e me permitiu cursar a Graduação em Ciências Biológicas – Licenciatura. Aos excelentes professores que tive a oportunidade de conhecer e aprender com eles.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo financiamento de minha bolsa de iniciação científica e pelos financiamentos dos projetos de pesquisa desenvolvidos no LAPOGE (Laboratório de Polimorfismos Genéticos).

À minha orientadora, Dr^a Juliana Dal-Ri Lindenau, pela oportunidade de estar realizando este trabalho e por tudo que venho aprendendo com ela e toda a sua paciência para me ensinar. Ela, juntamente com as demais professoras do laboratório, são pessoas as quais admiro muito.

À professora Dr^a Yara Costa Netto Muniz, por toda contribuição e ajuda quando eu e minha orientadora precisamos.

Agradeço aos membros da banca, professora Dr^a Norma Machado, a doutoranda Mari Dalva Staffen e a professora Dr^a Ilíada Rainha de Souza por terem aceitado o convite e por contribuírem com este trabalho.

Agradeço enormemente a todos os membros do LAPOGE que me auxiliaram prontamente sempre que eu precisava e por todos os ensinamentos. Principalmente as doutorandas Clisten Fátima Staffen, Mari Dalva Staffen e Leandra Formentão, que são pessoas mais que especiais, que estavam sempre dispostas a me ajudar ensinar e sempre foram muito queridas. E também a colega de estágio Iara Caroline, pelos cafés, conversas e momentos coletivos de tristeza, quando as amostras não amplificavam.

Às mulheres que participaram do estudo, tanto as pacientes com o diagnóstico de câncer de mama, quanto as que não possuem o diagnóstico para a doença, que possibilitaram que diversos estudos como este fossem realizados.

Agradeço a toda minha família, meu pai Luiz Carlos, minha mãe Joselane, minhas irmãs Fernanda e Rafaela, as minhas avós Alzira e Terezinha e meu avô João Batista, pois sem eles não estaria aqui, por todo apoio dado, por acreditarem em mim e por todo o cuidado, carinho e amor que nunca faltaram.

Ao meu namorado Augusto, por estar sempre ao meu lado, me apoiar, independente da situação, me ajudar todas as vezes que precisei, acreditar em mim e ser meu companheiro de vida.

Agradeço também aos meus amigos de graduação, principalmente a Jéssica Andriotti, que foi essencial nesses últimos anos de graduação, sendo a melhor parceira para trabalhos, risadas e conversas.

Às minhas colegas de apartamento, pelos excelentes anos de convívio e amizade.

RESUMO

O câncer de mama (CM) é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres de todo o mundo, atrás somente do câncer de pele não melanoma, sendo também a maior causa de morte por câncer entre mulheres. A interleucina10 (IL-10) é uma citocina capaz de atuar em muitas vias de resposta imune, portanto, pode estar envolvida na carcinogênese mamária. Entretanto, as associações entre polimorfismos no gene da IL-10, o risco de desenvolvimento de CM eo quadro clínico da doença ainda são inconsistentes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo verificar a influência de variantes no gene da IL-10, nas posições -819(rs1800871) e -592(rs1800872), e os haplótipos formados, com suscetibilidade e características clinicopatológicas do CM em uma população brasileira. Foram analisadas 197 amostras de DNA genômico, sendo 148 pacientes com CM e 49 sem o diagnóstico da doença (controles). A genotipagem dos SNPs -819 e -592 foi realizada por PCR-SSP Multiplex e verificada por eletroforese em gel de agarose. O tempo de amamentação foi associado ao CM, com $p=0,025$, sendo que pacientes tiveram um tempo de amamentação menor do que as controles. Outros resultados se mostraram próximos à significância estatística, como o hábito tabagista, onde observamos maior percentual de mulheres fumantes e ex-fumantes no grupo caso em comparação ao controle ($p=0,088$), o que pode sugerir que o tabagismo é um fator de risco para o CM. O haplótipo categorizado em nível de expressão da IL-10 também apresentou um valor de p próximo ao significativo ($p=0,076$) nas análises de casos x controles, sendo que a maioria das mulheres controles apresentou o haplótipo de baixa e intermediária expressão da IL-10, uma tendência que pode sugerir que, baixa e média expressão seriam protetoras para CM. Outra característica que chamou atenção, porém não observamos um valor de p significativo, foi o número de parentes de 1º grau com CM, onde o grupo caso apresentou um percentual maior de parentes de primeiro grau que manifestaram a doença em comparação a mulheres do grupo controle, o que vai ao encontro com dados da literatura. Em relação às características clínicas das mulheres com CM, o IMC categorizado de acordo com os padrões internacionais, apresentou uma associação significativa ($p=0,014$), sendo que a maioria das mulheres com haplótipos de baixa e média expressão encontravam-se no grupo sobrepeso e com haplótipos de alta expressão encontravam-se no grupo eutrófico, indicando a IL-10 como um dos possíveis fatores que influenciam no peso corporal. Portanto, esse trabalho demonstrou que os haplótipos da IL-10 têm um papel na suscetibilidade e no quadro clínico e patológico do CM na população brasileira.

Palavras-chave: Região promotora. *IL-10*. Citocinas. Neoplasia mamária. Tumor. SNPs.

ABSTRACT

The breast cancer is the second most prevalent cancer in women around the world and it is the main factor responsible for deaths due to cancer in women. The interleukin 10 (IL-10) is a main cytokine that is able to act in several immune response views and it should be related to breast carcinogenesis. However, associations between polymorphisms in IL-10 gene and susceptibility to breast cancer, or its clinical characteristics, are still inconsistent. In this sense, this study aimed to verify the influence of variants in IL-10 gene promoter region and susceptibility to breast cancer or its clinical characteristics in a Brazilian population. It was analyzed two polymorphisms named -819 (rs1800871) and -592 (rs1800872) and the haplotypes derived by them in 197 women, being 148 breast cancer patients and 49 women without the disease. Polymorphisms were genotyped by PCR-SSP Multiplex and the results were viewed in agarose electrophoresis gel. Breastfeeding was associated with breast cancer susceptibility ($p=0.025$) since it was observed a short breastfeeding time in patients than controls. Several analyses showed a p-value close to significance. The analysis comparing cases and controls in relation to smoking habits showing more smoking or ex-smoking women in breast cancer group than in control one ($p=0.088$). When the haplotypes derived by the variants were categorized in relation to IL-10 expression level, it was observed that the majority of women in control group showed haplotypes of low or intermediate IL-10 expression ($p=0.076$). It may suggest that high IL-10 levels can be related to susceptibility to breast cancer. Another highlighted characteristic observed in this comparison was the number of first grade relatives with breast cancer. The case group showed a higher prevalence of affected relatives in comparison with the control group, as demonstrated by literature data. Analyzing the clinical characteristics of breast cancer group, it was observed a relation between IL-10 haplotypes and IMC categorized according with international patterns ($p=0.014$). Women with low or intermediate expression haplotypes were more prevalent in overweight group while women with high expression haplotypes were more prevalent in eutrophic group, showing an IL-10 role in body weight. Therefore, this study demonstrated that IL-10 haplotypes has a role in the susceptibility to breast cancer and its clinical and pathological characteristics in a Brazilian population.

Keywords: Promoter region. IL-10. Cytokines. Breast cancer. Tumor. SNPs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do tecido mamário normal.	17
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura da região promotora do gene IL-10, contendo os SNPs, presente no cromossomo 1.	22
Figura 3 - Esquema do método PCR-SSP multiplex.	29
Figura 4 - Representação do gel de agarose, com diferentes amostras de DNA. Visualização das bandas -819 e -592.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de primers, temperatura de anelamento e tamanho da amplificação para o locus único PCR-SSP.....	28
Tabela 2 - Classificação dos haplótipos de acordo com nível de expressão dos alelos.....	31
Tabela 3 - Agrupamento por estádios.....	32
Tabela 4 - Classificação do câncer segundo o perfil imuno-histológico.....	32
Tabela 5 - Frequências alélicas dos polimorfismos da IL-10 para os grupos câncer de mama (CM) e controle, além de diferentes etnias.....	34
Tabela 6 - Caracterização das amostras e comparação das variáveis contínuas entre casos e controles.....	35
Tabela 7 - Comparação casos e controles para as variáveis categóricas analisadas.....	36
Tabela 8 - Classificação do câncer.....	37
Tabela 9 - Análises de associação dos haplótipos com dados clínicos das pacientes com câncer de mama.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alelo adenina
A	Amperagem
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos, do inglês <i>Antigen-Presenting Cells</i>
<i>BRCA1</i>	Câncer de mama 1 início precoce, do inglês <i>Breast Cancer 1, early on set</i>
<i>BRCA2</i>	Câncer de mama 2 início precoce, do inglês <i>Breast Cancer 2, early on set</i>
C	Alelo citosina
CEPSH-UFSC	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina
CEU	Residentes de Utah com ancestralidade Européia
CM	Câncer de Mama
CSIF	Fator Inibidor da Síntese de Citocinas, do inglês <i>Cytokine Synthesis Inhibitory Factor</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
et al.	“e outros”, do latim <i>et alii</i>
G	Alelo guanina
<i>Her-2</i>	Fator de Crescimento Epidérmico Humano Receptor 2, do inglês <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
IFN	Interferon
IL-10	Citocina Interleucina-10
<i>IL-10</i>	Gene <i>Interleucina-10</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Kb	Kilobase
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LD	Desequilíbrio de ligação, do inglês, <i>Linkage Disequilibrium</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mM	Mili Molar
NK	Nome dado a célula, sem tradução para o português, do inglês <i>Natural Killer</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-SSP	Reação em Cadeia da Polimerase – Sequência Primer Específico, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction – Sequence- Specific Primers</i>
q	Braço longo, do francês <i>queue</i> =cauda
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
s	Tempo em Segundos
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único, inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Alelo timina
Ta(°C)	Temperatura de Anelamento em grau Celsius.
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TNFα</i>	Fator de Necrose Tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNM	Sistema de classificação (T: tumor primário; N: número de linfonodos; M: metástase)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
μ L	Microlitro
V	Voltagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	CÂNCER	15
1.2	CÂNCER DE MAMA.....	15
1.3	SISTEMA IMUNE.....	17
1.4	RESPOSTAS IMUNES.....	18
1.5	CITOCINAS	20
1.6	INTERLEUCINA 10.....	20
1.7	CÂNCER DE MAMA E IL-10.....	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	27
4.2	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	27
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS.....	34
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Tumor ou neoplasia ocorre quando uma massa celular tem proliferação anormal, sendo que diversos fatores genéticos e ambientais podem estar envolvidos em seu surgimento. Os tumores podem ser benignos (quando têm crescimento de forma organizada, apresentam limites bem nítidos e não apresentam risco de metástase) ou malignos (quando têm crescimento de forma desordenada, causando danos e prejuízos funcionais e ocorre ou há risco de metástase) (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015; INCA, 2019a).

