



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

GENILDA CASTRO DE OMENA NETA

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE GENES DO SISTEMA IMUNE EM
DIFERENTES SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA**

MACEIÓ

2019

GENILDA CASTRO DE OMENA NETA

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE GENES DO SISTEMA IMUNE EM
DIFERENTES SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof.º Dr.º Carlos Alberto de Carvalho Fraga

MACEIÓ

2019

**Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

O55a Omena Neta, Genilda Castro de.
Análise transcriptômica de genes do sistema imune em
diferentes subtipos de câncer de mama / Genilda Castro de Omena
Neta. – 2020.
117 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto de Carvalho Fraga.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) –
Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió,
2019.

Bibliografia: f. 102-117.

1. Neoplasias da mama. 2. Macrófagos. 3. Neutrófilos. 4. Neuropeptídeos.
5. Células receptoras sensoriais. 6. Sobrevida. 7. Biologia computacional. I.
Título.

CDU: 618.19-006

Folha de Aprovação

AUTOR: GENILDA CASTRO DE OMENA NETA

Análise transcriptômica de genes do sistema imune em diferentes subtipos de câncer de mama/ Dissertação de mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Alagoas

Carlos Alberto de Carvalho Fraga

Prof. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga (UFAL) - Orientador

Banca Examinadora:

Livia Andressa Silva do Carmo

Profª. Dra.. Livia Andressa Silva do Carmo (UFAL) - Membro Externo

2 Carolinne de Sales Marques

Profª. Dra. Carolinne de Sales Marques (UFAL) - Membro Interno

Carlos Alberto de Carvalho Fraga

Prof. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga (UFAL) - Membro Interno

Aos meus pais Amaro José Castro de Omena e Givônia Bazílio de Omena (*in memoriam*),
meus irmãos, sobrinhos e o meu companheiro Araken Cavalcante Neto pelo incentivo e
compreensão durante toda a jornada do mestrado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Amaro José Castro de Omena e Givônia Bazílio de Omena (*in memoriam*), irmãos e sobrinhos pelo apoio e incentivo, em especial a minha mãe que deixou o legado da educação para que eu pudesse chegar até aqui;

Ao meu companheiro Araken Cavalcante Neto por compreender a minha ausência, tocar pelo meu sucesso e sempre está ao meu lado em todos os momentos ao longo dessa jornada;

Ao Instituto Federal de Alagoas – Campus Maceió e Campus Satuba por flexibilizar a minha carga horária para que fosse possível participar das disciplinas e realizar os experimentos do meu projeto de dissertação;

A Universidade Federal de Alagoas e ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade do meu aperfeiçoamento e crescimento pessoal e profissional;

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Carlos Alberto de Carvalho Fraga pelo acolhimento, paciência, incentivo, dedicação e amizade construída durante essa etapa;

Aos membros da banca de qualificação e defesa, por aceitar o convite e pelas considerações e sugestões valiosas;

Aos colaboradores (docentes e discentes) do meu orientador por contribuírem direta e indiretamente com a minha dissertação;

Aos meus colegas do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular por compartilhar experiências comigo;

Aos Professores do Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular por contribuírem para a minha formação profissional, apoio e incentivo;

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a execução desse trabalho, o meu muito obrigada.

"Ciência é conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada".

(Immanuel Kant)

RESUMO

O Câncer de mama (CM) é o tipo de câncer com maior incidência nas mulheres no mundo. Ele apresenta quatro subtipos moleculares (Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo/Basal) e cada um deles têm prognósticos diferentes e necessidade de intervenções que sejam eficientes no tratamento e aumentem a sobrevida dos pacientes. Nesse sentido a avaliação da expressão gênica e proteica nos tecidos mamários neoplásicos dos subtipos de CM utilizando a bioinformática translacional (BT) permite uma análise ampla de diversos bancos de dados. A BT atua trazendo conhecimento biológico que pode ser aplicado na clínica a partir de dados genômicos, proteômicos, histológicos e clínicos de pacientes com CM. O objetivo deste trabalho é identificar o perfil imunológico através da expressão gênica e proteica nos subtipos moleculares de câncer de mama utilizando ferramentas de bioinformática. A metodologia utilizada envolveu diversas ferramentas computacionais que permitiram a coleta de dados em bancos de dados (Atlas Genômico do Câncer -TCGA, Entrez Gene do NCBI, GeneCards, Atlas Proteômico do Câncer -TCPA, DAVID) e as análises (diagrama de Venn, Enciclopédia de Genes e Genomas -KEGG, TCGAbiolinks, Recurso de Estimativa de Células Imunes do Tumor -TIMER, Predição de Dados Clínicos de Perfis Genômicos - PRECOG). Nas análises estatísticas foi utilizado o Software GraphPad Prism versão 7, o teste Two-Way ANOVA bidirecional e o teste t bicaudal não pareado. A análise da expressão de genes diferencialmente expressos (GDEs) associados a vias metabólicas do câncer foi identificado genes expressos exclusivamente em cada subtipo quando comparado com o tecido mamário normal: *Cd38* no basal, *ErbB2* no Her2 e *Esr1* e *Pgr* nos luminais. Na análise de células imunes foi encontrado macrófagos M1 nos subtipos de pior prognóstico (basal e HER2) e M2 naqueles de melhor prognóstico (luminal A e luminal B). O genes associados as resposta Thelper1, Thelper2, Thelper17 e Treg quantitativamente não determinaram o tipo de resposta imune. No entanto, o subtipo basal apresentou mais genes associados a resposta Treg quando comparado aos outros subtipos. Na avaliação dos genes dos tipo celulares (macrófagos, neutrófilos, neuropeptídeos e neuroreceptores) foi identificados genes com impacto na sobrevida e alguns que também estavam associados a presença ou ausência de neutrófilos, como *Lrp2*, *Serpinal1*, *Cxcl10* e *Qrfpr*, e as proteínas associadas à imunossupressão, como PDL1, que foram mais expressas no basal quando comparada com os outros subtipos de CM e àquelas associadas as vias que estimulam a carcinogênese e/ou desregulação da proliferação celular, como IRS1 e AKT que foram mais expressas nos tecido mamários neoplásicos dos subtipos luminais e basal em relação aos outros subtipos, respectivamente. Portanto, os genes e proteínas que tiveram impacto na sobrevida e/ou interferem por algum mecanismo no recrutamento das células imunes encontradas no microambiente tumoral podem ser alvo de estudos *in vitro* e *in vivo* que possam elucidar os mecanismos metabólicos. Sendo confirmado os resultados desse estudo, esses genes e proteínas podem ser novos marcadores do CM e possibilitar o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes.

Palavras-chaves: Subtipos de câncer de mama; Macrófagos, Neutrófilos, Neuropeptídeos; Neuroreceptores, Sobrevida, Bioinformática.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the type of cancer with the highest incidence in women worldwide. It has four molecular subtypes (Luminal A, Luminal B, HER2 and Triple Negative / Basal) and each of them has different prognoses and needs for interventions that are efficient in the treatment and increase patient survival. In this sense, the evaluation of gene and protein expression in neoplastic breast tissues of the CM subtypes using translational bioinformatics (TB) allows a wide analysis of several databases. TB works by bringing biological knowledge that can be applied in the clinic based on genomic, proteomic, histological and clinical data of patients with CM. The objective of this work is to identify the immunological profile through gene and protein expression in the molecular subtypes of breast cancer using bioinformatics tools. The methodology used involved several computational tools that allowed data collection in databases (Genomic Cancer Atlas -TCGA, Entrez Gene of NCBI, GeneCards, Proteomic Cancer Atlas -TCPA, DAVID) and analyzes (Venn diagram, Encyclopedia of Genes and Genomes -KEGG, TCGAbiolinks, Tumor Immune Cell Estimation Resource - TIMER, Prediction of Clinical Data of Genomic Profiles - PRECOG). In the statistical analyzes, the GraphPad Prism Software version 7, the Two-Way ANOVA two-way test and the two-tailed unpaired t test were used. The analysis of the differentially expressed genes (GDEs) associated with cancer metabolic pathways, genes expressed exclusively in each subtype were identified when compared to normal breast tissue: Cd38 at basal, Erbb2 at Her2 and Esr1 and Pgr in the luminal. In the analysis of immune cells, M1 macrophages were found in the subtypes with the worst prognosis (baseline and HER2) and M2 in those with the best prognosis (luminal A and luminal B). The genes associated with the Thelper1, Thelper2, Thelper17 and Treg responses did not quantitatively determine the type of immune response. However, the basal subtype had more genes associated with the Treg response when compared to the other subtypes. In the evaluation of cell type genes (macrophages, neutrophils, neuropeptides and neuroreceptors), genes with impact on survival were identified and some that were also associated with the presence or absence of neutrophils, such as Lrp2, Serpina1, Cxcl10 and Qrfpr, and the proteins associated with immunosuppression, such as PDL1, which were more expressed at basal when compared with the other subtypes of CM and those associated with the pathways that stimulate carcinogenesis and/or dysregulation of cell proliferation, such as IRS1 and AKT that were more expressed in the neoplastic breast tissues of the luminal and basal subtypes in relation to the other subtypes, respectively. Therefore, the genes and proteins that had an impact on survival and/or interfere by some mechanism in the recruitment of immune cells found in the tumor microenvironment can be the target of *in vitro* and *in vivo* studies that can elucidate the metabolic mechanisms. With the results of this study confirmed, these genes and proteins can be new markers of CM and enable the development of new, more effective therapies.

Keywords: Subtype of breast cancer; Macrophages, Neutrophils, Neuropeptides; Neuroreceptors, Survival, Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Constituição anatômica da mama.	25
Figura 2 - Carcinoma Lobular <i>in situ</i> (A) e Carcinoma Ductal <i>in situ</i> (B).....	26
Figura 3 - Sobrevida do câncer de mama (CM) por subtipo e estágio do tumor.....	29
Figura 4 - Processo de imunoeedição do câncer.....	30
Figura 5 - Relação entre os subtipos moleculares de CM e as respostas imunes inatas e adaptativas das células imunes.....	34
Figura 6 - Papel desempenhado pelos linfócitos T mediante o estímulo de antígenos liberados pela célula tumoral	35
Figura 7 - Polarização dos macrófagos mediante os estímulos das células neoplásicas.....	38
Figura 8 - Plasticidade dos neutrófilos associados ao tumor (TANs) no câncer.....	40
Figura 9 - Barreira entre os dados da pesquisa básica e aplicação usando a bioinformática translacional (TB).....	43
Figura 10 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2+ com basal.....	50
Figura 11 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal A com basal.....	51
Figura 12 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal B com basal.....	52
Figura 13 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2 com luminal A.....	53
Figura 14 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2 com luminal B.....	54
Figura 15 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal B com luminal A.....	55
Figura 16 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado basal com normal.....	56
Figura 17 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2 com normal.....	57

Figura 18 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal A com normal.....	58
Figura 19 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal B com normal.....	59
Figura 20 - População relativa da polarização dos macrófagos M0 (A), M1 (B) e M2 (C) presente no microambiente tumoral nos subtipos de câncer de mama (CM) determinado pelo algoritmo CIBERSORT.....	61
Figura 21 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama luminal A.....	62
Figura 22 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama luminal B.....	63
Figura 23 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama HER2.....	64
Figura 24 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama basal.....	65
Figura 25 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama luminal A.....	66
Figura 26 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama luminal B.....	67
Figura 27 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama HER2.....	68

Figura 28 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama basal.....	69
Figura 29 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta expressão dos genes dos subtipos de CM com as subpopulações de neutrófilos N1 e N2.....	70
Figura 30 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta expressão dos genes dos subtipos de CM com os dos neuropeptídeos e neuroreceptores.....	71
Figura 31 - Análise da sobrevida do gene <i>Serpina1</i> expresso pelo neutrófilo N2 nos subtipos luminais.....	72
Figura 32 - Análise da sobrevida do gene <i>Lrp2</i> expresso pelos neuroreceptores no câncer de mama.....	72
Figura 33 - Análise da sobrevida do gene <i>Chga</i> (A, B) expresso pelos neuropeptídeos nos subtipos luminais (A) e no câncer de mama (B).....	73
Figura 34 - Análise da sobrevida do gene <i>Gnrh2</i> expresso pelo neuropeptídeo nos subtipos luminais.....	74
Figura 35 - Análise da sobrevida do gene <i>Calcr</i> expresso pelo neuroreceptor no câncer de mama.....	74
Figura 36 - Análise da sobrevida do gene <i>Nxph1</i> (A) e <i>Prl</i> (B) expresso pelo neuropeptídeos no câncer de mama.....	75
Figura 37 - Análise da sobrevida do gene <i>Galr1</i> expresso pelo neuroreceptor no câncer de mama.....	76
Figura 38 - Análise da sobrevida dos genes <i>Cxcl10</i> (A), <i>Cxcl11</i> (B), <i>Ccl8</i> (C), <i>Tnf</i> (D) expresso pelos macrófagos M1 no câncer de mama.....	77
Figura 39 - Análise da sobrevida dos genes <i>Ccl13</i> (A) e <i>Ccl24</i> (B) expresso pelos macrófagos M2a no câncer de mama.....	78
Figura 40 - Análise da sobrevida do gene <i>Cxcl1</i> expresso pelos macrófagos M2b e neutrófilos N1 no subtipo de câncer de mama basal.....	79
Figura 41 - Análise da sobrevida do gene <i>Pla2g4</i> expresso pelos neutrófilos N1 no subtipo de	

câncer de mama basal.....	79
Figura 42 - Análise da sobrevida do gene <i>Cxcl10</i> expresso pelos neutrófilos N1 no câncer de mama.....	80
Figura 43 - Análise da sobrevida do gene <i>Nmb</i> expresso por neuropeptídeos no câncer de mama.....	80
Figura 44 - Análise da sobrevida do gene <i>NPR3</i> (A), <i>Mas1</i> (B) e <i>QRFPR</i> (C) expresso por neuroreceptores no câncer de mama (A, B) e no subtipo de câncer de mama basal (C).....	81
Figura 45 - Expressão da proteína PD-L1 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína PD-L1 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).....	82
Figura 46 - Expressão da proteína IRS1 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína IRS1 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).....	83
Figura 47 - Expressão da proteína AKT_pS473 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína AKT_pS473 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).....	84
Figura 48 - Expressão da proteína AKT_pT308 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína AKT_pT308 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).....	85
Figura 49 - Expressão da proteína PRAS40_pT246 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína PRAS40_pT246 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal	