Metástases ocorrem quando células cancerígenas são capazes de proliferar e invadir tecidos adjacentes, espalhando-se para outros órgãos (OMS, 2018a; INCA, 2019b). Os tumores com essa capacidade passam a ser chamados de cânceres (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015; INCA, 2019a).

Portanto, câncer é um conjunto de mais de 100 doenças, que tem em comum o crescimento desordenado de células que são capazes de metastatizar (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015; INCA, 2019b). Os cânceres podem se desenvolver em qualquer parte do corpo, e os vários tipos de câncer são classificados de acordo com a localização primária do tumor. No caso do câncer de mama, a origem é no tecido mamário (INCA, 2018a).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema grave de saúde, sendo a segunda principal causa de morte nas Américas (OPAS, 2019; OMS, 2019). Em 2018, 1,3 milhões de pessoas morreram por câncer nas Américas e 3,7 mil novos casos da doença foram identificados (correspondendo a 21% dos casos mundiais) (OPAS, 2019). O câncer foi responsável por 18% das mortes na população brasileira em 2016 (OMS, 2018b). A estimativa de novos casos de câncer em 2018 para Santa Catarina foi de 11.380, uma taxa de 391,96 novos casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2017).

1.2 CÂNCER DE MAMA

Após o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama (CM) é o segundo câncer mais comum em mulheres em todo o mundo (INCA, 2019c), atingindo 1,5 milhões de mulheres todos os anos, sendo a maior causa de morte de mulheres (OMS, 2019). A estimativa de novos casos de câncer de mama em mulheres brasileiras foi de 59.700, para o

ano de 2018 (INCA, 2019c). A estimativa para Santa Catarina foi de 2.190 novos casos para 2018, uma taxa de 61,92 a cada 100 mil habitantes. Em Florianópolis, 200 casos de câncer de mama foram estimados para 2018, gerando uma taxa de 81,86 novos casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2017).

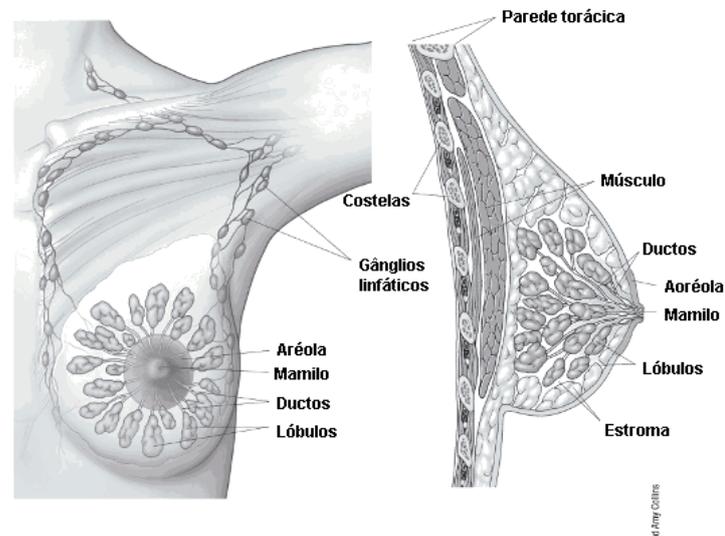
Antes dos 35 anos de idade, a prevalência de câncer de mama é baixa. Essa prevalência tende a crescer de forma progressiva a partir dessa idade, aumentando bastante principalmente após os 50 anos. Não há uma causa única para esse câncer, uma vez que diversos fatores podem influenciar no aparecimento da doença como fatores endócrinos, história reprodutiva, idade, excesso de peso, fatores comportamentais, ambientais e genéticos (hereditários) (INCA, 2019c; INCA, 2019d).

Como exemplo de fatores endócrinos, temos que quanto maior a exposição aos hormônios estrogênio e progesterona (podendo ser endógenos ou exógenos), maiores são os riscos de desenvolver câncer de mama, principalmente após a menopausa. Fatores genéticos estão relacionados principalmente a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* nos casos de cânceres hereditários, porém outros genes também podem estar associados. Os fatores genéticos são responsáveis por 5% a 10% dos casos de câncer não familiares (INCA, 2019c; INCA, 2019d).

O câncer de mama tem início quando um grupo de células mamárias começa a ter crescimento descontrolado, formando um tumor. Estas células podem crescer e invadir outros tecidos próximos ou, ainda, espalham-se para outras partes do corpo mais distantes, gerando metástase (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Sua classificação ocorre de acordo com o tecido no qual ele tem início, sendo os tipos mais prevalentes o câncer ductal (tipo mais comum, quando inicia no ducto que transporta leite até o mamilo) e câncer lobular (que tem início nas glândulas que produzem leite); ainda podem começar em outros tecidos da mama, porém estes são menos comuns. A figura 1 mostra o tecido mamário, demonstrando as diferentes regiões passíveis de surgimento de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Figura1- Representação esquemática do tecido mamário normal.



Fonte: adaptado de AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019.

Sabe-se que o sistema imunológico tem influência direta no surgimento e curso clínico do câncer de mama, entretanto o mecanismo biológico envolvido na sua fisiopatologia ainda não está completamente compreendido (SMYTH, CRETNEY, KERSHA, 2004).

1.3 SISTEMA IMUNE

Imunidade relaciona-se com proteção contra doenças, principalmente contra aquelas causadas por agentes infecciosos, e está relacionada com uma série de células e moléculas que evoluíram para compor o chamado sistema imune. Resposta imune é a denominação dada à ação coordenada dessas células e moléculas quando confrontadas por moléculas estranhas (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

O sistema imune tem como função fisiológica defender o organismo contra agentes infecciosos. Entretanto, substâncias estranhas não infecciosas podem gerar respostas imunes, assim como, alguns mecanismos de defesa contra infecções e para eliminação de substâncias estranhas são capazes de causar algum grau de lesão tecidual e em algumas situações, desencadear doenças (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015). O desenvolvimento dessas doenças pode estar relacionado a fatores tanto genéticos, quanto ambientais (DEANE & EL-GABALAWY, 2014).

1.4 RESPOSTAS IMUNES

Inicialmente a defesa contra agentes estranhos é mediada por reações da imunidade inata e posteriormente por respostas da imunidade adaptativa. As respostas, inata e adaptativa, atuam em conjunto e compõem um sistema integrado de defesa, onde diversas e numerosas moléculas e células cooperam entre si para a defesa do hospedeiro (CRUVINEL, MESQUITA JÚNIOR e ARAÚJO, 2010; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

A imunidade inata oferece a primeira defesa contra microrganismos, gerando uma resposta rápida a um grande, mas limitado número de estímulos. Constitui-se em mecanismos de defesa físicas, químicas, biológicas e celulares que estão ativos mesmo antes de uma infecção, estando preparados para uma resposta imediata contra infecções (CRUVINEL, MESQUITA JÚNIOR e ARAÚJO, 2010; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Os mecanismos da resposta imune inata são próprios para estruturas comuns a grupos relacionados de microrganismos e não são capazes de distinguir as diferenças entre os diferentes tipos de microrganismos. A imunidade inata tem como principais componentes barreiras químicas e físicas, e suas principais células efetoras são células fagocíticas, dendríticas, natural killer (NK) e linfóides, e proteínas sanguíneas (CRUVINEL, MESQUITA JÚNIOR e ARAÚJO, 2010; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação das células especializadas, os linfócitos, sendo estimulada pela exposição a agentes infecciosos, ela desenvolve uma resposta à infecção adaptando-se à mesma. A imunidade adaptativa aumenta a capacidade de defesa nas exposições subsequentes de microrganismos específicos através da formação da memória imunológica. Esse tipo de resposta reage a um amplo número de substâncias tanto microbianas quanto não microbianas (CRUVINEL, MESQUITA JÚNIOR e ARAÚJO, 2010; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

A imunidade adaptativa age por especificidade em resposta aos microrganismos distinguindo-os e preparando uma ação específica para cada diferente substância. Ela também tem a habilidade de responder de forma mais intensa a repetidas exposições ao mesmo microrganismo, gerando memória imunológica. Os linfócitos são componentes exclusivos deste tipo de imunidade e os anticorpos são produtos secretados por eles (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

As respostas imunes adaptativas podem ser classificadas em humoral ou mediada por célula. Elas são mediadas por componentes diferentes do sistema imune, que operam para eliminação de tipos diferentes de microrganismos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

A resposta gerada por imunidade humoral ocorre através de secreções de moléculas, chamadas anticorpos, produzidos por linfócitos B (ou células B). A imunidade humoral é o mecanismo central de defesa contra os microrganismos extracelulares e as toxinas produzidas por eles, sendo que os anticorpos se ligam nesses microrganismos e suas toxinas, levando-os à eliminação (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

A resposta imune mediada por célula é ocorre através de linfócitos T (ou células T). Uma das funções da imunidade mediada por célula é a defesa contra infecções geradas por microrganismos intracelulares assim como, vírus e algumas bactérias. Esses microrganismos sobrevivem e se proliferam nas células fagocitárias e outras células do hospedeiro. Dessa maneira, esse tipo de resposta atua promovendo a destruição destas células que servem como reservatório para esses microrganismos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Algumas células T ajudam também na eliminação de microrganismos extracelulares através da convocação de leucócitos que destroem os patógenos e também auxiliam as células B na produção de anticorpos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015). Os linfócitos T diferenciam-se de acordo com sua função, podendo ser citotóxicos (CD8), auxiliares (CD4), reguladores (FOXP3), natural killer (NK), de memória (CD45), entre outros (MURPHY, 2014).

As células da linhagem CD4+ ou células Th (T *helper* ou T auxiliares) caracterizam-se por serem capazes de secretar citocinas e expressar moléculas de superfície que ativam outras células. As células Th virgens têm como função principal produzir citocinas IL-2 e expressar receptores para a mesma, quando as células Th são ativadas tornam-se células efetoras, capazes de produzir uma grande variedade de citocinas que apresentam diversas atividades biológicas. As células Th virgens se diferenciam em subtipos distintos de células efetoras em resposta ao antígeno, citocinas, e coestimuladores presentes no meio. As células T CD4+ quando ativadas secretam citocinas promovendo a diferenciação, crescimento e funções de macrófagos, linfócitos B e outras células (JÄGER; KUCHROO, 2010 e MURPHY, 2014).

De acordo com as citocinas que secretam, podem determinar diferentes subgrupos dos linfócitos Th, sendo os dois principais subgrupos as células Th1 (T *helper* 1) e Th2 (T *helper* 2) (MOSMANN; COFFMAN, 1989 e MURPHY, 2014). As células Th virgens após um mínimo de estímulo vão para a circulação, passando a se designar Th0, com um estímulo mais intensificado elas se diferenciam em Th1 ou Th2. A diferenciação de Th0 em Th1 é

induzida por interleucinas (IL) como a IL-12, já a diferenciação de Th0 em Th2 é induzida por citocinas como a IL-4 (VAZ, TAKEI e BUENO, 2007 e MURPHY, 2014).

As Th1 secretam citocinas que ativam a defesa por fagocitose contra agentes infecciosos intracelulares, como IL-2, interferon-gama (INF- γ) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α). Já as Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que levam a geração de anticorpos imunoglobulina-E (IgE) e reações imunes por mastócitos e eosinófilos contra helmintos e também alérgenos (MOSMANN; COFFMAN, 1989;VAZ, TAKEI e BUENO, 2007 e MURPHY, 2014).

Depois de ocorrer à ativação das duas subpopulações, as Th1 e Th2 agem mutuamente uma sobre a outra de forma antagônica. Sendo que o INF- γ secretado pelas Th1 inibe as Th2, e a IL-10 secretada pelas Th2 inibe as Th1 (VAZ, TAKEI e BUENO, 2007; MURPHY, 2014; e GAJEWSI e FITCH, 1988).

1.5 CITOCINAS

As citocinas ou interleucinas formam um amplo grupo de proteínas secretadas com diferentes estruturas e funções, que coordenam e regulam diversas ações das células da imunidade inata e adaptativa. Entre as funções das citocinas, encontra-se o crescimento e diferenciação das células imunes, o direcionamento do movimento das células imunes do sangue para os tecidos e também ativação das funções efetoras dos linfócitos e fagócitos (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015; MURPHY, 2014). As quimiocinas são um subgrupo das citocinas, estruturalmente relacionadas, que regulam o movimento e a migração celular (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2015).

Citocinas são componentes importantes associados ao câncer de mama, podem ter efeitos tanto estimulatórios quanto inibitórios, dependendo de suas concentrações e da presença de outros fatores moduladores no micro ambiente tumoral (RAO, DYER, JAMEEL, et al., 2006). Citocinas como IFN- α , β e γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α desempenham papel na carcinogênese da mama (CARPI, NICOLINI, ANTONELLI, et al., 2009).

1.6 INTERLEUCINA 10

Em 1989, Fiorentino e colaboradores descreveram uma substância que se encontrava na parte sobrenadante de cultivos celulares de linfócitos Th2, inibindo a expressão de citocinas produzidas por células Th1. Essa substância foi denominada de “Fator Inibidor da Síntese de Citocinas” (CSIF, do inglês *Cytokine Synthesis Inhibitory Factor*). Mais tarde,

foram feitas análises bioquímicas e imunoquímicas que indicaram que o CSIF era uma nova citocina, que passou a ser denominada “Interleucina 10” (MOORE et al., 2001).

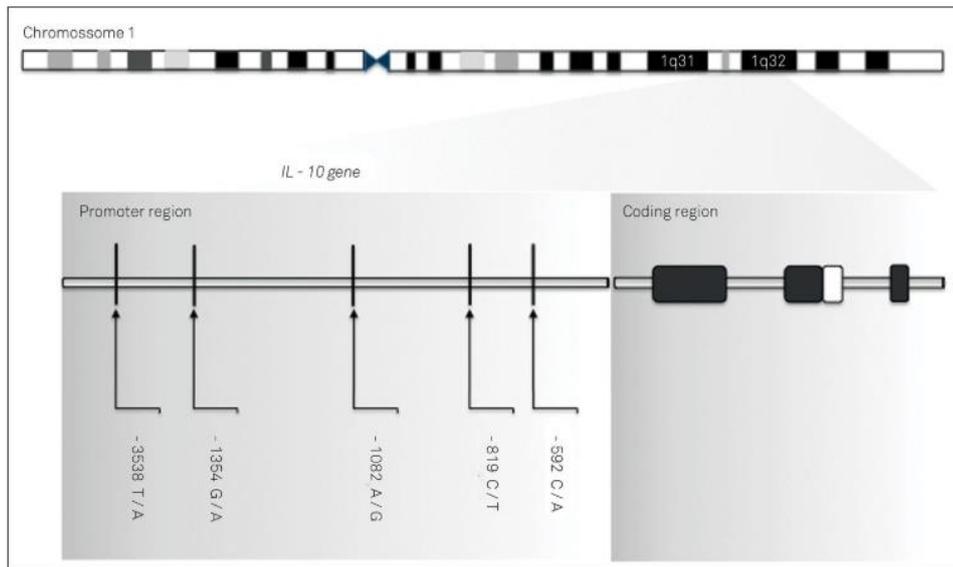
A interleucina 10 (IL-10) é a mais potente citocina anti-inflamatória. Quase todos os leucócitos produzem IL-10 bem como, células tumorais humanas incluindo de mama, pâncreas, rim, cólon, neuroblastomas e melanomas malignos, sendo que esta citocina possui uma meia vida curta e um curto alcance de atividade. Portanto, a capacidade de produção de IL-10 por diferentes células assegura sua rápida disponibilidade a diferentes locais quando necessária (SAXENA et al., 2015 e AHMAD et al., 2017).

Ainda há a possibilidade de que a IL-10 possua funções especiais nos diferentes tipos de células. Como exemplo, temos as células T regulatórias que são particularmente conhecidas pela utilização de IL-10 para suprimir a inflamação e a autoimunidade, conforme demonstrado primeiramente nos estudos de Denning, Kim e Kronenberg (2005), com a doença colite. Também as células B reguladoras estão sendo estudadas pelo seu papel de manter a autotolerância via secreção de IL-10 (MAURI e BOSMA, 2012). Há ainda as células apresentadoras de antígenos (APCs) e as células imunes inatas que são fontes de IL-10, que pode servir como *feedback* autócrino para restringir a ativação das APCs e o desenvolvimento de respostas adaptativas (SAXENA et al., 2015).

Portanto, a IL-10 exerce um papel essencial durante respostas imunes inatas e adaptativas, sendo uma citocina imunoreguladora importante e com ampla diversidade de funções em células B e T, NKs, macrófagos, e células dendríticas. A desregulação de IL-10 colabora para uma imunopatologia grave, na forma de imunodeficiência, lesão tecidual ou autoimunidade (HOFMANN et al., 2012).

O gene da IL-10 humana abrange 4,7 kb e está localizado no cromossomo 1q31-32 (figura 2) (JOHANNESON et al., 2002). Aproximadamente 75% da variação na expressão de IL-10 humana foi atribuída à presença de variantes genéticas na região promotora desse gene (WESTENDORP et al., 1997).

Figura 2- Representação esquemática da estrutura da região promotora do gene IL-10, contendo os SNPs, presente no cromossomo 1.



Fonte: MAGALHÃES, et al., 2017.

A região promotora do gene da IL-10 é altamente polimórfica, estudos de replicação em larga escala demonstraram que existem diversos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) nesta região (GATEVA et al., 2009). Ainda que grande parte dos SNPs esteja em desequilíbrio de ligação, é possível dizer que alguns desempenham papéis biológicos na regulação da expressão de IL-10 (IYER; CHENG, 2012).

Três SNPs na região promotora do gene da IL-10, nas posições -1082G/A(rs1800896), -819T/C(rs1800871) e -592A/C(rs1800872), possuem alelos que são investigados em associação com câncer de mama (KOROBENIKOVA et al., 2015). Esses SNPs influenciam na atividade transcricional, levando a alterações na expressão gênica que afetam a produção e expressão de IL-10, e estão normalmente em desequilíbrio de ligação, formando haplótipos (LV et al., 2018). Os alelos -1082A, -819T e -592A estão associados com a baixa produção de IL-10 (CARREGARO, 2008; EDWARDS-SMITH et al., 1999; WATTANATHUM et al., 2005).

1.7 CÂNCER DE MAMA E IL-10

A IL-10 é frequentemente elevada no microambiente tumoral, ela funciona em vias transversais, tanto da estimulação imunológica quanto da imunossupressão no câncer (MOCELLIN, MARINCOLA, ROSSI, et al., 2004). Devido às suas propriedades imunoestimuladoras e antiangiogênicas, a molécula de IL-10 pode prevenir ou reduzir o

crescimento e disseminação do tumor. Como molécula imunossupressora, permite que o tumor escape da vigilância imunológica ao suprimir a expressão de antígenos do MHC de classe I e II. Finalmente, prevenindo a apresentação de antígenos a linfócitos T CD8, podendo atuar como um potencial promotor de tumores resultando em um comportamento mais agressivo de células malignas (MOCELLIN, PANELLI, WANG, 2003).

Da mesma forma como nos demais cânceres, a IL-10 tem papel tanto excitatório como inibidor no câncer de mama, entre os mecanismos envolvidos na ação anticancerígena encontra-se principalmente a ativação de células NK, ativação de linfócitos T citotóxicos para manutenção de antígenos mediados por CD8 e CD4 e ativação da resposta antitumoral. Também pode inibir o crescimento do tumor, através da supressão da produção de IL-6, sendo que a IL-6 é uma citocina que promove o crescimento do tumor através da regulação positiva da proteína antiapoptótica e angiogênica de células tumorais (HAMIDULLAH et al., 2012).