B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).....	86
Figura 50 - Correlação entre os genes <i>Serpina 1</i> e <i>Lrp2</i> expressos pelos neutrófilos N2 e neuroreceptor, respectivamente, nos subtipos de CM luminais.....	87
Figura 51 - Correlação entre o gene <i>Serpina 1</i> , macrófagos e neutrófilos nos subtipos luminais.....	88
Figura 52 - Correlação entre o gene <i>Lrp2</i> , macrófagos e neutrófilos nos subtipos luminais.....	88
Figura 53 - Correlação entre o gene <i>Irs1</i> com o gene <i>Lrp2</i> nos subtipos luminais.....	89
Figura 54 - Correlação entre os genes <i>Cxcl10</i> e <i>Qrfpr</i> expressos pelos neutrófilos M1/N1 e neuroreceptor, respectivamente, nos subtipos de CM basal.....	90
Figura 55 - Correlação entre o gene <i>Cxcl10</i> , macrófagos e neutrófilos no subtipo de CM basal.....	91
Figura 56 - Correlação entre o gene <i>Qrfpr</i> , macrófagos e neutrófilos no subtipo de CM basal.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Marcadores dos subtipos moleculares de câncer de mama (CM).	27
Quadro 2 - Características dos genes selecionados para a comparação entre os subtipos de câncer de mama.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Células imunes no tumor de câncer de mama.	60
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAT: Antígeno Associado ao Tumor

AMIA: Associação de Informática Médica Americana

BB: Bombesina

CAA: Células Apresentadoras de Antígeno

CDs: Células Dendríticas

CDIS: Carcinoma Ductal *in situ*

CDMO: Células Derivadas da Medula Óssea

CLIS: Carcinoma Lobular *in situ*

CM: Câncer de Mama

CTLA-4: Proteína 4 Associada ao Linfócito T Citotóxico

CSDMs: Células Supressoras Derivadas de Mielóides

ELT: Estruturas Linfóides Terciárias

ER: Receptor de Estrôgeno

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

GABA: Ácido Glutamato-Gama-Aminobutírico

GDEs: Genes Diferencialmente Expressos

GLOBOCAN: Observatório Global do Câncer

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias Granulócitos e Macrófagos

HER2: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

IDO: Indoleamina 2,3-desoxigenase

IFN: Interferon

IL: Interleucina

KEGG: Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto

M: Macrófago

MDSC: Célula supressora derivada da linhagem mielóide

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MCP: Proteína Quimiotáctica de Monócitos

NPY: Neuropeptídeo Y

NTS: Neurotensina

NKG2D: grupo NK 2, membro D

NKT: Células T Natural Killer

NK: Célula Natural Killer

PD-1: Proteína 1 de Morte Celular Programada

PD-L1: Ligante 1 da Morte Celular Programada

PIV: Peptídeo Intestinal Vasoativo

PR: Receptor de Progesterona

PRECOG: Predição de Dados Clínicos de Perfis Genômicos

RAPGs: Receptores Acoplados à proteína G

RPPA: Análise de Matriz Reversa de Proteínas em Fase Reversa

SP: Substância P

TAM: Macrófagos Associados ao Tumor

TAN : Neutrófilos Associado ao Tumor

TB: Bioinformática Translacional

TCGA: Atlas do Genoma do Câncer

TCPA: Atlas Proteômico do Câncer

TFH: Células Auxiliares Foliculares

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral Beta

TILs: Linfócitos Infiltrados no Tumor

TIMER: Recurso de Estimativa de Células Imunes do Tumor

TNBC: Câncer de mama Triplo Negativo

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNM: Extensão do tumor primário (T), metástase em linfonodo regional (N) e metástase à distância (M)

TRAIL: Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

TREGs: Células T reguladoras

VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VEGFR-1: Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Câncer de Mama (CM)	24
2.2 Imunidade Tumoral.....	30
2.3 Perfil de Linfócitos Infiltrados no Tumor (TILs) nos Subtipos Moleculares do Câncer de Mama.....	33
2.4 Resposta Imune Th1, Th2, Th17 e Treg no Câncer.....	35
2.5 Polarização dos Macrófagos.....	37
2.6 Polarização dos Neutrófilos.....	39
2.7 Neuropeptídeos, Sistema Imune e Câncer.....	40
2.8 Bioinformática Translacional no Estudo do Câncer.....	42
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
5. RESULTADOS	48
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	102

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais incidente entre as mulheres, com cerca de 2,1 milhões de novos casos anuais no mundo. Além disso, embora seja considerado um câncer com bom prognóstico, se detectado precocemente, o CM continua sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (VERMA et al., 2012). Apesar dos homens também serem diagnosticados com CM, a incidência é muito baixa em comparação com as mulheres (LOSURDO et al., 2017).

Em 2018, estima-se que 627.000 mulheres morreram de CM no mundo, representando aproximadamente 15% de todas as mortes por câncer (WHO, 2018). Embora as taxas de CM sejam mais altas entre as mulheres nas regiões mais desenvolvidas devido ao estilo de vida, as taxas estão aumentando em quase todas as regiões do mundo (WHO, 2018). Segundo o banco de dados do Observatório Global do Câncer - GLOBOCAN (WHO, 2018), estima-se que em 2040 o CM atingirá 3 milhões de pessoas no mundo e, aproximadamente 133 mil pessoas no Brasil. Esses números refletem a magnitude da incidência do CM, seus efeitos na sociedade mundial e a necessidade de urgência para medidas preventivas e de tratamento (TAO et al., 2014).

Existem vários fatores que têm sido associados ao aumento ou diminuição do risco de CM (SUBRAMANI; LAKSHMANASWAMY, 2017). A incidência de CM aumenta com a idade, duplicando a cada 10 anos até a menopausa (MCPHERSON et al., 2000). As taxas de incidência de CM aumentam rapidamente entre 45 e 50 anos, mas diminui após os 50 anos de idade (LACEY JR. et al., 2013). Essa diminuição ocorre devido a redução à exposição aos hormônios reprodutivos, fenômeno relacionado à menopausa (LACEY JR. et al., 2013). Além disso, as predisposições ao CM são o histórico familiar, geralmente portadoras dos genes BRCA 1 ou BRCA2, alterações benignas da mama, fatores reprodutivos (idade da menarca, menopausa e primeira gravidez), fatores hormonais (tempo de exposição aos hormônios exógenos e endógenos), estilo de vida e exposição à radiação (MCPHERSON et al., 2000, VOGEL, 2018, LACEY JR. et al., 2013).

O desenvolvimento de tumores malignos é controlado por um sistema biológico complexo que depende de anormalidades genéticas, bem como a interação entre células tumorais, células do estroma e o sítio inflamatório (DENKERT, 2018). O CM é frequentemente iniciado por fatores genéticos e epigenéticos, alterações nos genes que regulam a função das células do epitélio mamário (COUSSENS; POLLARD, 2011). A

transição do tecido mamário clinicamente normal ao tecido neoplásico é tipicamente acompanhado por um aumento de infiltrado de leucócitos, incluindo células mielóides, células B e células T CD8⁺ citotóxicas (HUSSEIN; HASSAN, 2006). O infiltrado imune celular encontrado no estroma circundante no CM, bem como no parênquima tumoral indica que o sistema imunológico identificou o câncer e ativou uma resposta imune contra o tumor (STANTON et al., 2018).

A interação do sistema imune com células tumorais no CM dá indícios de ser específica para o subtipo de CM (ROOIJEN et al., 2015). Quatro principais subtipos moleculares intrínsecos do CM (Luminal A, Luminal B, HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2) e Basal (CM Triplo Negativo - TNBC) foram caracterizados nos últimos 15 anos (PRAT et al., 2015). Eles diferem quanto ao infiltrado imunológico encontrado no tumor, no qual o TNBC é aquele que apresenta um maior infiltrado de células T e o maior número de mutações cujas proteínas anômalas podem ser detectadas pelo sistema imunológico (DISIS; STANTON, 2015).

Os linfócitos infiltrados nos tumores dos subtipos de CM variam em relação a quantidade e antigenicidade. Tanto a quantidade quanto a antigenicidade deles aumentam gradativamente do subtipo Luminal A, Luminal B, HER2 e Basal e está relacionado à proliferação das células tumorais (HAMMERL et al., 2018). Os tumores do subtipo luminal A têm mais células imunes inatas, enquanto que os subtipos luminal B, HER2 e basal são enriquecidos de células imunes adaptativas e células supressoras imunológicas (HAMMERL et al., 2018). A composição de células imunes infiltradas no tumor pode servir como um marcador prognóstico/preditivo para selecionar terapias (GALON et al., 2013).

A resposta imune contra o CM pode envolver um mecanismo pró-inflamatório no qual os linfócitos T-helper CD4⁺ (Th), denominados de Th1, secretam citocinas como interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) que ativam e melhoram a função lítica do linfócitos T CD8⁺ (DISIS; STANTON, 2015; PRUNERI et al., 2018). Essa função citolítica ocorre quando os receptores da superfície dos linfócitos T CD8⁺ se ligam na superfície da célula-alvo através da interação com o peptídeo antigênico contendo moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, ou induzem a senescência ou lise diretamente nas células-alvo através de uma série de reações enzimáticas (DISIS & STANTON, 2015, PRUNERI et al., 2018).

Dependendo do microambiente do tumor, a resposta imune pode envolver as células T

CD4 Th2 que expressam citocinas como a interleucina (IL)-10 e IL-6, que inibem a resposta Th1 (DISIS; STANTON, 2015). As células imunes inatas e níveis elevados de células T reguladoras (TREG) nesse tipo de microambiente secretam citocinas que inibem a função das células T CD8⁺ e evitam a sua migração para o tumor, produzindo apenas um número limitado e menos ativo de células T CD8⁺ disponíveis para induzir a regressão tumoral (DISIS; STANTON, 2015). Também pode ocorrer inibição da resposta imune quando ocorre a ligação do receptor da superfície das células T ativadas PD-1 (proteína 1 de morte celular programada) em PD-L1 (ligante da proteína 1 da morte celular programada) das células tumorais (ROOIJEN et al., 2015). Essa molécula assim como outras envolvidas no checkpoint inibitório em células cancerígenas são os alvos para a produção de anticorpos que auxiliem na ação das células imunes na regressão do tumor (LEE; CHOW, 2014).

Tendo em vista que a composição do microambiente tumoral interfere no tipo de resposta imune e, conseqüentemente, na abordagem terapêutica, foi proposto caracterizar o microambiente tumoral a nível celular e molecular de cada subtipo molecular de CM e inferir sobre o tipo de resposta imune mediante a análise da expressão gênica e proteica do tecido neoplásico mamário utilizando ferramentas de bioinformática que possibilitaram a identificação de marcadores moleculares para diagnóstico, predição e prognóstico nos subtipos de câncer de mama.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de mama (CM)

2.1.1 Incidência e mortalidade

O CM é o mais frequente diagnóstico de malignidade entre as mulheres no mundo com mais de 90.000 casos esperados em 2020 no Brasil, representando um aumento percentual de 5,4% com relação a 2018. Dentre os tipos de câncer mais comuns entre as mulheres, o CM lidera o ranking das estimativas de mortalidade responsável por mais de 18.000 mortes em 2018 no Brasil, representando cerca de 16.0% de todas as mortes relacionadas ao câncer em mulheres (WHO, 2018)

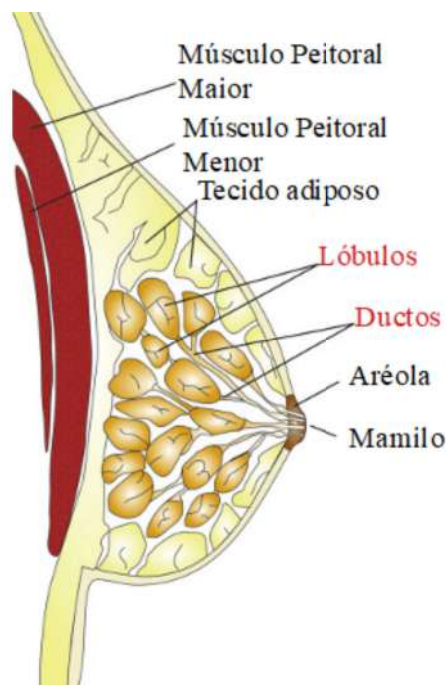
2.1.2 Fatores de risco

Os fatores de risco para o desenvolvimento do CM podem ser endógenos e exógenos. Os endógenos incluem nuliparidade, idade mais tardia da primeira gravidez (35 anos ou mais), não amamentação, menarca precoce, menopausa tardia, alta densidade óssea, mama densa, mutações dos genes que regulam o ciclo celular e mutações herdadas dos genes autossômicos dominantes BRCA1 e BRCA2 (PARSONS, 2005; SPICER, 2005; GOLDSTEIN; ZIEGFELD, 2011). Já os fatores exógenos, terapia de longo prazo de reposição hormonal (estrógeno e progesterona) em mulheres pós-menopausa, uso da pílula anticoncepcional, aumento da ingestão de álcool, fumar, obesidade pós-menopausa, redução de atividade física e exposição à radiação ionizante (PARSONS, 2005; SPICER, 2005; GOLDSTEIN; ZIEGFELD, 2011).

2.1.3 Classificação histológica e molecular

O CM é uma doença heterogênea que tem sido classificada pelas características histológicas e expressão de receptores nas células do tecido mamário (BURKE et al., 2019). A mama normal é constituída por um parênquima mamário composto de 15 a 20 lóbulos, que drena secreção em um sistema ductal que converge e se abre no mamilo (NAWAZ, 2011). O lóbulo é composto por um ducto terminal e muitos pequenos ductos (ou acini) no qual uma camada interna de epitélio cubóide ou células colunares e uma camada externa de células mioepiteliais alinham todos os ductos e dúctulos (DUCATMAN; WANG, 2009) (Figura.1). No CM áreas distintas da mama, como ductos, lóbulos e o tecido entre eles podem ser acometidos.

Figura 1 - Constituição anatômica da mama.