Entre os mecanismos ligados a expressão do tumor, a IL-10 pode suprimir a imunidade, reduzindo a capacidade de apresentação dos antígenos aos macrófagos e inibindo a produção de diversas citocinas que desempenham funções necessárias na vigilância imunológica do tumor, sendo que, quando a IL-10 encontra-se em níveis elevados pode facilitar o escape imunológico do tumor (HAMIDULLAH et al., 2012).

O avanço do tumor é determinado por uma intrincada interação de células tumorais, estromais e linfócitos T. A IL-10 produzida tanto por células imunes quanto tumorais desempenha importante função no crescimento e na proliferação das células tumorais no microambiente tumoral. Em pacientes com câncer de mama, frequentemente é detectado um aumento da concentração de IL-10 no soro. Acredita-se que alta taxa de IL-10 seja secretada por células cancerígenas metastáticas para gerar uma regulação negativa da resposta inflamatória produzida por células do sistema imune (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2015 e HAMIDULLAH et al., 2012).

Estudos que relacionam os níveis de IL-10 com os dados clínicos de pacientes com câncer de mama já foram feitos, entre eles um estudo que relacionou a IL-10 com o receptor de estrógeno (RE), e demonstrou que esta citocina está super expressa em paciente com tumor de mama RE-negativos em comparação com tumores de mama RE-positivos (CHAVEY, et al., 2007).

Outro estudo relacionou a IL-10 em câncer de mama com marcadores de apoptose como p53 e Her-2. Pacientes com tumor que era negativo para p53 apresentavam níveis elevados para IL-10, já pacientes com tumor de mama positivo para Her-2 encontravam-se associados com níveis elevados de IL-10 (LLANES-FERNANDEZ, ALVAREZ-GOYANES, ARANGO-PRADO, et al., 2006).

Estudos de associação dos polimorfismos da *IL-10* com câncer de mama têm sido realizados para investigar seu possível uso como biomarcador de início ou progressão da doença. Os polimorfismos das posições -1082, -819 e -592 são os mais estudados em pacientes com câncer de mama e a grande maioria dos estudos apresentam uma associação significativa (HAMIDULLAH et al., 2012).

Cada vez mais estudos evidenciam que a IL-10 tem um importante papel no início e na progressão do câncer de mama, embora não esteja claro ainda o intrincado processo envolvido. Além disso, pouco se sabe sobre o efeito desses polimorfismos no quadro clínico de câncer de mama em populações miscigenadas, como a brasileira.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é um problema de saúde mundial que afeta milhares de mulheres todos os anos, muitas vezes levando a óbito. A prevalência de mulheres afetadas em Florianópolis é elevada, sendo que a estimativa para 2018 era de 200 casos de câncer de mama, gerando uma taxa de 81,86 novos casos a cada 100 mil habitantes e a estimativa para 2018 em Santa Catarina foi de 2.190 novos casos em 2018, uma taxa de 61,92 a cada 100 mil habitantes (INCA, 2017). Por isso, pesquisas sobre fatores que influenciam no aumento da suscetibilidade e no desenvolvimento do quadro clínico da doença são importantes.

Mesmo com muitos avanços nas pesquisas e nos tratamentos para câncer de mama desenvolvidos nos últimos anos, ainda continua existindo um aumento no número de mulheres afetadas, havendo necessidade de maior conhecimento sobre a doença. Com isso, torna-se desejável o estudo de biomarcadores para avaliar um futuro risco da doença, auxiliando em um diagnóstico precoce, monitorando a doença e sua progressão e ajudando a desenvolver novas formas de tratamento (JOG; JAMES, 2017).

Os polimorfismos têm fundamental importância como marcadores genéticos, auxiliando na distinção de diferentes formas hereditárias de um gene (NUSSABAUM, MCINNES & WILLAR, 2016). Estudos apontam que os SNPs do gene da IL-10 são locus que podem apresentar associação com o câncer de mama, porém os resultados ainda são inconsistentes, variando dependendo da população analisada. Além disso, poucos estudos relacionam esta citocina a dados clínicos das pacientes com a doença, tornando relevante que mais estudos de associação desse tipo sejam conduzidos em populações com diferentes ancestralidades.

Diante da importância da IL-10 nas diversas abordagens de respostas do sistema imune, verifica-se a necessidade de mais pesquisas que ajudem a entender a associação desta citocina com o câncer de mama. Este estudo irá colaborar nessa área, através da investigação da associação dos polimorfismos da região promotora da IL-10 com características clínicas encontradas em pacientes com câncer de mama, podendo, dessa maneira, contribuir para um melhor diagnóstico e para a busca de novos tratamentos para a doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar a frequência dos polimorfismos -819 e -592 presentes na região promotora do gene *IL-10* e sua associação com a suscetibilidade genética e o quadro clínico de câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimizar a técnica de PCR-SSP multiplex para genotipagem dos polimorfismos (-819 e -592) do gene *IL-10* no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE);
2. Identificar o perfil gênico de cada indivíduo com câncer de mama e dos indivíduos controles;
3. Calcular as frequências alélicas para polimorfismos no gene da citocina *IL-10*;
4. Verificar a aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg;
5. Derivar os haplótipos na região promotora do gene *IL-10*;
6. Verificar a possível associação dos haplótipos com suscetibilidade e os dados clínicos das pacientes com câncer de mama.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a elaboração da pesquisa foram utilizadas amostras de sangue periférico de pacientes e de um grupo controle que haviam sido previamente coletadas. O DNA das amostras foi extraído e armazenado no Banco de Amostras do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE – UFSC).

A amostra constituiu-se de 197 indivíduos, sendo 148 mulheres com câncer de mama (grupo caso) e 49 sem o diagnóstico para câncer de mama (grupo controle), todas brasileiras. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH/UFSC).

O estudo foi realizado utilizando-se amostras biológicas (DNA) de pacientes com câncer de mama, atendidas no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – Universidade Federal de Santa Catarina (HU – UFSC), das quais foram realizadas coletas de informações clínicas, epidemiológicas e familiares através de questionários e/ou prontuários. O grupo controle é proveniente da mesma instituição e é composto por indivíduos saudáveis (sem evidências da patologia em estudo), que constituem o grupo controle do Banco de Amostras do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE – UFSC).

4.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

A extração do DNA genômico das células sanguíneas foi realizada em estudos anteriores utilizando o método *Salting Out*, descrito por Miller e colaboradores (1988) e modificado por Lahiri & Nurnberger (1991). Após a extração, foi verificada a densidade óptica do DNA, identificando a concentração e pureza das amostras. Após esses procedimentos, essas amostras passaram a integrar o Banco de DNA do LAPOGE.

A genotipagem dos polimorfismos da região promotora da *IL-10* foi realizada através do método multiplex de reação em cadeia da polimerase alelo específico (PCR-SSP, do inglês, *Polymerase Chain Reaction – Sequence- Specific Primers*), no qual foram amplificadas sequências-alvo específicas dos SNPs, nas posições -819 e -592 da região

promotora. A técnica de genotipagem foi descrita anteriormente por Kingkeow e colaboradores (2011), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (primers) que flanqueiam a região genômica de interesse. Os primers utilizados foram descritos por Kingkeow e colaboradores 2011 e se encontram na tabela abaixo (Tabela 1). No estudo em questão, esses primers foram testados utilizando uma PCR-SSP única, para após configurar o multiplex. No presente estudo foi aplicada diretamente a técnica do PCR-SSP multiplex.

Tabela 1- Sequência de primers, temperatura de anelamento e tamanho da amplificação para o locus único PCR-SSP.

Primer 5'-3'	Ta(°C)	Amplicon (pb)
Single locus PCR-SSP		
<i>IL10-819C</i> forward CCC TTG TACAGG TGA TGT AAC	65.0	831
<i>IL10-819T</i> forward ACC CTT GTA CAG GTG ATG TAA T		
<i>IL10-592C</i> forward CTG TGA CCC CGC CTG TC	66.0	600
<i>IL10-592A</i> forward CTG TGA CCC CGC CTG TA		
<i>IL10-592</i> common reverse CAA GCC CCT GAT GTG TAG A		

Ta(°C)= temperatura de anelamento em grau Celsius; pb= pares de base.

Fonte: adaptado de Kingkeow et al., 2011.

Para o ensaio de PCR-SSP multiplex, foi utilizada uma reação de dois mixes por amostra com o primer da *IL10-592* anti-senso comum a ambos os polimorfismos (Tabela 1). Uma reação continha os primers de *IL10-819T* senso, *IL10-592C* senso e *IL10-592* anti-senso. A outra reação continha os primers de *IL10-819C* senso, *IL10-592A* senso e *IL10-592* anti-senso.

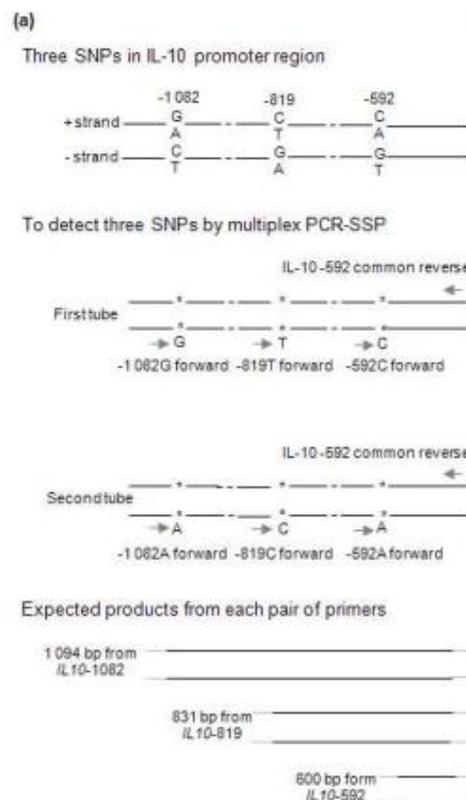
As reações tiveram volume final de 10µL e as concentrações adequadas para a reação foram:

- 1) 25-50 ng de amostra de DNA;
- 2) 10% do volume final de tampão (composto por Tris-HCL 20 mM e KCL 50 mM);
- 3) 2mM de MgCl₂;
- 4) 0,2 mM de cada dNTPs;
- 5) 0,2 mM de cada primers específicos/comuns;
- 6) 0,25 unidades de *Taq DNA Polymerase Platinum* (Invitrogen™ Lifetechnologies).