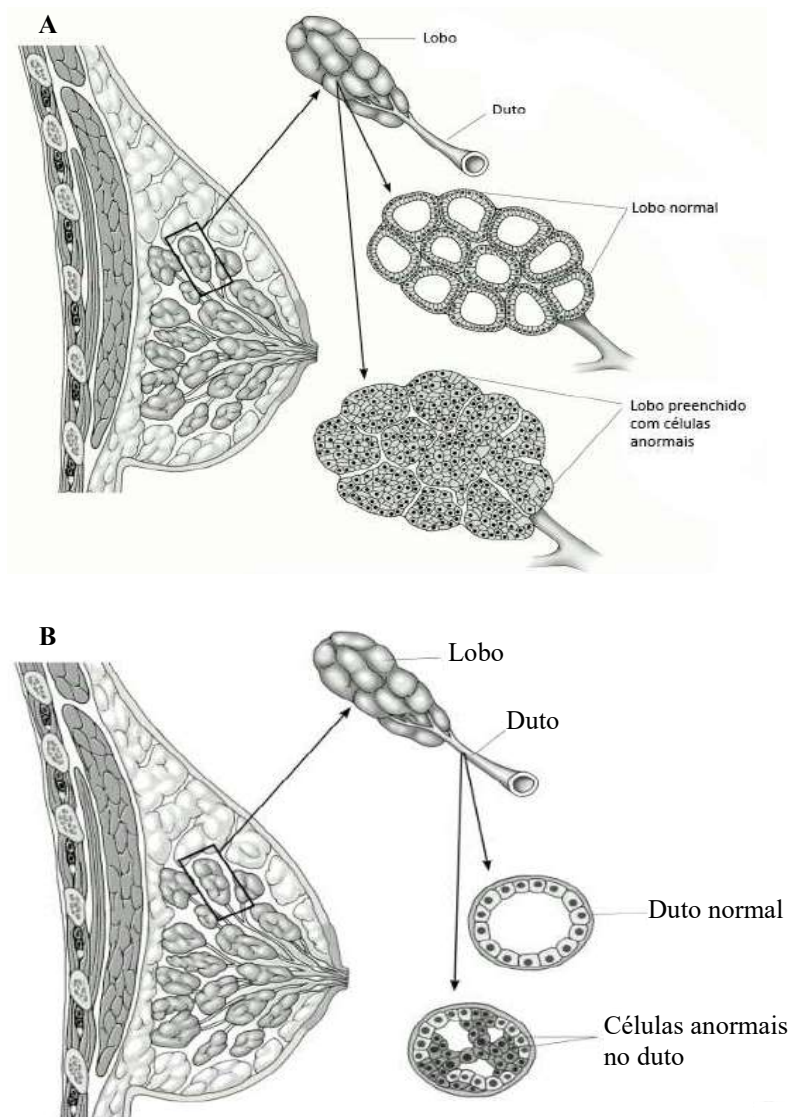
Fonte: Adaptação de FENG et al., 2018.

Histologicamente, o CM é determinado pelas células específicas que são afetadas. Desta forma, se for as células que alinham os lóbulos e ductos terminais responsáveis por secretar o leite é chamado de carcinoma. Já se for os componentes estromais que formam o arcabouço para outras estruturas da mama, no qual incluem miofibroblastos e células de vasos, sarcoma. E este último é a forma mais rara de câncer de mama, menos de 1% de câncer de mama primário. No entanto, esses grupos nem sempre são categorias suficientes, pois, em alguns casos, um único tumor de mama pode ser a combinação de diferentes tipos de células (FENG et al., 2018). A maioria dos CM são carcinomas e, devido aos diferentes subtipos, são caracterizados com base na invasividade relativa e local do tumor primário (FENG et al., 2018). A classificação adotada pelo critério patológico e invasividade é dividida em três grupos: não invasivos (*in situ*), invasivo e metastático (FENG et al., 2018).

Existem dois tipos de carcinoma não invasivo (*in situ*): o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (Figura 2) e o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (Figura 3) (SIBBERING; COURTNEY, 2019). O CLIS difere do CDIS, quanto à localização da proliferação das células epiteliais que no CLIS ocorre nos lóbulos da mama, enquanto que o CDIS, nos ductos da mama. Aspectos como a presença e distribuição de oncogenes específicos, proteínas

receptoras, medidas de ploidia e atividade proliferativa podem correlacionar com a maior probabilidade de um carcinoma não invasivo se tornar invasivo, como ocorre em alguns casos de CDIS e CLIS (KLIMBERG; BLAND, 2018). O tipo mais comum de carcinoma invasivo é o ductal, representando cerca de 75% de todos os cânceres de mama, e o segundo tipo é o lobular, representando outros 5% a 10% dos diagnósticos de câncer de mama (BURKE et al., 2019).

Figura 2 - Carcinoma Lobular *in situ* (A) e Carcinoma Ductal *in situ* (B).



Fonte: Adaptado de SAM; COLINS.

O CM é propenso à metástase para órgão distintos, incluindo ossos, pulmão, fígado e cérebro, que é denominada heterogeneidade metastática e ocasiona várias respostas ao tratamento e prognóstico do paciente (LIANG et al., 2019). Aproximadamente 75% dos

pacientes com CM em estágio avançado desenvolverão metástase, onde o osso é o local mais comum de metástase no CM e está associada a um pior prognóstico e expectativa de vida de 2 a 3 anos após o diagnóstico (TULOTTA; OTTEWELL, 2018).

Quanto a expressão de receptores, o CM é classificados em três subtipos moleculares, isto é, tumores luminais, HER2 e TNBC (basal). Os casos de CM luminais são positivos para receptores de hormônios (receptor de estrogênio e/ou receptor de progesterona (PR) positivo), e HER2 negativo ou positivo. Os CM com HER2+ são negativos para receptores de hormônios (ER e PR negativo) e o triplo negativo (basal) é negativo para todos os três receptores (DAI et al., 2015; SHERAFATIAN, 2018; HAMMERL et al., 2018) (Quadro 1). Embora os casos luminais possam ser ainda subdivididos em A e B luminal, os critérios para essa classificação não são consistentes. Níveis do marcador de proliferação Ki-67 e a taxa de crescimento são características que distinguem os subtipos luminal A e B (CHEANG et al., 2009; SHERAFATIAN, 2018; FRAGOMENI et al., 2018). Entre os cânceres de mama invasivos, 75% expressam o receptor estrogênico (ER) e 20 a 30% superexpressa o HER2 (VENEMA et al., 2019).

Quadro 1 - Marcadores dos subtipos moleculares de câncer de mama (CM).

SUBTIPOS MOLECULARES DE CM	MARCADORES
Luminal A	ER/PR+, Her2-, níveis baixos de Ki-67 (<15%)
Luminal B	ER/PR+, Her2+, níveis altos de Ki-67 (>15%)
Her2	ER/PR-, Her2+
Basal/Triplo Negativo	ER/PR-, Her2-

Fonte: Elaborado pela autora do trabalho, 2019.

2.1.4 Diagnóstico

Com relação ao diagnóstico, muitas mulheres com CM no estágio inicial não apresentam sintomas e, quando detectado, já se encontra num estágio avançado (PRABHA; SEKAR, 2017). Por isso, a relevância dos exames de triagem, com a frequência determinada pelos riscos dos pacientes. O diagnóstico precoce do CM é a chave para o sucesso no tratamento. Quatro procedimentos diagnósticos levam à detecção definitiva do CM: (1) exame clínico; (2) mamografia; (3) ultrassom da mama e (4) ressonância magnética da mama (BECKER, 2015). Além desses procedimentos, a biópsia é recomendada para caracterizar o

tipo de CM e detectar casos benignos de alterações histológicas (IRWIG et al., 2002).

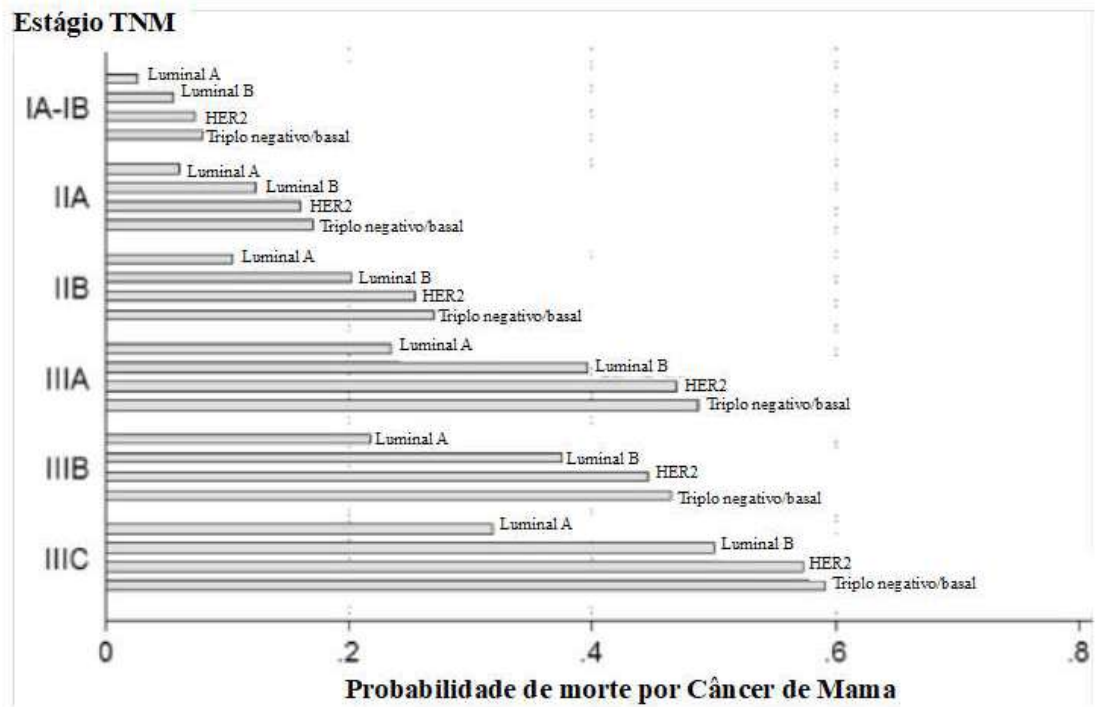
2.1.5 Tratamento

O tratamento do CM é proposto de acordo com os fatores prognósticos, como o perfil histológico, grau do tumor, tamanho do tumor, presença de metástases linfonodais e subtipo molecular (FRAGOMENI et al., 2018). As modalidades de tratamento para o câncer de mama podem incluir cirurgia, combinado com radioterapia, quimioterapia e/ou terapia hormonal (SANCHEZ et al., 2019). Recentemente, a imunoterapia tem sido combinada com a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapias molecularmente direcionadas no tratamento do CM (ESTEVA et al., 2019).

2.1.6 Sobrevida

Ess e colaboradores (2018) demonstraram que a mortalidade do CM bem como as taxas de recidiva aumentam com o estágio do diagnóstico (TNM - Extensão do tumor primário (T), metástase em linfonodo regional (N) e metástase à distância (M)) e diferem bastante entre os subtipos, mesmo no mesmo estágio. Nesse estudo os autores verificaram que os tumores do subtipo luminal A apresentaram menor risco do que os outros subtipos, e a diferença aumentou com o estágio do diagnóstico (Figura 3).

Figura 3 - Sobrevida do câncer de mama (CM) por subtipo e estágio do tumor.

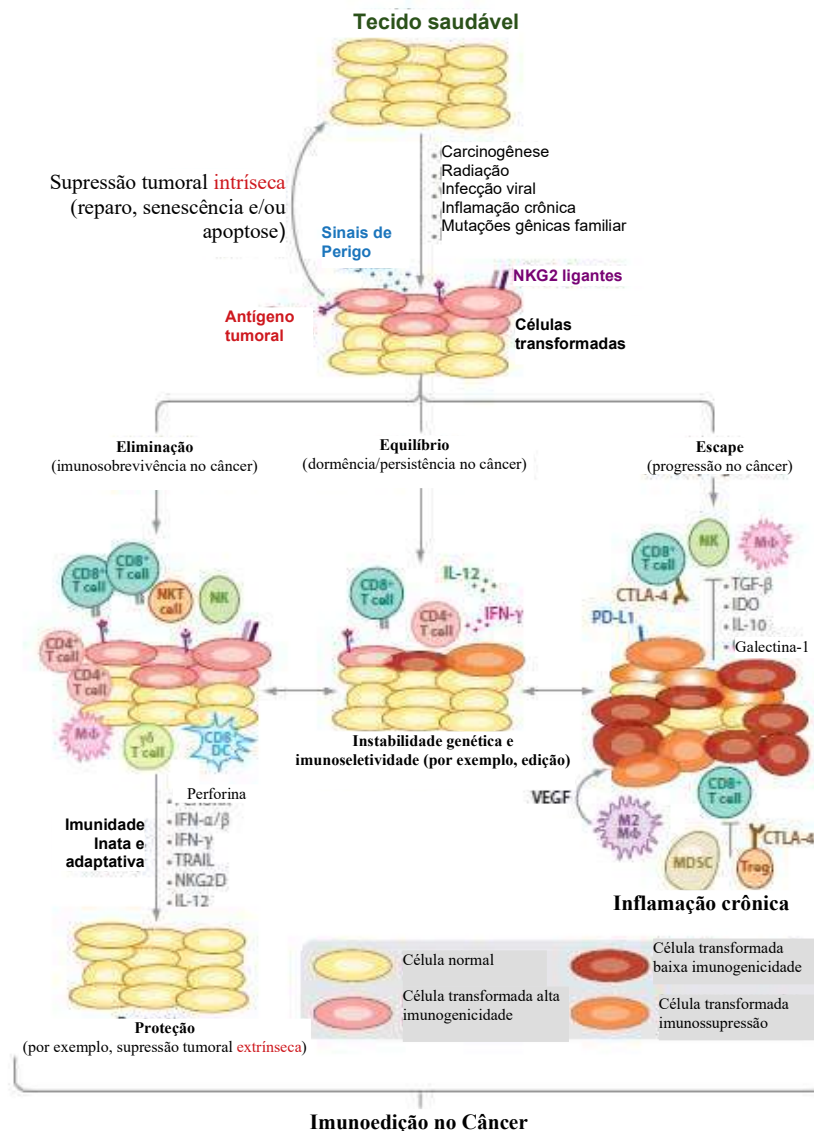


Fonte: Adaptação de ESS et al., 2018.

2.2 IMUNIDADE TUMORAL

A imunidade tumoral é o resultado de uma interação complexa entre células imunes e seus mediadores, células neoplásicas e seu microambiente, em um equilíbrio dinâmico entre supressão tumoral e tolerância imunológica (PRUNERI et al., 2018). O sistema imune não tem somente a habilidade de combater o crescimento tumoral, mas também eliminar o tumor através do processo chamado de imunoeedição (JIANG; SHAPIRO, 2014). Esse processo é compreendido por três fases: eliminação, equilíbrio e escape (VESELY et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4 - Processo de imunoeedição do câncer. Envolve 3 processos que funcionam independentemente ou em sequência para controlar a proliferação das células neoplásicas.



Fonte: Adaptação de VESELY et al., 2011.

A eliminação ocorre através da identificação e destruição de células transformadas nascentes por inflamação aguda inibindo o tumor, caracterizada pela infiltração de células efetoras do sistema imune inato e adaptativo, bem como a produção de citocinas inibidoras de tumor (JIANG; SHAPIRO, 2014). Durante essa fase ocorre lise das células cancerígenas via secreção de perforina de células imunes citolíticas (como células NK, células NKT, células $\gamma\delta$ T e células T CD8⁺) (VESELY et al., 2011; VAHIDIAN et al., 2019). Quando as células tumorais não são completamente eliminadas entram na fase de equilíbrio (VESELY et al., 2011).

Na fase de equilíbrio, o sistema imunológico adaptativo controla o crescimento líquido das células tumorais, que podem se tornar funcionalmente inativo e permanecer clinicamente inaparentes durante a vida do hospedeiro (VESELY et al., 2011). É considerada a mais longa das três fases do desenvolvimento do tumor e pode persistir por anos (RAO et al., 2018). Em algum momento, as células tumorais podem “escapar” desse período de equilíbrio e crescer mesmo na presença do sistema imunológico (RAO et al., 2018).