As condições ótimas do termociclador para amplificação foram: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 20 s, 66°C por 50 s, 72°C por 50 s, seguido por 10 ciclos de 95°C por 15 s, 62°C por 50s e 72°C por 40 s. O tempo de extensão final foi de 80 s.

O ensaio multiplex PCR-SSP estabelecido por Kingkeow e colaboradores (2011) pode detectar os três polimorfismos bi-aliélicos do promotor de *IL-10*, entretanto, tivemos problemas técnicos para padronizar a genotipagem do polimorfismo -1082. Como os polimorfismos estão normalmente em desequilíbrio de ligação, optamos por analisar somente os outros dois (-819 e -592), uma vez que essa informação nos permite derivar os haplótipos. O ensaio gerou amplicons de comprimentos diferentes que puderam ser facilmente diferenciados por eletroforese em gel de agarose 1%, com voltagem de 140V e amperagem de 400A, que correram por 30 minutos. A figura 3 demonstra, através de um esquema, o padrão de bandas esperado.

Figura 3 - Esquema do método PCR-SSP multiplex.



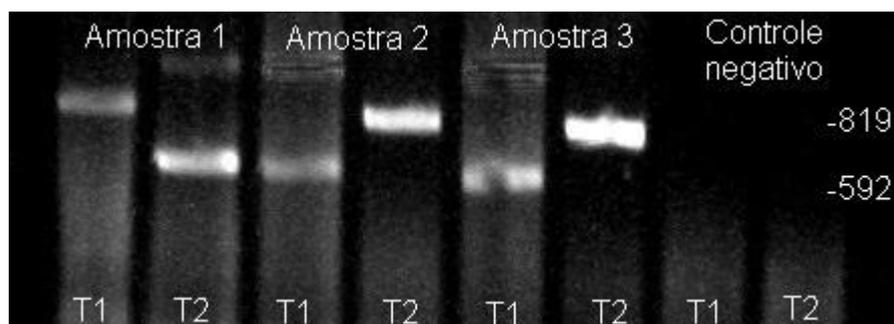
Fonte: adaptado de Kingkeow et al., 2011.

O padrão de bandas observado no gel pode ser visualizado na figura 4, que representa como foi feita a genotipagem das amostras de DNA. Se surgisse a banda de 831pb,

que amplificava o fragmento que continha a região -819, na reação do T1 (tubo 1) concluía-se que o indivíduo possuía o alelo T para este polimorfismo. Se aparecesse no T2 (tubo 2), continha o alelo C. Se a banda para a região -819 aparecesse nos dois tubos o indivíduo era heterozigoto para esta região.

O mesmo ocorre com o fragmento de 600pb que amplifica a região que contém o polimorfismo -592. Se a banda aparecesse na reação do T1, o DNA continha o alelo C para este polimorfismo, enquanto se aparecesse no T2 o DNA continha o alelo A. O indivíduo era heterozigoto para esta região caso aparecessem bandas nos dois tubos de reação. O controle negativo funcionava como controle da reação, pois não continha DNA.

Figura 4 - Representação do gel de agarose, com diferentes amostras de DNA. Visualização das bandas -819 e -592.



T1= tubo 1 com a reação contendo os primers -819T e -592C; T2= tubo 2 com a reação contendo os primers -819C e -592A. Amostra 1= indivíduo TT para a região -819 e AA para -592. Amostras 2 e 3= indivíduos CC na região -819 e CC na -592.

Fonte: elaborada pela autora.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência alélica foi calculada por contagem direta. Foram calculadas as frequências genotípicas para verificar se os polimorfismos se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) através do programa Arlequin (GOURRAUD et al., 2005; SINGLE et al., 2008). Foi verificado se os polimorfismos se encontram em desequilíbrio de ligação, e quais as combinações haplotípicas mais prováveis, utilizando o programa MLocus (LONG, 1999).

Os haplótipos obtidos foram classificados de acordo com o nível de expressão da IL-10, conforme os alelos contidos no haplótipo, como pode ser visto na tabela abaixo (Tabela 02). O alelo A na posição -592 e o alelo T na posição -819 estão relacionados com menor

expressão da IL-10, enquanto os alelos C na -592 e C na -819 estão relacionados com maior expressão da IL-10.

Tabela 2- Classificação dos haplótipos de acordo com nível de expressão dos alelos.

Haplótipo (-592,-819/-592,-819)		Nível de expressão da citocina
AT/AT	--/--	Baixa
AT/CT	--/+	Baixa
AT/CC	--/++	Intermediária
AC/AC	+/-+	Intermediária
AC/CC	+/>++	Alta
CC/CC	++/++	Alta

Fonte: elaborada pela autora.

Dados epidemiológicos foram obtidos através de aplicação de um questionário no momento da entrevista. Esses dados foram utilizados para analisar sua associação com os polimorfismos e haplótipos e comparar os grupos de casos e controles. Os seguintes dados foram coletados: índice de massa corpórea (IMC), hábito tabagista, hábito etilista, prática de atividade física, idade da menopausa, idade da menarca, idade da primeira gestação, uso de anticoncepcional e terapia de reposição hormonal (TRH). Foi criada a variável “Anos de Fertilidade” através da fórmula: Idade da Menopausa – Idade da Menarca.

Outras informações sobre os dados clínicos do câncer de mama foram obtidas através da análise de prontuários médicos. O TNM é um tipo de classificação que agrupa casos de câncer de mama de acordo com alguns fatores, que refletem a agressividade do tumor. O T significa a extensão do tumor primário, o N o número de linfonodos acometidos e o M a presença de metástase à distância (INCA, 2011). Essas características geram uma classificação por estádios, como pode ser visto na tabela 03.

O grau de Elston-Elis (Grau de Bloom) é um sistema de classificação de câncer de mama amplamente utilizado, se refere ao sistema Nottingham combinado com grau histológico e, gera uma classificação que define o grau do tumor em I, II e III (RAKHA et al., 2008). Um menor grau indica um câncer de crescimento mais lento e é menos provável que se dissemine, enquanto um grau mais alto indica um câncer de crescimento mais rápido, mais provável de se disseminar.

Tabela 3 - Agrupamento por estádios.

Estádios		Tumor	Linfonodo	Metástase
	0	Tis	N0	M0
I	IA	T1*	N0	M0
	IB	T0	N1 _{mic}	M0
		T1	N1 _{mic}	M0
II	IIA	T0	N1	M0
		T1*	N1	M0
		T2	N0	M0
	IIB	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
III	IIIA	T0	N2	M0
		T1*	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
	IIIB	T3	N2	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0
		IIIC	Qualquer T	N3
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	

*T1 inclui T1_{mic}

Fonte: Adaptado de ABC do Câncer, INCA, 2011.

O perfil imuno-histoquímico é baseado na avaliação dos RE e RP, superexpressão de Her-2 e índice de proliferação celular Ki67 (anticorpo monoclonal que detecta um antígeno nuclear, expressando células que entram no ciclo celular e medindo a fração de crescimento celular). De acordo com os diferentes fenótipos obtidos são definidos cinco subtipos atualmente, como pode ser visto na tabela abaixo (Tabela 04):

Tabela 4- Classificação do câncer segundo o perfil imuno-histológico.

Classificação	Fenótipo
Luminal A	RE+, RP+, HER2-
Luminal B-HER2 negativo	RE+ e/ouRP+, HER2-
Luminal B-HER2 positivo	RE+ e/ou RP+, HER2+
Triplo negativo	RE-, RP-, HER2-
HER2 superexpresso	RE-, RP-, HER2+

Fonte: elaborado pela autora. Informações extraídas de CINTRA et al., 2012.

As associações dos haplótipos com a suscetibilidade genética ao câncer de mama e com os dados clínicos foram conduzidas no software SPSS versão 18 (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.). Foi realizada uma

análise de distribuição normal para as variáveis e a decisão dos testes a serem aplicados foi tomada com base no resultado da estatística de Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição normal foram analisadas por teste t para amostras independentes, enquanto as variáveis de distribuição assimétrica foram analisadas por teste de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram analisadas por teste de qui-quadrado de homogeneidade. Variáveis contínuas de distribuição normal foram apresentadas por média e desvio padrão e as variáveis de distribuição assimétrica foram apresentadas por mediana e intervalo interquartil. Já as variáveis categóricas foram apresentadas por proporção. Foi utilizado um valor de $p < 0,05$ como o valor limite de significância.

5 RESULTADOS

Foi verificado que os dois polimorfismos se encontram em equilíbrio de HW em ambas as populações (controles e casos). Os valores de p observados nesses testes foram: $p=0,44$ para a região -592 e $p=0,05$ para a região -819 para a amostra de casos e $p=0,53$ e $p=0,98$ para a amostra controle. Os polimorfismos analisados encontram-se em desequilíbrio de ligação (LD, do inglês, *Linkage Disequilibrium*) com um valor $LD=0,901$.

As frequências alélicas dos polimorfismos da IL-10 encontram-se na tabela 05, que compara os valores observados para os grupos câncer de mama (CM) e controle com diferentes etnias. Observamos que as frequências alélicas obtidas se assemelham as da população CEU (residentes de Utah com ancestralidade europeia) que apresenta ancestralidade predominantemente europeia. Esse resultado está de acordo com o que foi relatado pelas mulheres durante a aplicação do questionário (Tabela 07) e com o que já está bem estabelecido para a origem da população de Santa Catarina, formada por fortes ondas de migração de populações europeias (JOCHEM, 1997).

Tabela 5 - Frequências alélicas dos polimorfismos da IL-10 para os grupos câncer de mama (CM) e controle, além de diferentes etnias.

	Alelo	Controles	CM	CEU	YRI	CHB	Ameríndio
(rs1800872)	C	0,610	0,705	0,788	0,527	0,262	0,299
(rs1800871)	C	0,600	0,708	0,827	0,536	0,312	0,299

CEU, residentes de Utah com ancestralidade Europeia; CHB, Chineses Han de Beijing, China; YRI, Yoruba de Ibadan, Nigeria; Ameríndio, populações Nativas Sul-Americanas compostas por tribos Aché, Guarani e Kaingang.

Fonte: Elaborada pela autora, informações extraídas de LINDENAU; et al., 2013.

A tabela 06 apresenta a comparação dos valores para as variáveis contínuas nos grupos. Observamos que há uma diferença significativa entre casos e controles para a variável “tempo de amamentação”, onde o grupo controle apresenta maior tempo de amamentação em meses do que o grupo de pacientes com câncer de mama. Esse resultado reforça o efeito protetor para câncer de mama associado à amamentação.

Tabela 6- Caracterização das amostras e comparação das variáveis contínuas entre casos e controles.

	Controle		Caso		Valor <i>p</i>
Idade ¹	51,2 (14,9)	20,0 - 80,0	52,3 (13,6)	27,0 - 96,0	0,618
Idade de Menarca ¹	13,3 (1,9)	18,0 - 54,1	12,9 (1,7)	16,9 - 47,5	0,212
Idade 1º Gestação ¹	21,7 (4,7)	9,0 - 19,0	22,3 (4,9)	9,0 - 18,0	0,525
IMC ²	27,1 [23,7; 30,5]	23,0 - 55,0	25,8 [23,2; 29,4]	33,0 - 60,0	0,586
Idade de Menopausa ²	46,5 [41,0; 52,0]	8,0 - 41,0	48,0 [46,0; 50,0]	22,0 - 47,0	0,465
Anos de Fertilidade ²	33,5 [28,0; 39,0]	0,0 - 11,0	35,0 [32,0; 38,0]	0,0 - 14,0	0,326
Paridade ²	3,0 [1,0; 3,0]	15,0 - 33,0	2,0 [2,0; 3,0]	15,0 - 38,0	0,719
Tempo de Amamentação ² (meses)	21,0 [8,0; 36,0]	1,0 - 132,0	11,0 [3,0; 36,0]	0,0 - 132,0	0,025

1 – Representação por média (DP); comparação realizada pelo teste t para amostras independentes;

2 – Representação por mediana [*p*25; *p*75]; comparação realizada pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte: elaborado pela autora.

A tabela 07 apresenta o número de casos e as proporções para as variáveis categóricas analisadas no grupo caso e controle. Observamos que os grupos não diferem para a maior parte das variáveis analisadas, sendo que foi identificada uma tendência de diferença significativa para as variáveis: tabagismo e haplótipos de IL-10. Foi verificada uma tendência de mais fumantes no grupo com câncer de mama e de indivíduos com baixa ou intermediária expressão de IL10 no grupo controle. Além disso, podemos destacar o valor de *p* mais baixo em relação aos demais para a variável “parentes de primeiro grau com câncer de mama”, demonstrando o efeito hereditário dessa condição, uma vez que observamos quase o dobro de parentes afetados no grupo de indivíduos com câncer de mama em relação ao grupo controle.

Tabela 7 - Comparação casos e controles para as variáveis categóricas analisadas.

		Controle	Caso	<i>p</i>
		n (%)	n (%)	
Escolaridade	Analfabeto	4 (10,8)	7 (5,2)	0,469
	E Fundamental	22 (59,5)	86 (64,2)	
	E Médio ou mais	11 (29,7)	41 (30,6)	
Cor	Branca	44 (91,7)	121 (85,2)	0,643
	Preta	3 (6,3)	14 (9,9)	
	Parda	1 (2,1)	7 (4,9)	
Status da Menopausa	Pré	21 (42,9)	74 (51,4)	0,386
	Pós	28 (57,1)	70 (48,6)	
Amamentação	Não	6 (13,3)	27 (19,9)	0,448
	Sim	39 (86,7)	109 (80,1)	
Parentes de 1º grau com CM	Não	42 (89,4)	110 (79,1)	0,177
	Sim	5 (10,6)	29 (20,9)	
Parentes de 2º grau com CM	Não	41 (87,2)	109 (80,7)	0,433
	Sim	6 (12,8)	26 (19,3)	
Tabagismo	Não fumante	35 (71,4)	81 (56,3)	0,088
	Fumante/ex	14 (28,6)	63 (43,8)	
IMC categórico	Desnutrido	2 (4,4)	4 (3)	0,754
	Eutrófico	16 (35,6)	57 (42,9)	
	Sobrepeso	15 (33,3)	42 (31,6)	
	Obeso	12 (26,7)	30 (22,6)	
Haplótipo categorizado	Baixa/Intermediária	32 (65,3)	72 (49,3)	0,076
	Alta	17 (34,7)	74 (50,7)	

Teste de Qui-Quadrado de homogeneidade, programa SSP versão 18.

Fonte: elaborado pela autora.

A tabela 08 apresenta a classificação das variáveis clínicas associadas ao câncer de mama, observadas no grupo caso. A maior parte das pacientes (76,3%) apresenta carcinoma ductal invasivo, seguido por carcinoma lobular invasivo (13,3%). O grau 2 na escala de Bloom (Nottingham) foi o mais prevalente (57,7%), seguido do grau 3 (26,8%), demonstrando que essas pacientes apresentam cânceres de moderada a alta gravidade.

Mais de 70% das pacientes foi positiva para os receptores hormonais. Somente 15% da amostra foi positiva para Her-2, demonstrando a baixa porcentagem de pacientes desse grupo aptas a receber imunoterapia dirigida a Her-2. Coerente com essas informações, a maioria das pacientes foi luminal A e poucas foram Her-2 superexpresso.

Tabela 8- Classificação do câncer.

		Número	Porcentagem da Amostra	
Classificação	Carcinoma ductal in situ	8	5,9%	
	Carcinoma ductal invasivo	103	76,3%	
	Carcinoma lobular invasivo	18	13,3%	
	Carcinoma tubular	2	1,5%	
	Carcinoma adenóide cístico	1	0,7%	
	Carcinoma intraductal	1	0,7%	
	Carcinoma papilar	2	1,5%	
	Grau de Bloom	0	1	1,0%
		1	14	14,4%
2		56	57,7%	
3		26	26,8%	
Localização do Tumor	Mama direita	47	37,9%	
	Mama esquerda	77	62,1%	
Receptor de Estrógeno	Negativo	22	20,2%	
	Positivo	87	79,8%	
Receptor de Progesterona	Negativo	30	28,6%	
	Positivo	75	71,4%	
Her-2	Negativo	86	85,1%	
	Positivo	15	14,9%	
TNM	0	3	4,5%	
	1	17	25,8%	
	2	25	37,9%	
	3	21	31,8%	
Luminal	Luminal A	56	57,1%	
	Luminal B Her+	12	12,2%	
	Luminal B Her-	11	11,2%	
	Triplo Negativo	18	18,4%	
	Hersuperexpresso	1	1,0%	

Fonte: elaborado pela autora.

A tabela 09 abaixo apresenta os resultados da comparação dos haplótipos com os dados clínicos das pacientes. Observamos uma associação significativa dos haplótipos com o IMC categorizado em desnutrido (IMC < 18,5), eutrófico (IMC entre 18,5 e 24,9), sobrepeso (IMC entre 25 e 29,9) e obeso (IMC > 30). A categoria eutrófico foi mais frequente no grupo com haplótipo de alta expressão de IL-10, enquanto a categoria sobrepeso foi mais frequente

no grupo com haplótipos de baixa ou intermediária expressão de IL-10. Nenhuma das demais variáveis foi associada significativamente com os haplótipos de IL-10.

Tabela 9 - Análises de associação dos haplótipos com dados clínicos das pacientes com câncer de mama.

		Haplótipo (IL10 (-592 e -819))		
		Baixa/Intermediária (n=72)	Alta (n=74)	
		n (%)	n (%)	<i>p</i>
IMC (categórico)	Desnutrido	3 (4,6)	1 (1,5)	0,014
	Eutrófico	21 (32,3)	36 (52,9)	
	Sobrepeso	28 (43,1)	14 (20,6)	
	Obeso	13 (20)	17 (25)	
Grau De Bloom	1	6 (14)	8 (15,1)	0,929
	2	26 (60,5)	30 (56,6)	
	3	11 (25,6)	15 (28,3)	
Localização	Mama Direita	24 (39,3)	23 (36,5)	0,888
	Mama Esquerda	37 (60,7)	40 (63,5)	
Receptor de Estrógeno	Negativo	10 (19,2)	12 (21,1)	>0,999
	Positivo	42 (80,8)	45 (78,9)	
Receptor de Progesterona	Negativo	13 (25,5)	17 (31,5)	0,643
	Positivo	38 (74,5)	37 (68,5)	
Her-2	Negativo	42 (85,7)	44 (84,6)	>0,999
	Positivo	7 (14,3)	8 (15,4)	
TNM	1	8 (24,2)	9 (30)	0,617
	2	15 (45,5)	10 (33,3)	
	3	10 (30,3)	11 (36,7)	
Luminal	Luminal A	28 (60,9)	28 (54,9)	0,787
	Luminal B Her+	5 (10,9)	7 (13,7)	
	Luminal B Her-	6 (13)	5 (9,8)	
	Triplo Negativo	7 (15,2)	11 (21,6)	
Tabagismo	Não fumante	39 (54,9)	42 (57,5)	0,883
	Ex/Fumante	32 (45,1)	31 (42,5)	
Etilismo	Não Consume	36 (50,7)	43 (60,6)	0,311
	Esporádico/Regular	35 (49,3)	28 (39,4)	
Atividade Física	Não	36 (64,3)	35 (54,7)	0,378
	Sim	20 (35,7)	29 (45,3)	
Status Menopausa	Pré	36 (50)	38 (52,8)	0,868
	Pós	36 (50)	34 (47,2)	

Representações por frequência absoluta e relativa [n (%)]; comparação pelo teste qui-quadrado de homogeneidade.

Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Considerando a caracterização dos grupos caso e controle, foi verificado que o tempo de amamentação se mostrou com um valor de p significativo ($p= 0,025$). Pode ser observado que no grupo controle encontram-se mulheres que tiveram um período de amamentação maior do que mulheres do grupo caso, isso vem ao encontro com o que se tem na literatura, sendo a amamentação um fator protetor para o câncer de mama (INCA, 2019c). Segundo o INCA, (2019c), a amamentação diminui o risco de ter câncer de mama, pois o movimento de sucção que o bebê faz ao beber o leite materno promove uma espécie de esfoliação do tecido mamário, assim, se houverem células agredidas no local, estas serão eliminadas e renovadas.