A fase de escape é caracterizada pelo crescimento de variantes de células tumorais que escaparam do reconhecimento imunológico por células efetoras (KIM, 2007). Neste processo, variantes tumorais que adquiriram insensibilidade à detecção imunológica e subsequente eliminação através de alterações epigenéticas e genéticas cresceram de forma descontrolada, resultando em lesões malignas clinicamente detectáveis (KIM, 2007).

A evasão imunológica por tumores pode ocorrer por alguns mecanismos: os tumores podem perder a expressão de antígenos que provocam respostas imunológicas; os antígenos tumorais podem estar inacessíveis ao sistema imunológico; tumores podem não induzir respostas fortes das células T efetoras, porque a maioria das células tumorais não expressa coestimuladores ou moléculas do MHC classe I; tumores podem produzir moléculas que inibem respostas imunológicas; produtos secretados de células tumorais podem suprimir respostas imunológicas antitumorais (ABBAS et al., 2012).

Após conseguirem escapar do reconhecimento imunológico, as células tumorais utilizam mecanismos para permitir um microambiente perfeito para o crescimento e disseminação do tumor. Nesse microambiente, as células tumorais crescem sem controle e secretam várias quimiocinas, fatores angiogênicos e fatores de crescimento que promovem a angiogênese e invasão tumoral (WELLENSTEIN; VISSER, 2018; BURKE et al., 2019). No caso do câncer de mama, durante o desenvolvimento do tumor, os Macrófagos Associados a

Tumores (TAM) infiltram-se no microambiente tumoral e estimulam a secreção do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) e matriz de metaloproteinases, que auxiliam na angiogênese e invasão tumoral (TSENG et al., 2020).

Além disso, o crescimento tumoral é mediado através de sinais emitidos pelas células imunes em seu microambiente. O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) controla a atividade dos macrófagos e, atua nos monócitos secretando o Receptor 1 do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGFR-1) solúvel para bloquear e desativar a angiogênese mediada por VEGF, e pode mediar a apresentação de antígenos dos macrófagos nas células tumorais induzindo uma imunidade específica do Antígeno Associado ao Tumor (AAT) no CM (LIN et al., 2006; EUBANK et al., 2009; BURKE et al., 2019).

As células dendríticas reconhecem os AATs no microambiente do tumor e depois migram para linfonodos para apresentar AATs para células T citotóxicas CD8⁺ e células T auxiliares CD4⁺, que então criam uma forte imunidade específica ao antígeno tumoral (PALUCKA et al., 2013). As células T auxiliares CD4⁺ promovem imunidade antitumoral por numerosos mecanismos que incluem melhorar a apresentação de antígenos, co-estimulação, homing (endereçoamento) de células T, ativação de células T e função efetora (MELSSSEN; SLINGLUFF, 2017). Esses efeitos são mediados em locais de priming de células T e no microambiente do tumor.

Quando as Células Apresentadoras de Antígeno (CAA) ou células tumorais são reconhecidas pela célula T auxiliar CD4⁺, elas podem produzir IFN- γ (MELSSSEN; SLINGLUFF, 2017). Dentro do microambiente tumoral, os efeitos do IFN- γ incluem a indução e aumento da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), classe I e classe II. Consequentemente, ocorre o reconhecimento da célula T CD8⁺ pelo MHC classe I, e CD4⁺ pelo MHC classe II (MELSSSEN; SLINGLUFF, 2017). Além da ação do IFN- γ , outras citocinas e quimiocinas estão envolvidas na ação anti/protumoral e estimulam respostas imunológicas diferentes dependendo do perfil de expressão delas.

O papel das citocinas na carcinogênese envolve a ativação de mecanismos efetores no sistema imunológico que podem limitar o crescimento do tumor, mas por outro lado, podem estar envolvidos na carcinogênese e transformação maligna, crescimento tumoral, invasão e metástase (SMYTH et al., 2004). As citocinas são produzidas pelo estroma do hospedeiro e

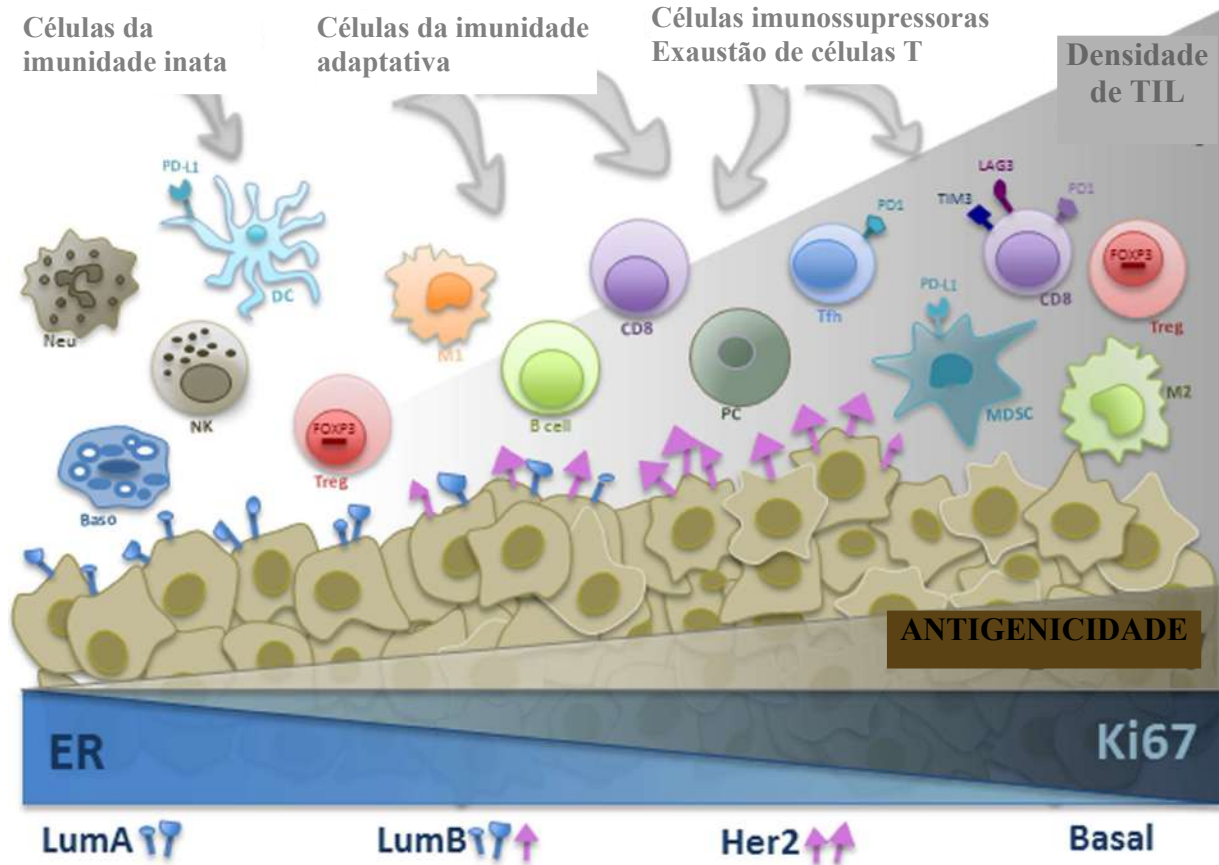
células imunes, em resposta a moléculas secretadas pelas células malignas ou como parte da inflamação que freqüentemente acompanha crescimento tumoral, assim como, as próprias células malignas produzem citocinas no mesmo ambiente (SMYTH et al., 2004).

Assim como as citocinas, as quimiocinas e seus receptores estão envolvido no apoio ao desenvolvimento de tumores e disseminação metastática por vários mecanismos complementares (KARIN, 2018): atrair células cancerosas para locais de disseminação metastática; mobilizar populações de células hematopoiéticas, também conhecidas como células derivadas da medula óssea (CDMO), da medula óssea para o sangue, seguido de sua colonização no local do tumor; controlar a função biológica destas CDMO no local do tumor; apoiar crescimento do tumor através de uma via autócrina, atuando como fatores de crescimento. No entanto, assim como as citocinas e outros mediadores imunes, as quimiocinas podem estar envolvidas em respostas imune tanto pró-tumoral quanto anti-tumoral.

2.3 PERFIL DE LINFÓCITOS INFILTRADOS NO TUMOR (TILs) NOS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

O infiltrado de células imunes nos tumores é frequentemente observado, mas a composição de células envolvidas na imunidade inata e adquirida varia entre os tipos de tumores ou locais dos órgãos (GALON et al., 2013). Os TILs são compostos principalmente por células T, M, células B, NK e outras células imunológicas (SALGADO et al., 2014; SOLINAS et al., 2017). A presença de um infiltrado imune rico em células imunes têm sido associado com melhor sobrevida e respostas a tratamentos, principalmente, nos subtipos moleculares de CM, TNBC/BC e HER2 (SALGADO et al., 2014). Já os tumores de mama luminal são caracterizados por baixos níveis de TILs estromal e intratumoral (SOLINAS et al., 2017). Isso ocorre devido a baixa imunogenicidade nos subtipos moleculares luminal A e luminal B em relação ao subtipos de CM, TNBC/BC e HER2 (SOLINAS et al., 2017; NAGARAJAN; MCARDLE, 2018; HARBECK et al., 2019) (Figura 5).

Figura 5 - Relação entre os subtipos moleculares do câncer de mama e as respostas imunes inatas e adaptativas das células imunes.



Fonte: Adaptado de HAMMERL et al., 2018.

A antigenicidade aumenta do luminal para o TNBC/BC no CM. A quantidade de TILs aumenta do luminal para o TNBC/BC no CM, e seu aumento está relacionado a proliferação de células tumorais (Ki67). Já com relação aos tipos de células imunes, os tumores luminal A são constituídos, principalmente, de células imunes inatas, enquanto que os luminal B, HER2 e TNBC/BC são muito proliferativos e ricos em células imunes adaptativas e células supressoras. Em particular, o subtipo basal é rico em células T CD8 exauridas (HAMMERL et al., 2018).

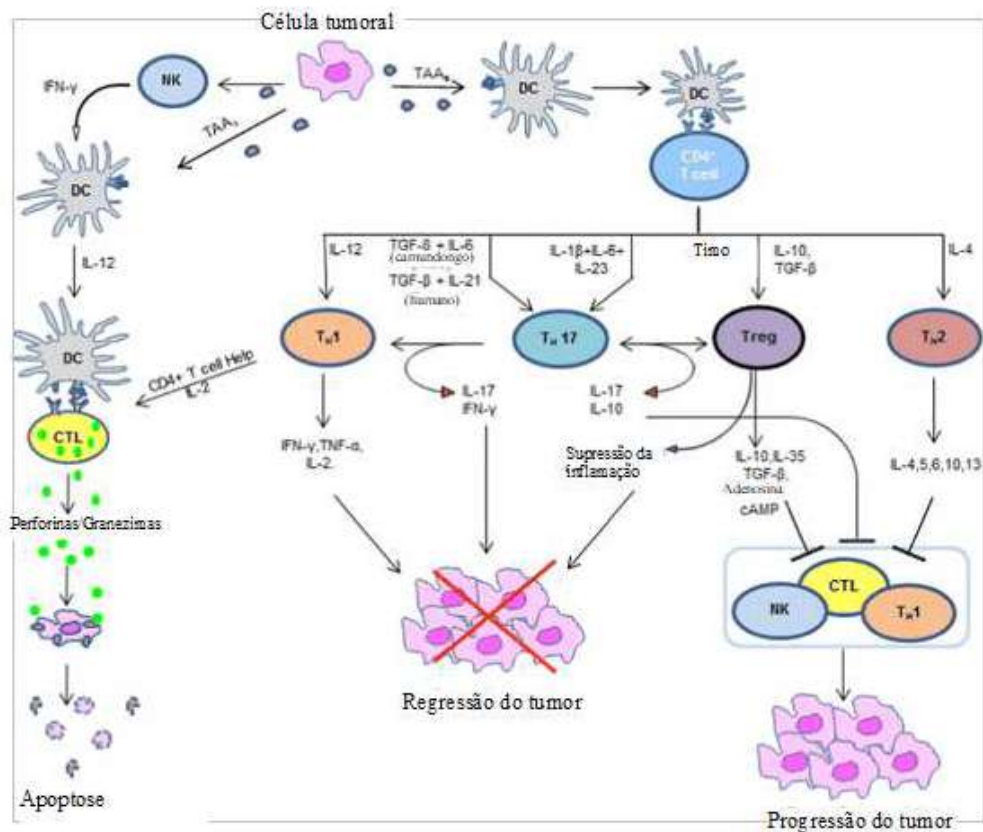
Já a imunogenicidade do tecido tumoral determina o início da resposta imune adaptativa antitumoral e depende de vários fatores, incluindo a quantidade e tipos de AATs e sua apresentação no infiltrado de células imunes (HAMMERL et al., 2018). A maioria dos AATs são utilizados como alvo imunoterapêutico em diversos tipos de tumores (HAMMERL et al., 2018).

2.4 RESPOSTA IMUNE TH1, TH2, TH17 E Treg NO CÂNCER

Todos os tipos de células imunes podem ser encontrados em um tumor, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, células NK, linfócitos virgens e de memória, células B e células T efetoras (incluindo vários subconjuntos de células T: células T auxiliares, células T auxiliares 1 (Th1), células Th2, células Th17, células Treg, células auxiliares foliculares T (TFH) e células T citotóxicas) (FRIDMAN et al., 2012). Essas células imunológicas podem ser localizadas no núcleo (o centro) do tumor, na margem invasiva ou em Estruturas Linfóides Terciárias (ELT) adjacentes (FRIDMAN et al., 2012). Essas células imunes são atraídas ao microambiente tumoral através da produção de citocinas e quimiocinas produzidas pelas células neoplásicas (COUSSENS; WERB, 2002; GUN et al., 2019).

Após a sinalização via citocinas, quimiocinas e CAA pode ocorrer a diferenciação das células TCD4⁺ em células efetoras CD4⁺T-helper 1 (Th1), CD4⁺T-helper 2 (Th2) e CD4⁺T-helper 17 (Th17), e CD4⁺T-Treg (ABBAS et al., 2012) (Figura 6).

Figura 6 - Papel desempenhado pelos linfócitos T mediante o estímulo de antígenos liberados pela célula tumoral.



Fonte: Adaptado de NARENDRA et al., 2013.

As células T CD4⁺ são polarizadas aos fenótipos Th1 e Th2 na exposição às citocinas IL-12 e IL-4, respectivamente (NARENDRA et al., 2013). Após a polarização dos subtipos, essas células são induzidas por fatores de transcrição para a expressão gênica e secreção de citocinas específicas que caracterizam o subtipo e as funções das células efetoras e reguladoras.

A expressão da citocina IFN- γ pelas células CD4⁺T-helper 1 (Th1), atua no microambiente do tumor com ação pró-inflamatória, com níveis altos de CAA ativadas e fatores de crescimento que permitem a infiltração e ativação das células T CD8⁺, enquanto as células CD4⁺T-helper 2 (Th2), contribuem para a inibição das células CD4⁺T-helper 1 (Th1) e T CD8⁺ induzindo as células dendríticas reguladoras, macrófagos e células supressoras derivadas mielóides, a expressão de citocinas anti-inflamatórias, atuando como imunossupressoras (SHI et al., 2018).