Quando termina o período de lactação, várias células se autodestroem, assim, células com lesões no material genético também poderão ser destruídas. Outro benefício da amamentação, é que as taxas de alguns hormônios que são favoráveis ao desenvolvimento do câncer de mama (como o estrógeno) diminuem durante o período de aleitamento (INCA, 2019c). Então, quanto maior for o período de amamentação maior será a proteção para a mãe, o que pode justificar a diferença encontrada neste estudo.

Outro resultado que se aproximou de um valor significativo na comparação entre casos e controles foi o hábito tabagista, sendo o número de mulheres fumantes e ex-fumantes maior no grupo caso do que no grupo controle. Este resultado possivelmente seria melhor visualizado se o número de amostras no grupo controle fosse maior. Afinal, essa tendência está de acordo com o que há na literatura.

De acordo com Katzke e colaboradores, 2015, o hábito tabagista pode ser responsável por cerca de 20 a 30% dos casos de câncer em todo o mundo. Supõe-se que toxinas contidas no cigarro têm a capacidade de modular o sistema imune, gerando uma redução na quantidade de células NK e então, diminuindo a imunidade mediada por células (SCOTT et al., 2013). Mulheres expostas regularmente ao fumo demonstram um aumento no risco do desenvolvimento do câncer de mama em comparação com aquelas que nunca se expuseram ao cigarro (JOHNSON, 2005).

Um resultado que chama a atenção, apesar de não se encontrar significativo, é a relação de parentes de 1º grau com câncer de mama ($p=0,177$). No grupo controle, o percentual de parentes de primeiro grau que não possuem CM é maior do que no grupo caso,

89,4 e 79,1%, respectivamente. O grupo caso possui um percentual maior de parentes de 1º grau com CM (20,9%) em relação ao grupo controle (10,6%). Este resultado chama atenção porque sugere uma relação de hereditariedade no câncer de mama, o que vai ao encontro aos estudos que mostram um risco aumentado de CM em mulheres que possuem parentes de primeiro grau com a doença, o risco nesses casos pode chegar a dobrar (INSTITUTO ONCOGUIA, 2017; INCA, 2018b). O histórico familiar de primeiro grau é possivelmente o fator de risco mais reconhecido e amplamente comprovado cientificamente (PINHO & COUTINHO, 2005). Possivelmente, com um número amostral maior do grupo controle seja possível visualizar melhor essa diferença.

Neste estudo optou-se por verificar apenas a associação dos polimorfismos -819T/C (rs1800871) e -592A/C (rs1800872) com a doença, pois não foi possível amplificar o polimorfismo -1082G/A (rs1800896) através do protocolo utilizado, acredita-se que devido ao tamanho do amplicon que ele gerava, 1094pb. Porém, como estes três polimorfismos encontram-se em desequilíbrio de ligação, não obtivemos nenhuma dificuldade em derivar os haplótipos com os outros dois polimorfismos.

O resultado para o haplótipo subdividido em categorias de alta, média ou baixa expressão apresentou valor de p próximo ao que seria considerado significativo ($p=0,076$). No grupo controle, a maioria das mulheres (aproximadamente 65%) apresentou haplótipo de baixa e intermediária expressão, enquanto que no grupo caso aproximadamente 50% apresentou haplótipos de alta expressão de IL-10. Por apresentarem um haplótipo que aumenta a expressão de IL-10, supõe-se que os níveis séricos de IL-10 em mulheres com câncer de mama sejam mais elevados.

Como discutido anteriormente, a IL-10 geralmente encontra-se elevada no microambiente tumoral, funcionando em vias transversais, tanto da estimulação imunológica quanto da imunossupressão no câncer (MOCELLIN, MARINCOLA, ROSSI, et al., 2004). Como molécula imunossupressora, permite que o tumor escape da vigilância imunológica ao suprimir a expressão de antígenos do MHC de classe I e II. Além disso, previne a apresentação de antígenos a linfócitos T CD8, podendo atuar como um potencial promotor de tumores resultando em um comportamento mais agressivo de células malignas (MOCELLIN, PANELLI, WANG, 2003).

A IL-10 tem papel tanto excitatório como inibitório no câncer de mama e entre os mecanismos ligados a expressão do tumor, a IL-10 pode suprimir a imunidade, reduzindo a capacidade de apresentação dos antígenos aos macrófagos e inibindo a produção de diversas

citocinas que desempenham funções necessárias na vigilância imunológica do tumor, sendo que, quando a IL-10 encontra-se em níveis elevados pode facilitar o escape imunológico tumoral (HAMIDULLAH et al., 2012).

Em pacientes com câncer de mama é detectado geralmente um aumento da concentração de IL-10 no soro. Acredita-se que altas taxas de IL-10 sejam secretadas por células cancerígenas metastáticas para gerar uma regulação negativa da resposta inflamatória produzida por células do sistema imune (ABBAS; LICHTMAN & PILLAI, 2015 e HAMIDULLAH et al., 2012). Nossos achados encontram-se em concordância com essas evidências e, provavelmente, seriam melhores visualizados com um número amostral maior do grupo controle.

Das análises de associação dos haplótipos com dados clínicos das pacientes com câncer de mama, apenas o IMC subdividido em categorias apresentou um resultado significativo, com um valor de $p=0,014$. Nas pacientes que apresentam haplótipos para baixa e média expressão de IL-10, a maioria (43,1%) encontra-se na categoria de sobrepeso, enquanto que a maioria das mulheres com o genótipo para alta expressão de IL-10 (52,9%) se encontra na categoria eutrófico, que é considerado o peso ideal.

De acordo com o INCA, 2019e, o peso corporal e acúmulo de gordura influenciam na saúde e bem-estar ao longo de toda a vida. Na fase adulta, o ganho de peso, sobrepeso e obesidade estão associados a diversos cânceres, inclusive o de mama em mulheres pós menopausa. O excesso de peso no corpo provoca processos inflamatórios e gera um aumento na produção de hormônios que podem levar a danos nas células e gerar ou acelerar o surgimento da doença. O sobrepeso, assim como a obesidade, é considerado um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama e está associado a um pior prognóstico da doença (DIRAT et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos, os haplótipos de baixa ou intermediária expressão da IL-10 podem estar associados a um IMC aumentado em pacientes com câncer de mama.

O sobrepeso ocorre quando há um aumento do tecido adiposo. O tecido adiposo é composto por adipócitos, células responsáveis pela secreção de ácidos graxos, retinol, colesterol, hormônios esteróides e mediadores químicos envolvidos em processos inflamatórios, como a interleucina6 (IL-6) e o TNF- α . Quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior será a produção de adipocinas (PRADO, et al., 2009; SIPPEL, et al 2014).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir a produção de adipocinas pró-inflamatórias produzidas por linfócitos T e macrófagos, como TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 em monócitos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a forma como a IL-10 consegue inibir a síntese de adipocinas pró-inflamatórias. Um dos mecanismos pelo qual a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias é através da inibição da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B em monócitos e células T (FERNÁNDEZ, 2002; SIPPEL, et al., 2014). Com isso, poderíamos supor que a alta expressão de IL-10 tem uma função protetora contra o sobrepeso, que é um fator de risco para o câncer de mama. Esse achado precisa ainda ser confirmado com dados clínicos de mulheres controles, o que não foi possível realizar nesse estudo, devido ao reduzido número de controles utilizadas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises e resultados apresentados no presente estudo, é possível verificar que os objetivos do trabalho foram alcançados.

Das comparações entre casos e controles, a amamentação mostrou-se significativa sendo que, o grupo controle amamentou por um tempo relativamente maior que mulheres do grupo caso, mostrando que a amamentação é um fator protetor para CM.

Outros resultados que ficaram próximos ao significativo, na comparação entre casos e controles, foram o haplótipo categorizado, o tabagismo e parentes de 1º com CM.

O número de mulheres fumantes e ex-fumantes é maior no grupo caso do que no grupo controle, corroborando com os dados da literatura, mulheres expostas regularmente ao fumo demonstram um aumento no risco do desenvolvimento do câncer de mama, em comparação com aquelas que nunca se expuseram (JOHNSON, 2005).

No resultado para o haplótipo subdividido em categorias no grupo controle, a maioria das mulheres apresentou haplótipos de baixa e intermediária expressão, enquanto que, no grupo caso aproximadamente metade apresentou haplótipos de alta expressão de IL-10. Por apresentarem um haplótipo que aumenta a expressão de IL-10, supõe-se que os níveis séricos de IL-10 em mulheres com câncer de mama sejam mais elevados. A IL-10 elevada pode estar associada ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama, pois ela pode estar atuando por vias excitatórias no câncer de mama, sendo que, quando a IL-10 encontra-se em níveis elevados pode facilitar o escape imunológico do tumor (HAMIDULLAH et al., 2012).

Um resultado que, apesar de não se encontrar significativo, chamou atenção, foi a relação de parentes de 1º grau com câncer de mama ($p=0,177$), o percentual de pacientes com parentes de primeiro grau com CM é maior no grupo caso do que no controle, sugerindo uma relação de hereditariedade no câncer de mama. Isso vai ao encontro aos estudos que trazem que o risco de câncer de mama é aumentado em mulheres que possuem parentes de primeiro grau que possuem a doença, o risco nesses casos pode chegar a dobrar (INSTITUTO ONCOGUIA, 2017; INCA, 2018b).

Possivelmente, com um número amostral maior no grupo controle, seria possível ter uma melhor compreensão dessas diferenças na relação entre casos e controles, para os

resultados do tabagismo, relação do haplótipo com risco de CM e número de parentes de 1º grau com câncer de mama.

Das características clínicas analisadas, a que mostrou associação positiva foi o IMC, sendo que a classificação eutrófica foi associada ao haplótipo de alta expressão de IL-10 em paciente com câncer de mama, sugerindo que, o nível aumentado de expressão desta citocina é protetor contra o sobrepeso em mulheres com câncer de mama.

Este foi o primeiro trabalho que associou características clínicas das pacientes com câncer de mama com os polimorfismos da IL-10 em Santa Catarina. Nossos resultados são promissores, entretanto, o papel da IL-10 no câncer de mama na população brasileira ainda não está claro e são necessários mais estudos para esclarecer essa relação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K; LICHTMAN, A; PILLAI, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 8 ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2015.
- AHMAD, N; AMMAR, A; STORR, S. J; et al. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.537-549, 2017.
- AKBULUT, H; TANG, Y; AKBULUT, K. G; et al. Chemotherapy targeted to cancer tissue potentiates antigen-specific immune response induced by vaccine for in vivo antigen loading and activation of dendritic cells. **Mol Ther**16(10):1753–1760, 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. 2015.**Cancerbasics**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 29 de abril de 2019.
- AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS.2017. **About breast cancer**.Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>>. Acesso em: 29 de abril de 2019.
- CARPI, A; NICOLINI, A; ANTONELLI, A; et al.. Cytokines in the management of high risk or advanced breast cancer: an update and expectation. **CurrCancerDrug Target** 9(8):888–903, 2009.
- CARREGARO, F. **Estudo de polimorfismos genéticos na susceptibilidade e na resposta à sepse**.2008. 34 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências Aplicada A Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.
- CHAVEY, C; BIBEAU, F; GOURGOU-BOURGADE, S; et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v.9, n.1, 2007.
- CINTRA, J. R. D;TEIXEIRA, M. T. B; DINIZ, R. W; et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 58, n. 2, p.178-187, 2012.
- CRUVINEL, W. M; JÚNIO, D. M; ARAÚJO, J. A. P; et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **RevBrasReumatol**, São Paulo, v. 4, n. 50, p.434-61, 2010.
- DENNING, T. L; KIM, G; KRONENBERG, M. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis. **J Immunol**; 174:7487–7491, 2005.

DEANE, K. D; EL-GABALAWY, H. Pathogenesis and prevention of rheumatic disease: focus on preclinical RA and SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.212-228, 2014.

DIRAT, B; BOCHET, L; ESCOURROU, G; et al. Unraveling the Obesity and Breast Cancer Links: A Role for Cancer-Associated Adipocytes? **Adipose Tissue Development**, [s.l.], p.45-52, 2010.

EDWARDS-SMITH, C. J. JONSSON, R. J; PURDIE, D. M; et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.526-530, 1999.

FERNÁNDEZ, R. P;KASKI, J. C. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. **Rev EspCardiol**. 2002; 55(7): 738-50

FIORENTINO, D. F; BOND, M. W; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **JExp Med**; 170(6): 2081–2095, 1989.

GAJEWSKI, T. F; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J Immunol**; 140: 4245-4252, 1988.

GATEVA, V; SANDLING, J. K; HOM, G; et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 41, n. 11, p.1228-1233, 2009.

GOURRAUD, P. A; BARNETCHE, T; VIDAN-JERAS, B; et al. Introduction to statistical analysis of population data in immunogenetics. **Transplant Immunology**, v. 14, p. 245-253, 2005.

HAMIDULLAH, B; CHANGKIJA, R; KONWA, R. Role of interleukin-10 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, 133, pp. 11-21, 2012.

HEALTH DECISION STRATEGIES. **EpiMax Table Calculator**. Disponível em: <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso em: 28 de setembro de 2018.

HOFMANN, S. R; RÖSEN-WOLFF, A; TSOKOS, G. C; et al. Biological properties and regulation of IL-10 related cytokines and their contribution to autoimmune disease and tissue injury. **Clinical Immunology** 143, 116-127, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer** / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 128 p.; 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2019e. **Causas e prevenção: peso corporal**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/prevencao-e-fatores-de-risco/peso-corporal>> Acesso em: junho de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2018b. **Detecção precoce do câncer de mama**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/acoes-de-controle/deteccao-precoce>> Acesso em: 21 de junho de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2017. **Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>> Acesso em: 27 de junho de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2019d. **Fatores de risco para o câncer de mama**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/fatores-de-risco>> Acesso em: 21 de junho de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2019b. **O que é câncer?**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>> Acesso em: 25 de junho de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2018a. **Tipos de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>> Acesso em: 27 de junho de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2019c. **Tipos de câncer: Câncer de mama**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>> Acesso em: 26 de junho de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Todo tumor é câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/todo-tumor-e-cancer>>. Acesso em: 27 de junho de 2019a.

INSTITUTO OCONGUIA. **Fatores de risco do câncer de mama**. 2017. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer-de-mama/1411/31/>> Acesso em: 25 de junho de 2019.

IYER, S. S; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Crit Rev Immunol**, v. 1, n. 32, p.23-63, 2012.

JÄGER, A.; KUCHROO, V. K. Effector and Regulatory T-cell Subsets in Autoimmunity and Tissue Inflammation. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.173-184, 2010.

JOCHEM, T.V. **A epopéia de uma imigração**. Água Mornas: edição do autor, 1997.

JOG, N. R; JAMES, J. A. Biomarkers in connective tissue diseases. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [s.l.], v. 140, n. 6, p.1473-1483, 2017.

JOHANNESON, B; LIMA, G; VON SALOMÉ, J; et al. A Major Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus Maps to Chromosome 1q31. **The American Journal Of Human Genetics**, [s.l.], v. 71, n. 5, p.1060-1071, 2002.

JOHNSON, K.C. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v.117, p.619-28, 2005.

KATZKE, V.A; KAAKS, R; KÜHN, T. Lifestyle and cancer risk. **Cancer Journal**, v.21, n.2, p.104-10, 2015.

KINGKEOW, D. MANEEKARN, N; MACNICHOLL, J. M; et al. Frequencies of IL10 SNP genotypes by multiplex PCRSSP and their association with viral load and CD4 counts in HIV-1-infected Thais. **Asian Pac J Allergy Immunol**, Seattle, n. 29, p.94-101, 2010.

KOROBENIKOVA, E; MYRZALIYEVA, D; UGENSKIENE, R; et al. The prognostic value of IL10 and TNF alpha functional polymorphisms in premenopausal early-stage breast cancer patients. **Bmc Genetics**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.75-79, 2015.

LAHIRI, D. K; NURNBERGER, J. I. **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies**. *Nucleic acids research*, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LINDENAU, J. D; SALZANO, F. M; GUIMARÃES, L. S; et al. Distribution patterns of variability for 18 immune system genes in Amerindians - relationship with history and epidemiology. **Tissue Antigens**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.177-185, 2013.

LLANES-FERNANDEZ, L; ALVAREZ-GOYANES, R.I, ARANGO-PRADO MDEL, C; et al. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. **Breast** 15(4):482-489, 2006.

LONG, J.C. Multiple Locus Haplotype Analysis. Software and documentation distributed by the author. Laboratory of Neurogenetics, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, National Institutes of Health, Bethesda, 1999.

LV, T-T; WU, J; LI, J; et al. Association of interleukin-10 gene single nucleotide polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Chinese population. **Gene**, [s.l.], v. 642, p.549-554, 2018.

LYON, D. E; MCCAIN, N. L; WALTER, J. Cytokine comparison between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. **Nurs Res** 57(1):51-58, 2008.

MAGALHÃES, C. A; CARVALHO, M. D. G; SOUSA, L. P; et al. Alzheimer's disease and cytokine IL-10 gene polymorphisms: is there an association?. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, [s.l.], v. 75, n. 9, p.649-656, 2017.

MAURI, C; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annu Rev Immunol.**; 30:221-241, 2012.

MILLER, S.A; DYKES, D. D; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. **Nucleic acids research**, v.16, n. 3, p. 1215, 1988.

MOCELLIN, S; MARINCOLA, F; ROSSI, C. R; et al. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. **Cytokine Growth Factor Rev** 15: 61–76, 2004.

MOCELLIN, S; PANELLI, M. C; WANG, E; et al. M. The dual role of IL-10. **Trends Immunol** 24: 36–43, 2003.

MOORE, K. W; DE WAAL MALEFYT, R; COFFMAN, R. L; et al. interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.683-765, 2001.

MOSMANN, T. R; COFFMAN, R L. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.145-173, 1989.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS - WHO. **Câncer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 28 de abril de 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS – WHO. 2018a. **Câncer**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> Acesso em: 27 de junho de 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS - WHO. 2018b. **Brasil**. Disponível em: <https://www.who.int/nmh/countries/bra_en.pdf> Acesso em: 27 de junho de 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE – OPAS – PAHO. **Programa de câncer**. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292:cancer-program&Itemid=3904&lang=en> Acesso em: 27 de junho de 2019.

PINHO, V. F. S; COUTINHO, E. S. F. Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.351-360, 2005.

PRADO, W. L; LOFRANO, M. C; OYAMA, L. M, et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Rev Bras Med Esporte.**; 15(5): 378-83, 2009.

RAKHA, E. A; EL-SAYED, M. E; LEE, A. H; et al. O. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, n.19, p.3153-8, 2008.

RAO, V. S; DYER, C. E; JAMEEL, J. K; et al. Potential prognostic and therapeutic roles for cytokines in breast cancer (Review). **Oncol Rep** 15(1):179–185, 2006.

SAXENA, A; KHOSRAVIANI, S; NOEL, S; et al. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**, [s.l.], v. 74, n. 1, p.27-34, 2015.

SCOTT, I. C.; SEEGOBIN, S. D.; STEER, S.; et al. Predicting the Risk of Rheumatoid Arthritis and Its Age of Onset through Modelling Genetic Risk Variants with Smoking. **PLoS Genetics**, v.9, n.9, 2013.

SINGLE, R. M.; MARTIN, M. P.; MEYER, D; et al. Methods for assessing gene content diversity of KIR with examples from a global set of populations. **Immunogenetics**, v. 60, p. 711-725, 2008.

SMYTH, M. J; CRETNEY, E; KERSHAW, M. H; et al. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. **ImmunolRev** 202:275–293, 2004.

SIPPEL, C; BASTIAN, R. M. A; GIOVANELLA, J; et al. Processos inflamatórios da obesidade. **Revista de Atenção à Saúde**, Lajeado-rs, v. 12, n. 42, p.48-56, 2014.

VAZ, A.J; TAKEI, K; BUENO, E. C. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**- Série Ciências Farmacêuticas - 1ª Ed., 2007.

WESTENDORP, R. G. J; LANGERMANS, J. A.M; HUIZINGA, T. W. J; et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **The Lancet** 349, 170-173, 1997.

WATTANATHUM, A; MANOCHA, S; GROSHAUS, H; et al. Interleukin-10 Haplotype Associated With Increased Mortality in Critically Ill Patients With Sepsis From Pneumonia But Not in Patients With Extrapulmonary Sepsis. **Chest**, [s.l.], v. 128, n. 3, p.1690-1698, 2005.