Ao contrário do que ocorre nas respostas imunes das células CD4⁺T-helper 1 (Th1) e CD4⁺T-helper 2 (Th2), onde cada uma tem uma ação definida como antitumoral e imunossupressora, respectivamente, as respostas CD4⁺T-helper 17 (Th17) pode ter ambas respostas imunes. Essa polarização de resposta das células CD4⁺T-helper 17 (Th17), provavelmente esteja associada à densidade e proporção de citocinas e quimiocinas existentes no ambiente tumoral, e a presença e ação de outras células imunes infiltradas em tumores (ASADZADEH et al., 2017).

Já as células T regulatórias CD4⁺T (Tregs) desempenham um papel importante na prevenção de doenças auto-imunes específicas de órgãos (auto-imunidade), mantendo a auto-tolerância (SAKAGUCHI et al., 1995; NARENDRA et al., 2013; KUMAR et al., 2019). No entanto, no câncer as células Tregs promovem a tumorigênese, exercendo atividades supressoras nas células efetoras, causando inativação ou apoptose (SALEH; ELKORD, 2019). Nesse sentido, as Tregs facilitam a evasão imunológica, diminuindo a imunidade tumoral.

A polarização do microambiente tumoral também depende do equilíbrio entre fatores solúveis imunossupressores (por exemplo, IL6, IL10, TGF-beta) e supressores de tumores (por exemplo, IL-12, IFN-gama, TNF). Além disso, as células tumorais e as células imunológicas podem ativar vias imunossupressoras desencadeadas pelo CTLA-4 / B74 e PD-1 / PDL-1, receptores inibitórios, que controlam negativamente a ativação da resposta imune ao tumor (SCHREIBE et al., 2011; DIECI et al., 2016).

2.5 POLARIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS

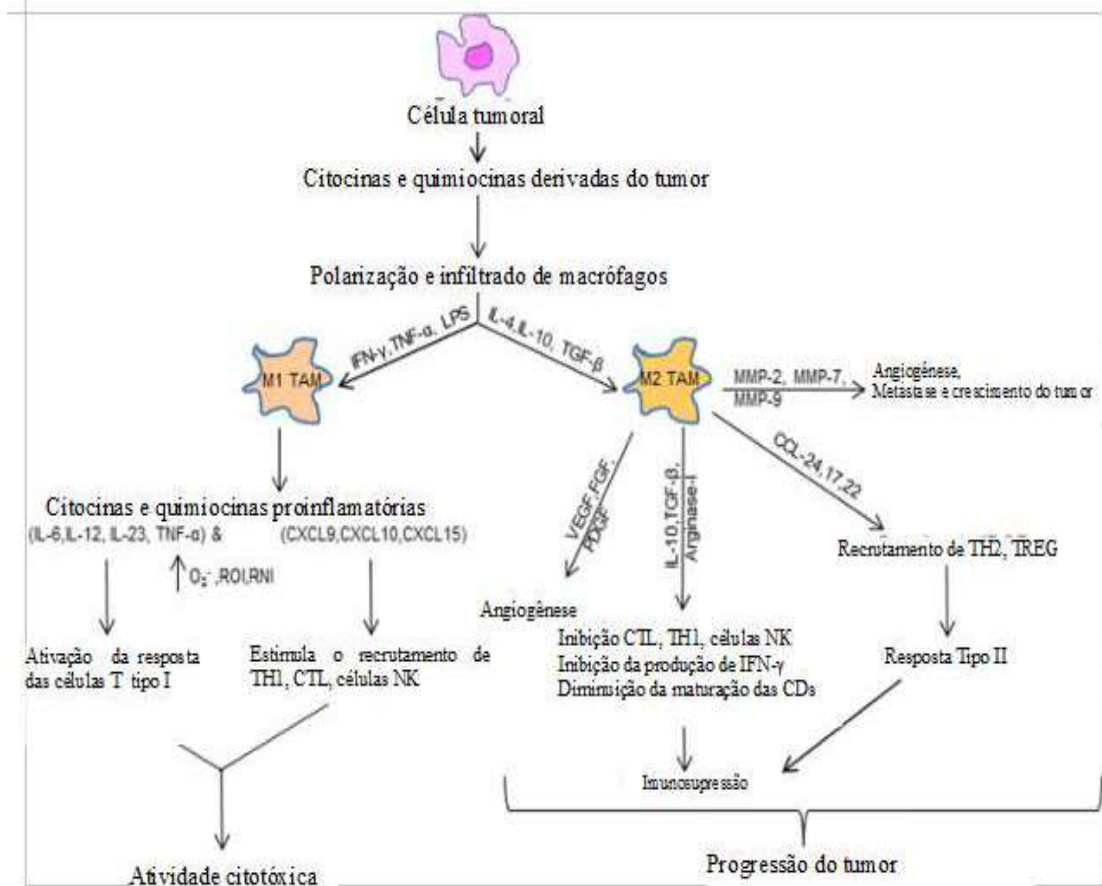
Os macrófagos são células fagocitárias residentes em tecidos linfóides e não linfóides, e acredita-se estarem envolvidos na homeostase do tecido no estado estacionário através da depuração de células apoptóticas e da produção de fatores de crescimento (GEISSMANN et al., 2010). A ativação de macrófagos está envolvida no resultado de muitas doenças, incluindo doenças metabólicas, distúrbios alérgicos (hiperreatividade das vias aéreas), doenças auto-imunes, câncer e infecções bacterianas, parasitárias, fúngicas e virais (MURRAY et al., 2014).

Os Macrófagos Associados ao Tumor (TAMs) são um componente significativo do infiltrado inflamatório em tecidos neoplásicos e são derivados de monócitos que são recrutados amplamente pela Proteína Quimiotática de Monócitos (MCP) (COUSSENS; WERB, 2002). Essas células imunes têm um duplo papel nas neoplasias - embora possam causar a morte das células neoplásicas após ativação por IL-2, interferon e IL-12 (BRIGATI et al., 2002; TSUNG et al., 2002; COUSSENS; WERB, 2002), também expressam citocinas e enzimas que podem suprimir o recrutamento e ativação das células T, promovendo a resistência à inibição do ponto de verificação imunológico (PATHRIA et al., 2019), como ocorre com a produção de IL-10 que diminui a resposta antitumoral por células T citotóxicas (COUSSENS; WERB, 2002), e produzem um número de potentes fatores de crescimento angiogênico e linfangiogênico, citocinas e proteases, todas mediadoras que potencializam a progressão neoplásica (SCHOPPMANN et al., 2002; COUSSENS; WERB, 2002). Estudos demonstram que o número de TAMs em tumores humanos está correlacionado com maior grau de tumor e menor sobrevida para câncer de mama, carcinoma de células renais, glioblastoma, câncer pancreático, câncer de cabeça e pescoço e linfoma (PATHRIA et al., 2019).

Altos níveis de plasticidade e diversidade celular permitem aos macrófagos mudar fenótipo e polarizar em diferentes subconjuntos em resposta a um grande variedade de estímulos ambientais (WYNN et al., 2013; GUN et al., 2019). Assim como existe a polarização das respostas T helper tipo 1 e T helper tipo 2, fenotipicamente foram reconhecidos dois estados distintos de ativação polarizada para os macrófagos: macrófagos classicamente ativado (M1) e alternativamente ativados (M2) (MANTOVANI, 2002; GORDON; TAYLOR, 2005; BISWAS & MANTOVANI, 2010). Os macrófagos tipo M1 são estimulados pelas citocinas da célula T helper 1 (Th1), tais como IFN- γ ou TNF (QUI et. al,

2018). Esses macrófagos podem produzir citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e/ou espécies reativas de oxigênio (EROs) para montar uma resposta imune contra bactérias e vírus (WYNN et al., 2013; GUN et al., 2019) (Figura. 7).

Figura 7 - Polarização dos macrófagos mediante os estímulos das células neoplásicas.



Fonte: Adaptado de NARENDRA et al., 2013.

Já os macrófagos M2, são ativados por citocinas da célula Th2, incluindo IL-4 e IL-10 (WYNN et al., 2013; GUN et al., 2019). Esses macrófagos produzem citocinas anti-inflamatórias e estão envolvidas na cicatrização de feridas e reparação tecidual (WYNN et al., 2013; GUN et al., 2019). No entanto, essas células também induzem imunossupressão em células tumorais, estimulando o processo de angiogênese e remodelagem da matriz que leva à progressão tumoral e metástase (HUANG; FENG, 2013; GUN et al., 2019). Conseqüentemente, a presença dessas células é desfavorável aos pacientes com câncer (GUN et al., 2019).

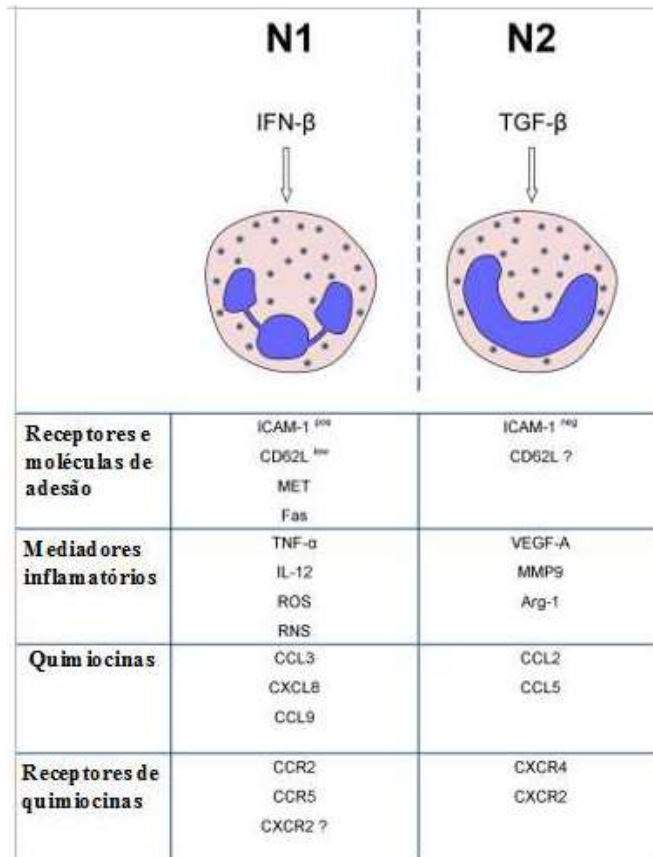
2.6 POLARIZAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS

Neutrófilos são a população de leucócitos mais abundante em circulação e são efetores essenciais da resposta inflamatória e defesa contra patógenos (POWELL; HUTTENLOCHER, 2011). Embora sua função antimicrobiana seja consagrada, estudos têm descrito o seu envolvimento em várias outras funções, como em condições fisiopatológicas, sendo capaz de regular e ativar as respostas no sistema imunológico inato e adaptativo (POWELL; HUTTENLOCHER, 2011; MANTOVANI et al., 2011).

As células neoplásicas possuem mecanismos de recrutamento de neutrófilos semelhantes aos que ocorrem nos sítios inflamatórios, através da expressão de vários ligantes (CXCL8, CXCL5 e CXCL6) para receptores de neutrófilos CXCR1 e CXCR2, que possibilitam o recrutamento dessas células para os locais do tumor (BONAVITA et al., 2016). Portanto, os neutrófilos representam um componente importante do microambiente tumoral e a neutrofilia, recorrente em pacientes com câncer avançado, tem sido associado ao mau prognóstico em muitos tumores (BONAVITA et al., 2016).

Similarmente aos TMAs, os Neutrófilos Associados ao Tumor (TANs) também têm diferentes estados de ativação/diferenciação: TANs podem, portanto, tornam-se um anti-tumorigênico (chamando de "fenótipo N1") versus um fenótipo pró-tumorigênico ("N2") (FRIDLENDER et al., 2009). Os neutrófilos N1 são hipersegmentados, produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α , CCL3), espécies reativas de oxigênio (H₂O₂ e NO) e são capazes de estimular as respostas das células T (BONAVITA et al., 2016). A polarização de N1 é induzida, principalmente, por IFN- β e tem sido demonstrado que a inibição do TGF- β leva os TANs a assumirem um fenótipo pró-inflamatório e citotóxico. Já nos neutrófilos N2, a polarização é mediada por TGF- β e também pode ser obtido por inibição de IFN- β (PICCARD et al., 2012; BONAVITA et al., 2016). Os neutrófilos N2 não apresentam hipersegmentação como os N1, expressam altos níveis de mediadores anti-inflamatórios VEGF, MMP9 e Arginina-1, receptor de quimiocina CXCR4 e CXCR2 e outros fatores estimulantes desse fenótipo (BONAVITA et al., 2016) (Figura.8).

Figura 8 - Plasticidade dos neutrófilos associados ao tumor (TANs) no câncer.



Fonte: Adaptado de BONAVIDA et al., 2016.

2.7 NEUROPEPTÍDEOS, SISTEMA IMUNE E CÂNCER

O sistema imunológico não funciona apenas como uma entidade autorregulatória e autônoma, mas está sujeito a modulação significativa por outros super-sistemas, como o sistema nervoso ou o sistema endócrino (ELENKOV et al., 2000; KOHM; SANDERS, 2001; BEDOUI, 2003, 2008). O papel do sistema imunológico na progressão tumoral é relevante para o sistema nervoso, já que eles podem se comunicar bidirecionalmente via neurotransmissores e neuropeptídeos, receptores comuns, e citocinas (KUOL et al., 2018).

Uma via principal para a interação bidirecional entre o sistema nervoso e o sistema imunológico é fornecida pelo sistema nervoso simpático (ELENKOV et al., 2000; KOHM; SANDERS, 2001; BEDOUI et al., 2008). Um caso de interação ocorre através do neuropeptídeo Y (NPY), que é liberado a partir de nervos simpáticos que inervam órgão linfoides primários e secundários (LUNDBERG et al., 1985; BEDOUI et al., 2008) e modula uma variedade de funções imunológicas, incluindo quimiotaxia (STRAUB et al., 2000; BEDOUI et al., 2008), diferenciação linfocítica T (KAWAMURA et al., 1998; LEVITE;

CHOWERS, 2001; BEDOUI et al., 2008) e migração de leucócitos (BEDOUI, 2001, 2008).

Os neuropeptídeos são hormônios peptídicos (ZHAO et al., 2017) que atuam periféricamente como fatores parácrinos e endócrinos para regular diversos processos fisiológicos e atuam como neurotransmissores ou neuromoduladores no sistema nervoso (MANCINO et al., 2011; ZHAO et al., 2017). Esses peptídeos sinalizadores também foram identificados como potentes fatores de crescimento celular para células normais e participam da estimulação autócrina/parácrina da proliferação e migração de células tumorais (ROZENGURT, 2002) mediante a expressão de genes para fatores de crescimento e seus receptores (SPORN; ROBERTS, 1985; DU et al., 2001). Antagonicamente, foi reportado a ação anti-tumoral dos neuropeptídeos e seus receptores (GALOIAN; PATEL, 2017) em câncer gástrico (TOMITA et al., 2011), condrossarcoma (GALOIAN et al., 2009) e TNBC (GALOIAN et al., 2011).

Os hormônios peptídicos e neuropeptídeos são sintetizados pela mesma via e enzimas de clivagem precursoras comuns, resultando na produção de peptídeos bioativos (GALOIAN; PATEL, 2017). A maioria dos neuropeptídeos exercem as suas funções através de receptores acoplados à proteína G (RAPGs), com certas exceções (FRICKER, 2012; ZHAO, 2016, 2017; GALOIAN; PATEL, 2017). Os RAPGs são compostos por sete domínios transmembranas que transduzem o sinal intracelular através de proteínas G (ROSENBAUM et al., 2009; ZHAO et al., 2017). Os neuropeptídeos ao se ligarem a RAPGs podem desencadear vários efeitos biológicos, como a hipoglicemia causada pela bombesina (BB) (BROWN et al., 1977; MOODY et al., 2015); hipotermia pela neurotensina (NTS) (NEMEROFF et al., 1980; MOODY et al., 2015), efeito angiogênico pelo neuropeptídeo Y (NPY) (KITLINSKA, 2007), e vasodilatação pelo Peptídeo Intestinal Vasoativo (PIV) (SAID; MUTT, 1970; MOODY et al., 2015).

Muitos hormônios e neuropeptídeos se ligam em receptores específicos expressos nas células imunes modulando a resposta do sistema imune (LOTTI et al., 2014). A densidade e a afinidade de receptores de neuropeptídeos pode ser influenciada pelo estado de ativação das células imunes (LOTTI; PANCONESI, 1995; LOTTI et al., 2014). Várias células imunes podem expressar e também secretar neuropeptídeos (GANEVA; DELGADO, 2001) que controlam a proliferação de linfócitos T e linfócitos B, síntese de anticorpos, migração de linfócitos e citotoxicidade (NORDLIND et al., 1988). Algumas células imunes, tais como, células T, CD8, células NK, microglia e células supressoras derivadas de mielóides (CSDMs)

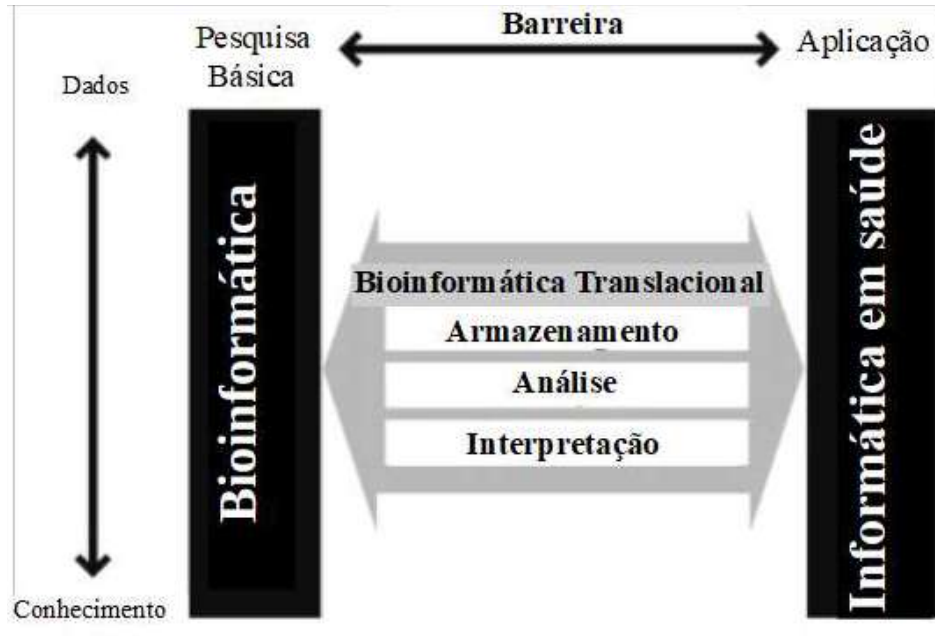
expressam receptores de neurotransmissores na superfície dessas células, que incluem substância P (SP), ácido glutamato-gama-aminobutírico (GABA) (LIU et al., 2016), serotonina, dopamina (WU et al., 2014; SAUSSEZ et al., 2014; KUOL et al., 2018), epinefrina, norepinefrina e acetilcolina (HAO et al., 2013; ST-PIERRE et al., 2016; KUOL et al., 2018).

Além dessas células imunes, os macrófagos de vários órgãos e tecidos expressam mRNA que sintetizam e secretam neuropeptídeos (GANEVA; DELGADO, 2001). Os neuropeptídeos podem atuar nessas células imunes estimulando ou inibindo fagocitose, aderência/quimiotaxia, na liberação ou inibição de citocinas, na produção de óxido nítrico ou EROs, e aumentando ou diminuindo a apresentação de antígeno (GANEVA; DELGADO, 2001). Assim como ocorre com os macrófagos, os neuropeptídeos podem modular também as funções dos neutrófilos. Estudos de bioinformática já demonstraram uma relação direta entre a expressão de neuropeptídeos e neuroreceptores no prognóstico de pacientes com câncer (ZHANG; OPPENHEIM, 2006; BEDOUI et al., 2008).

2.8 BIOINFORMÁTICA TRANSLACIONAL NO ESTUDO DO CÂNCER

Através da Bioinformática Translacional (TB) tem se tornado possível obter informações de como tratar e prevenir doenças a partir de análises de dados genômicos e proteômicos (TENENBAUM, 2016). Segundo a Associação de Informática Médica Americana (AMIA), TB é o desenvolvimento de métodos de armazenamento, analíticos e interpretativos para otimizar a transformação de um volume grande de dados biomédicos e genômicos de crescimento constante, em proativos, preditivos, saúde preventiva e participativa (AMIA, 2019) (Figura 9).

Figura 9 - Barreira entre os dados da pesquisa básica e aplicação usando a bioinformática translacional (TB).



Fonte: Adaptado de TENENBAUM, 2016.

Projetos genômicos de câncer em larga escala, como o Atlas do Genoma do Câncer (TCGA), geram quantidades enormes de dados genômicos do câncer de várias plataformas técnicas diferentes, que aumentam os desafios de executar integração, exploração e análise de dados, especialmente para cientistas sem formação computacional (SIRINTRAPUN et al., 2016). Por isso, a importância do uso das ferramentas computacionais para ajudar a decifrar esses dados em informações úteis que possibilitem correlacionar os resultados significativamente em fenótipos de doenças e, em alguns casos, para um cenário clínico (LONDIN; BARASH, 2015).

Alguns estudos já demonstram as contribuições da TB no diagnóstico e prognóstico de doenças, como na classificação de cânceres determinada por vias de ativação e identificação de biomarcadores, no qual tem o potencial de auxiliar os médicos na seleção e combinação mais racional de medicamentos para a obtenção de uma melhor resposta terapêutica, bem como avaliar a severidade do tratamento necessário, dependendo do nível do risco do paciente (BUCHAN et al., 2011).

3. JUSTIFICATIVA

Esse estudo visa caracterizar os subtipos moleculares de câncer de mama através da análise da expressão gênica e proteica de células imunes e neoplásicas, fazer a prospecção de marcadores úteis para o diagnóstico, tratamento e estimativa da sobrevida dos pacientes, bem como desvendar quais os fatores que torna algumas subtipos mais agressivos do que outros.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

- Identificar o perfil imunológico através da expressão gênica e proteica nos subtipos moleculares de câncer de mama utilizando ferramentas de Bioinformática.

4.2 Objetivos específicos:

- Identificar os tipos celulares do sistema imune associados aos subtipos do câncer de mama;
- Confirmar os diferentes subtipos do câncer de mama, através da análise do padrão de expressão de genes específicos de cada subtipo;
- Analisar o perfil de expressão de genes do sistema imune associados às respostas Th1, Th2, Th17, Treg, macrófagos M1 e M2, e neutrófilos N1 e N2 nos subtipos do câncer de mama;
- Avaliar a expressão de neuropeptídeos e seus receptores nos diferentes subtipos do câncer de mama;
- Correlacionar os dados de expressão gênica;
- Identificar os principais genes associados à resposta imune nos diferentes subtipos de câncer de mama;
- Associar a sobrevida dos pacientes com câncer de mama e a expressão gênica associada à resposta imune.

5. MATERIAIS E METODOS

5.1 Seleção e análise de genes

Os bancos de dados Entrez Gene do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) e GeneCards (<https://www.genecards.org/>) foram utilizados para extrair a lista de genes associados às respostas Th1 (n=321 genes), Th2 (n=301 genes), Th17 (n=292 genes), Treg (n=737 genes), macrófagos M1 (n=41 genes), M2a (n=31 genes), M2c (n=9 genes) neutrófilos N1 (n=76 genes) e N2 (n=56 genes), neuropeptídeos (n=127 genes) e neuroreceptores (n=133 genes). A lista de genes e as proteínas com alta e baixa expressão foram combinadas e identificadas através do diagrama de Venn (<http://www.interactivenn.net>) (HEBERLE et al., 2015). As amostras teciduais de tumores de pacientes com o subtipo de CM luminal A (n=508 indivíduos), luminal B (n=191 indivíduos), HER2 (n=73 indivíduos), basal (n=173 indivíduos) e normal (n=139 indivíduos) foram utilizadas para avaliar os genes diferencialmente expressos nessas amostras. Esses dados foram extraídos do artigo Thorsson, e colaboradores (2018) e consta no banco de dados do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA).

5.2 Análise das vias moleculares

A Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto (KEGG) é um recurso de banco de dados para interpretação biológica de sequências de genomas e outros dados. As análises KEGG estavam disponíveis no banco de dados DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) versão 6.7, um recurso de dados composto por uma base de conhecimento integrada de biologia e ferramentas de análise para extrair informações biológicas significativas de grandes quantidades de genes e coleções de proteínas (HUANG et al., 2009). O valor de $p < 0,05$ foi definido como significativo.

5.3 RNA-seq e dados de informações clínicas do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA)

O pacote TCGAbiolinks, um software R/Biocondutor versão 2.14.0 (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/TCGAbiolinks.html>) (COLAPRICO et al., 2016) e o TCGAbiolinksGUI (SILVA et al., 2018) foram utilizados para extrair dados genômicos e clínicos de ambos tecidos tumorais normais e neoplásicos para os subtipos de câncer de mama. A instalação do software R versão 3.6. foi realizada para dar suporte para a instalação da interface do TCGAbiolinksGUI e seus pacotes que permitiram executar as análises de genes diferencialmente expressos (GDEs). A coexpressão dos GDEs com alta e

baixa expressão a partir dos perfis de expressão gênica foram combinados e identificados com um diagrama de Venn (<http://www.interactivenn.net>). Valores de $p < 0,05$ e um $\log_{2}FC \geq 1$ foram definidos como critérios de significância (PEREIRA et al., 2019).

5.4 Análise de expressão proteica e sobrevida nos subtipos de câncer de mama

Para obter dados de expressão proteica, foi utilizada a plataforma *The Cancer Proteome Atlas* (TCPA) (<https://tcpaportal.org/tcpa/analysis.html>), principal fonte de informação para Análise de Matriz Reversa de Proteínas em Fase Reversa (RPPA) (LI et al., 2017, 2013). Os dados utilizados nessa análise foram obtidos do TCGA - carcinoma invasivo de mama (n= 901 amostras) dos subtipos de CM. A análise de sobrevida dos dados do TCGA foi realizada usando o *Survival module of the Tumor Immune Estimation Resource* (TIMER) (LI et al., 2016) e *Prediction of clinical outcomes from genomics* (PRECOG) (GENTLES et al., 2015). Os gráficos foram obtidos utilizando ambas as plataformas para explorar a associação entre os dados clínicos e a expressão gênica, identificando o impacto na sobrevida dos pacientes. O valor de $p < 0,05$ foi definido como significativo.

5.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas envolvendo subpopulações de células imunes foram realizadas utilizando Software GraphPad Prism 7. O teste two-way ANOVA bidirecional e o teste t bicaudal não pareado foram utilizados para comparar as médias entre os grupos e o tecido normal (controle negativo) com os grupos dos subtipos de CM, respectivamente. O valor de $p < 0,05$ foi definido como significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Genes diferencialmente expressos (GDEs) nos subtipos de câncer de mama

Os genes selecionados preliminarmente para avaliar a frequência de expressão entre os tumores dos subtipos de CM e o tecido da mama normal foram o receptor de estrógeno 1 (*Esr1*), o receptor de progesterona (*Pgr*), o receptor tirosina quinase 2 erb-b2 (*ErbB2*), o marcador de proliferação Ki-67 (*Mki67*), a repetição de IAP baculoviral contendo 5 (*Birc5*), a queratina 8 (*Krt8*), a queratina 18 (*Krt18*), o músculo liso (*Acta2*) e a molécula CD38 (*Cd38*) (Quadro 2). Os critérios adotados na escolha desses genes foram as vias metabólicas associadas ao câncer.

Quadro 2 - Características dos genes selecionados para a comparação entre os subtipos de câncer de mama.

Gene	Código do gene	Vias metabólicas (DAVID/KEEG PATHWAY)
<i>Esr1</i>	ENSG00000091831	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclo celular • Apoptose • Via de ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) • Via de ativação fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) • Via de sinalização de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)
<i>Pgr</i>	ENSG00000082175	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclo celular • Via de ativação de MAPK • Ativação da via de sinalização da p53 • Via de ativação de PI3K- proteína serina/treonina quinase (AKT)
<i>ErbB2</i>	ENSG00000141736	
<i>Mki67</i>	ENSG00000148773	<ul style="list-style-type: none"> • Marcador de proliferação celular
<i>Birc5</i>	ENSG00000089685	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptose • Vias no câncer
<i>Krt8</i>	ENSG00000170421	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína exossomal de células do câncer de cólon retal
<i>Krt18</i>	ENSG00000111057	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína exossomal de células do câncer de cólon retal • Proteína exossomal de células de melanoma
<i>Acta2</i>	ENSG00000107796	<ul style="list-style-type: none"> • Contração do músculo liso vascular
<i>Cd38</i>	ENSG00000004468	<ul style="list-style-type: none"> • Linhagem celular hematopoiética • Via de sinalização apoptótica • Regulação da proliferação celular

Fonte: Elaborado pela própria autora .

Quando comparada a frequência dos genes *Esr1* (ER), *Pgr* (PR), *ErbB2* (Her2), *Mki67*, *Birc5*, *Krt8*(K8), *Krt18* (K18), *Acta2* e *Cd38* do mRNA expresso nos tumores dos subtipos de CM (basal, Her2, luminal A e luminal B) e no tecido normal foi encontrado a alta expressão dos genes *ErbB2*, *Krt8*, *Krt18*, *Pgr* e *Esr1* em Her2 quando comparado Her2 com basal (Figura 10); dos genes *Esr1*, *Pgr*, *Krt18*, *Krt8*, *ErbB2* no luminal A quando comparado luminal A com basal (Figura 11); dos genes *Esr1*, *Pgr*, *Krt18*, *Krt8* e *ErbB2* no luminal B quando comparado luminal B com basal (Figura 12); dos genes *ErbB2*, *Mki67*, *Birc5* e *Cd38* no Her2 quando comparado Her2 com luminal A (Figura 13); dos genes *ErbB2* e *Cd38* em Her2 quando comparado Her2 com luminal B (Figura 14); dos genes *Mki67* e *Birc5* em luminal B quando comparado luminal B com luminal A (Figura 15); dos genes *Mki67*, *Birc5* e *Cd38* no basal quando comparado basal com normal (Figura 16); dos genes *ErbB2*, *Mki67* e *Birc5* no Her2 quando comparado Her2 com normal (Figura 17); dos genes *Esr1* e *Pgr* no luminal A quando comparado luminal A com o normal (Figura 18); e, dos genes *Esr1*, *Birc5*, *Krt8*, *Pgr*, *Mki67* e *Krt18* no luminal B quando comparado luminal B com o normal (Figura 19).

Figura 10 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2+ com basal. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa log10 ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2); ENSG0000004468 (CD38).

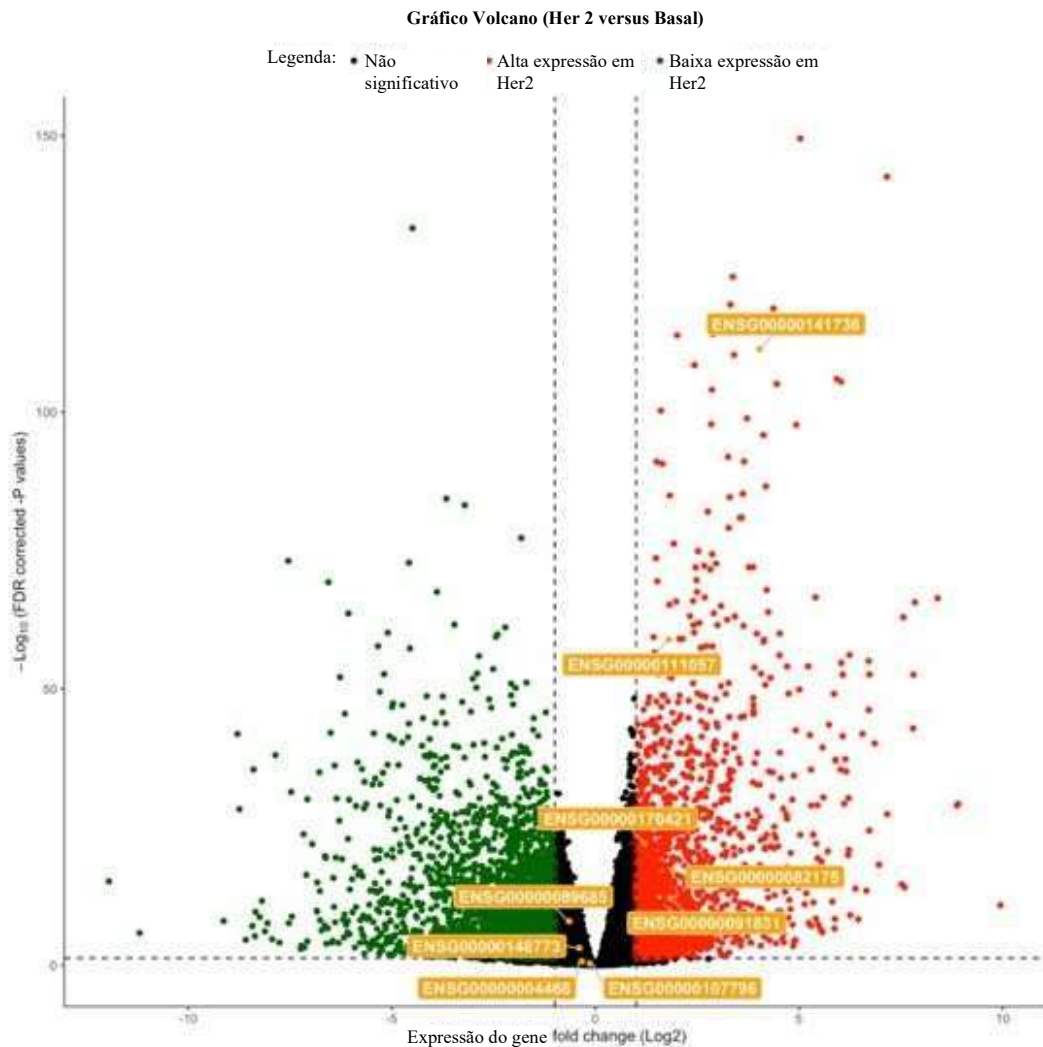


Figura 11 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal A com basal. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa log10 ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2); ENSG0000004468 (CD38).

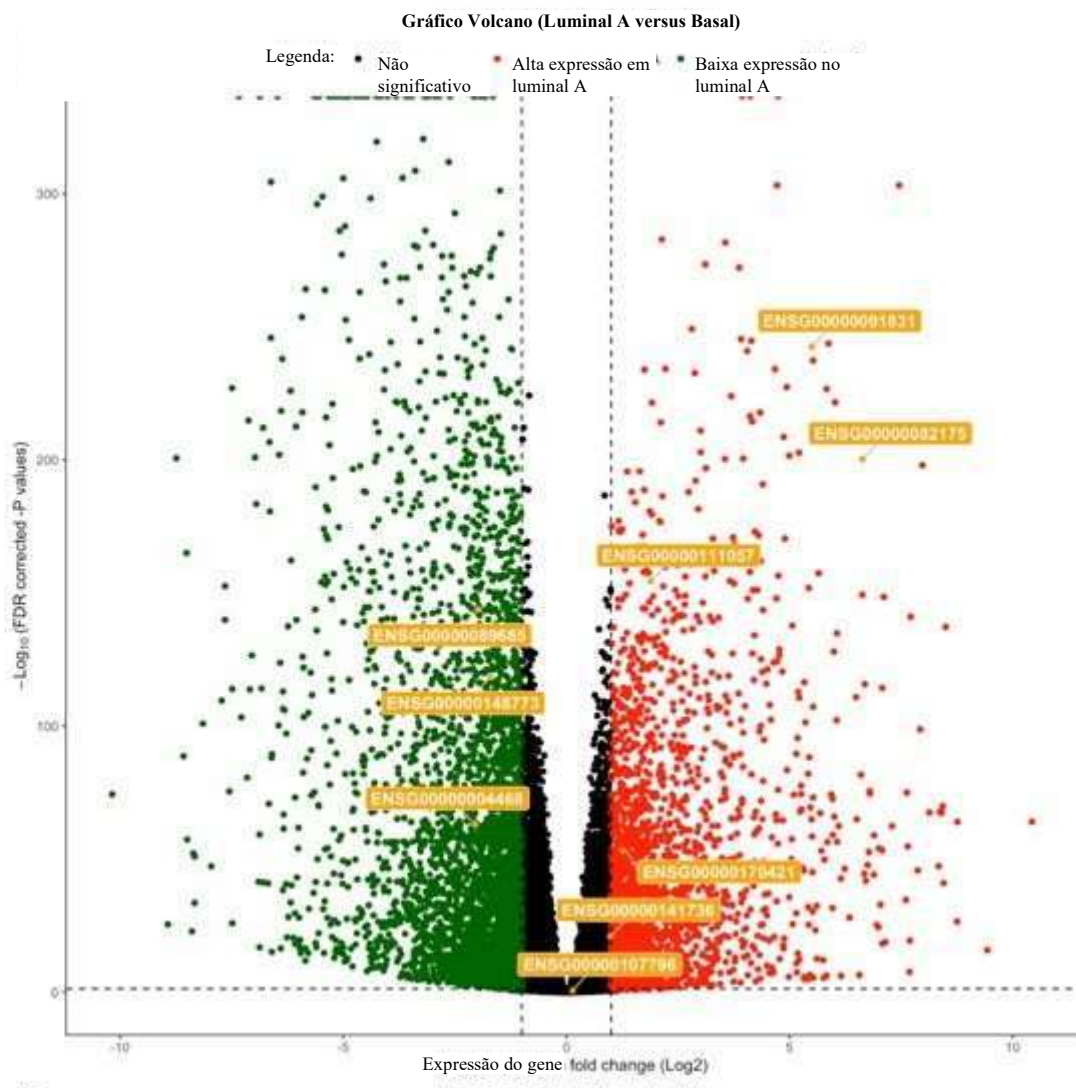


Figura 12 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal B com basal. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa log10 ajustado p-value. ENSG00000091831 (ESR1); ENSG00000082175 (PGR); ENSG00000141736 (ERBB2); ENSG00000148773 (MKI67); ENSG00000089685 (BIRC5); ENSG00000170421 (KRT8); ENSG00000111057 (KRT18); ENSG00000107796 (ACTA2); ENSG0000004468 (CD38).

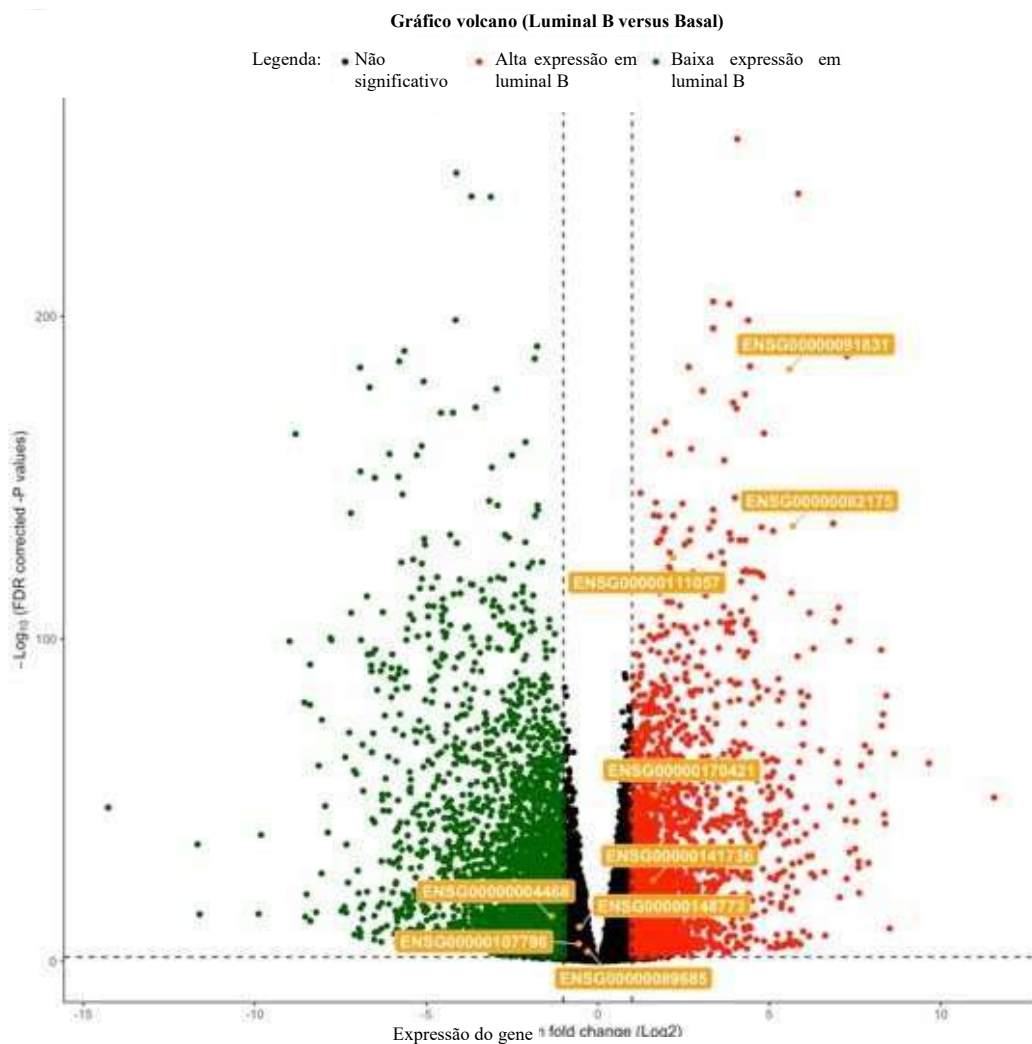


Figura 13 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2 com luminal A. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa \log_{10} ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2); ENSG0000004468 (CD38).

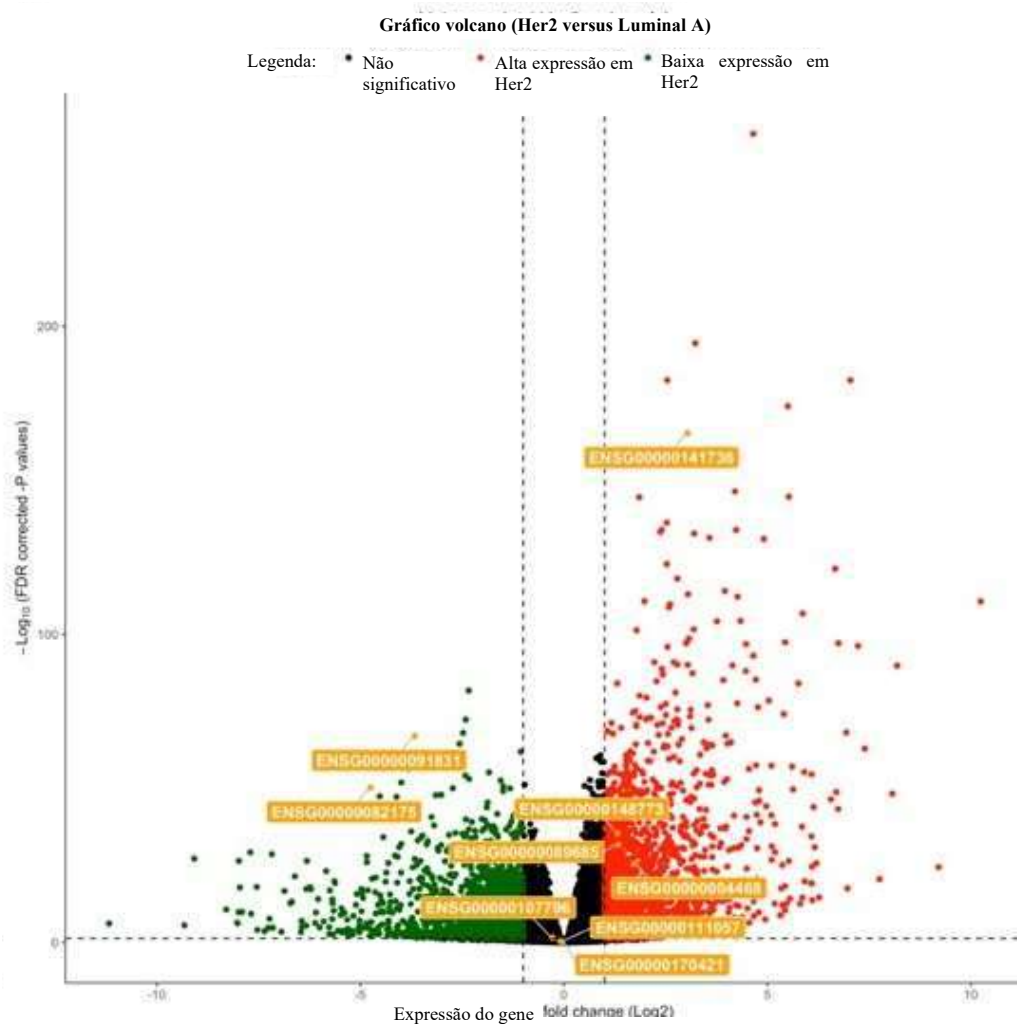


Figura 14 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2 com luminal B. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa log10 ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2); ENSG0000004468 (CD38).

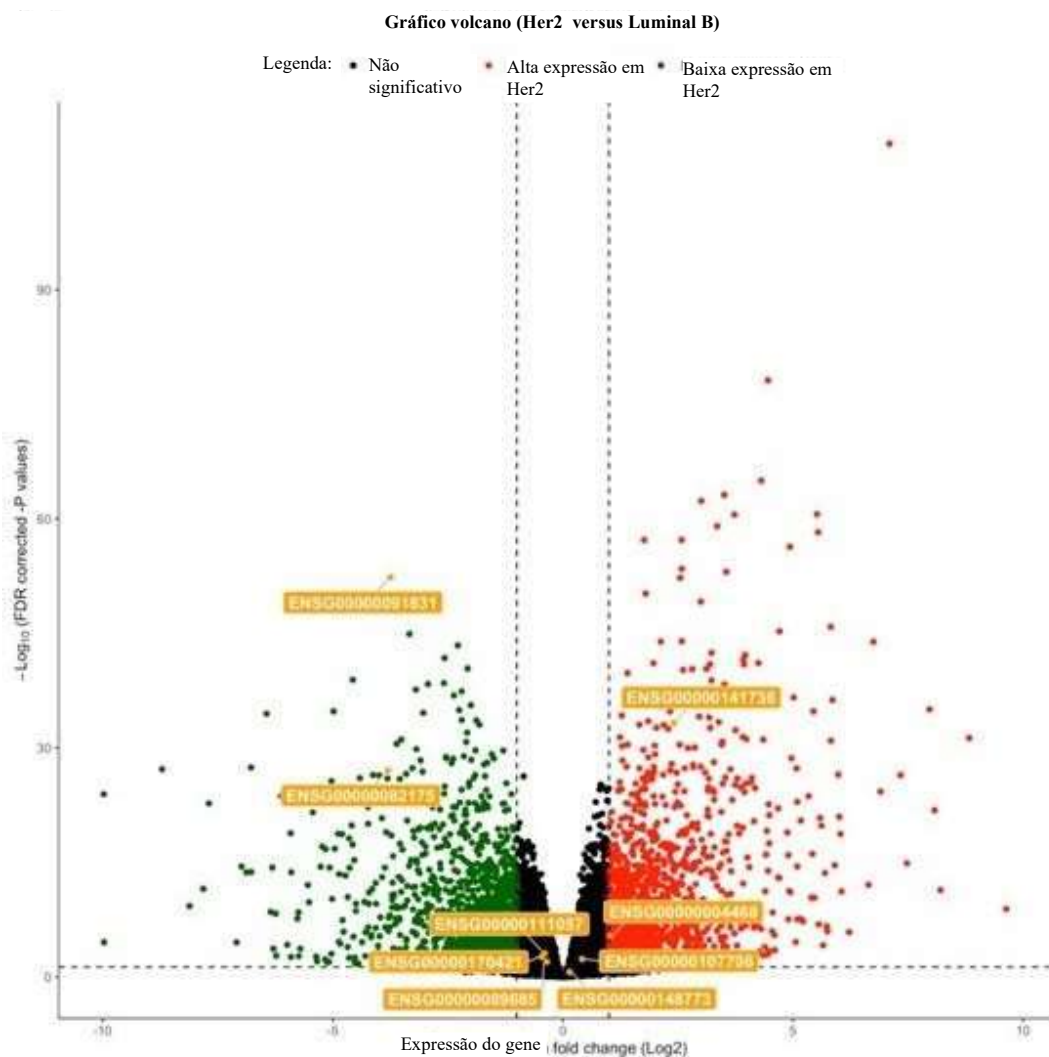


Figura 15 - Gráfico vulcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal B com luminal A. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa

log10 ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR);

ENSG00000141736 (ERBB2); ENSG00000148773 (MKI67); ENSG00000089685 (BIRC5);

ENSG00000170421 (KRT8); ENSG00000111057 (KRT18); ENSG00000107796 (ACTA2);

ENSG0000004468 (CD38).

Gráfico vulcano (Luminal B versus Luminal A)

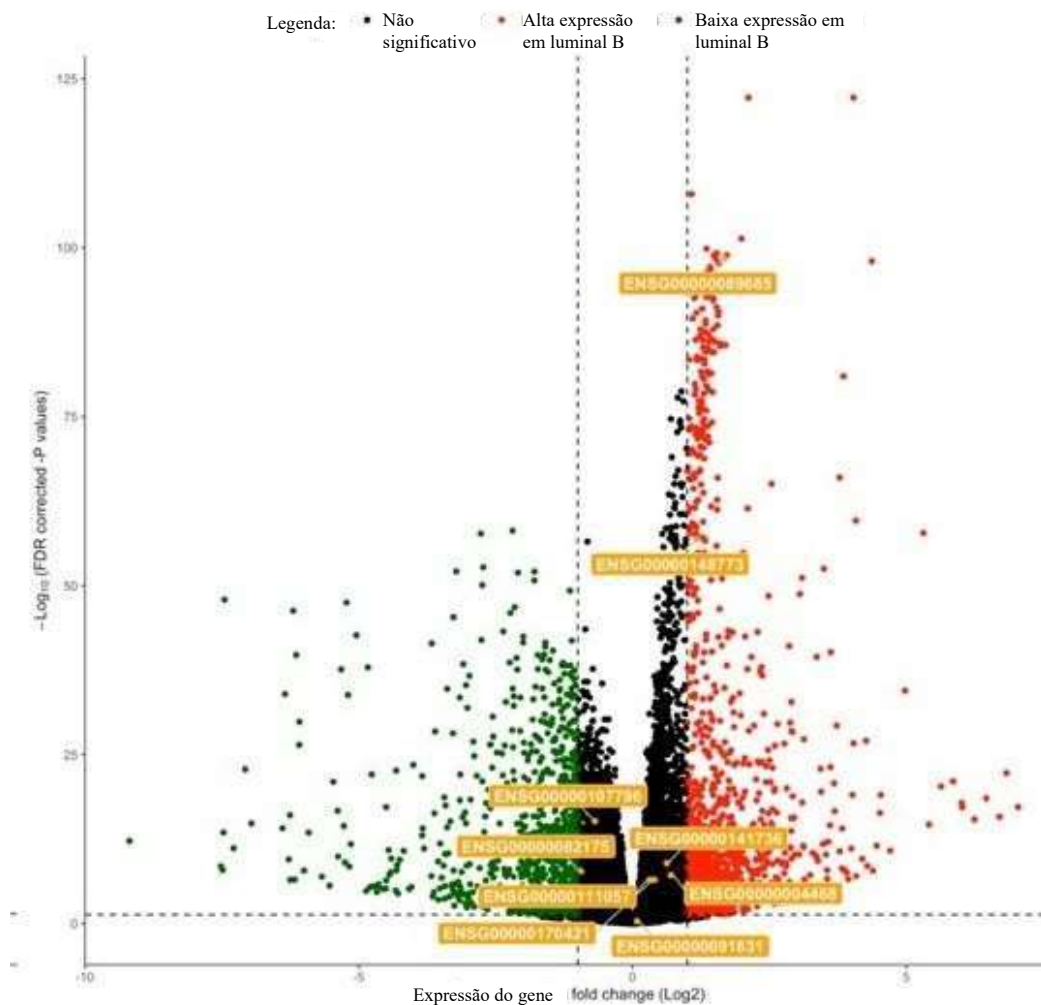


Figura 16 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado basal com normal. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa log10 ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2); ENSG0000004468 (CD38).

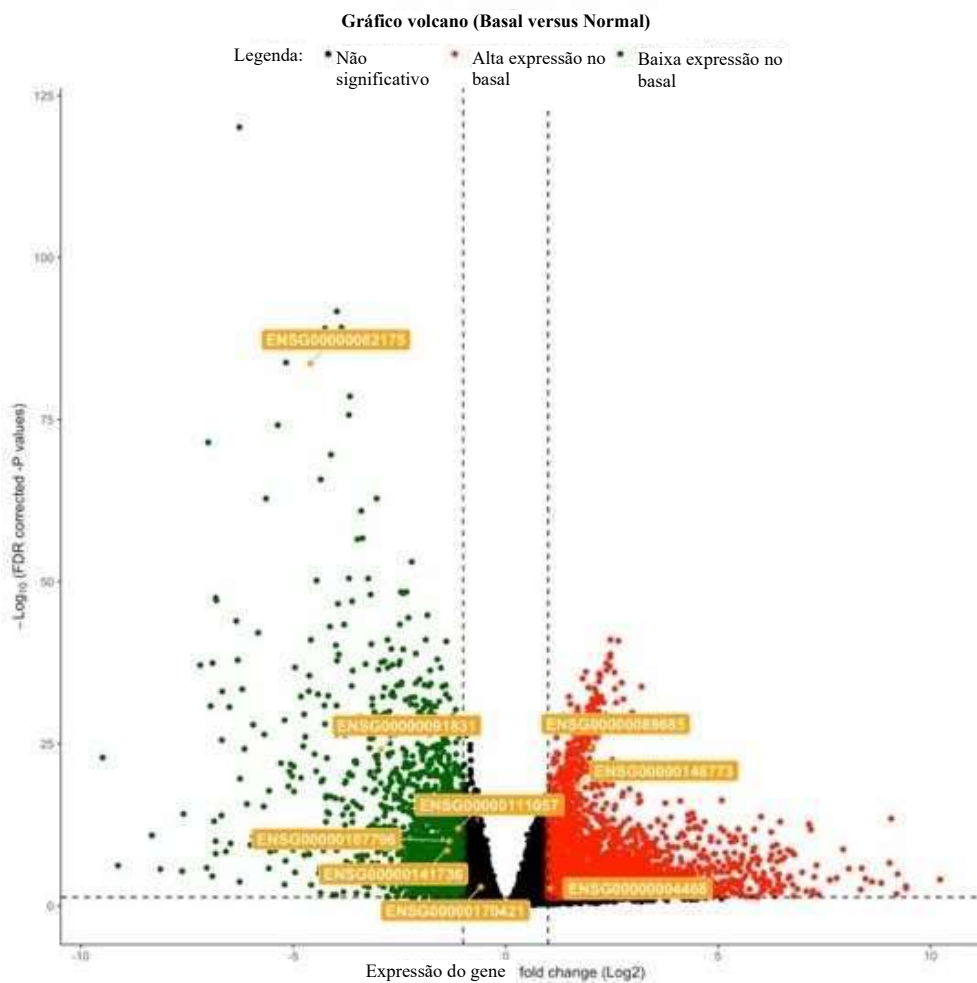


Figura 17 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado Her2 com normal. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa log10 ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2); ENSG0000004468 (CD38).

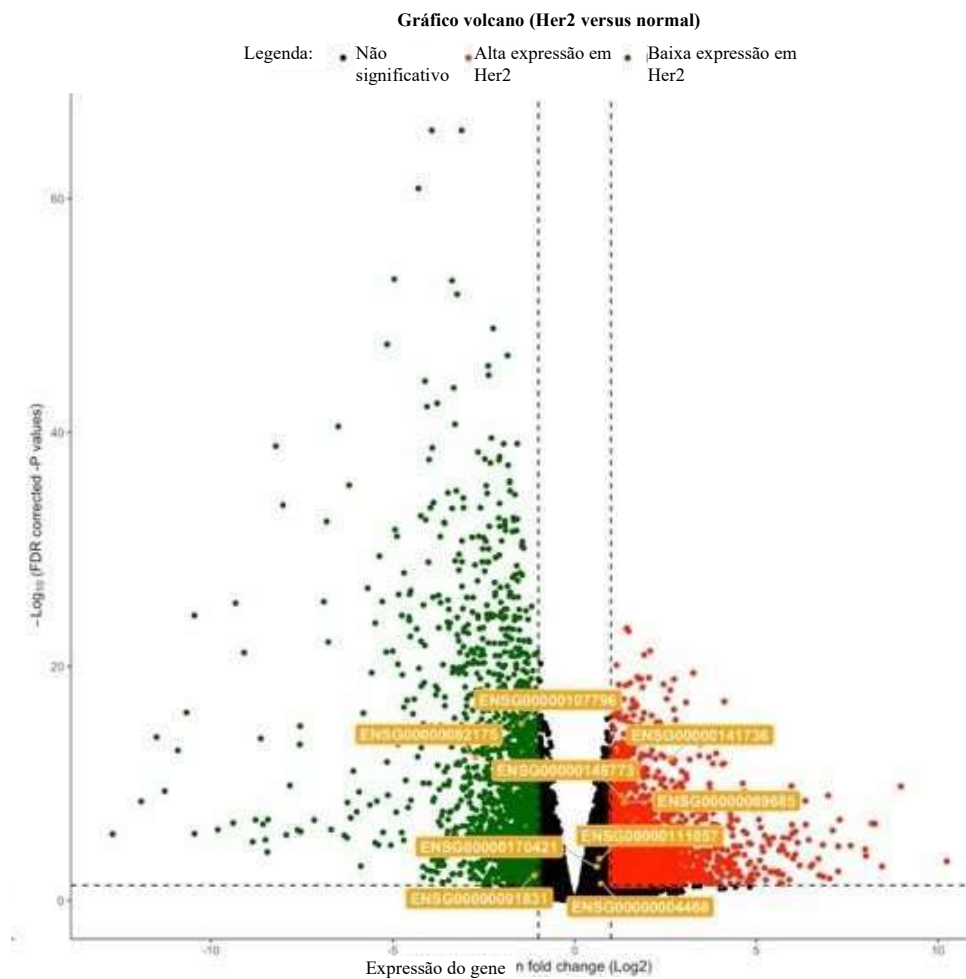


Figura 18 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal A com normal. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa log10 ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2);

ENSG0000004468 (CD38).

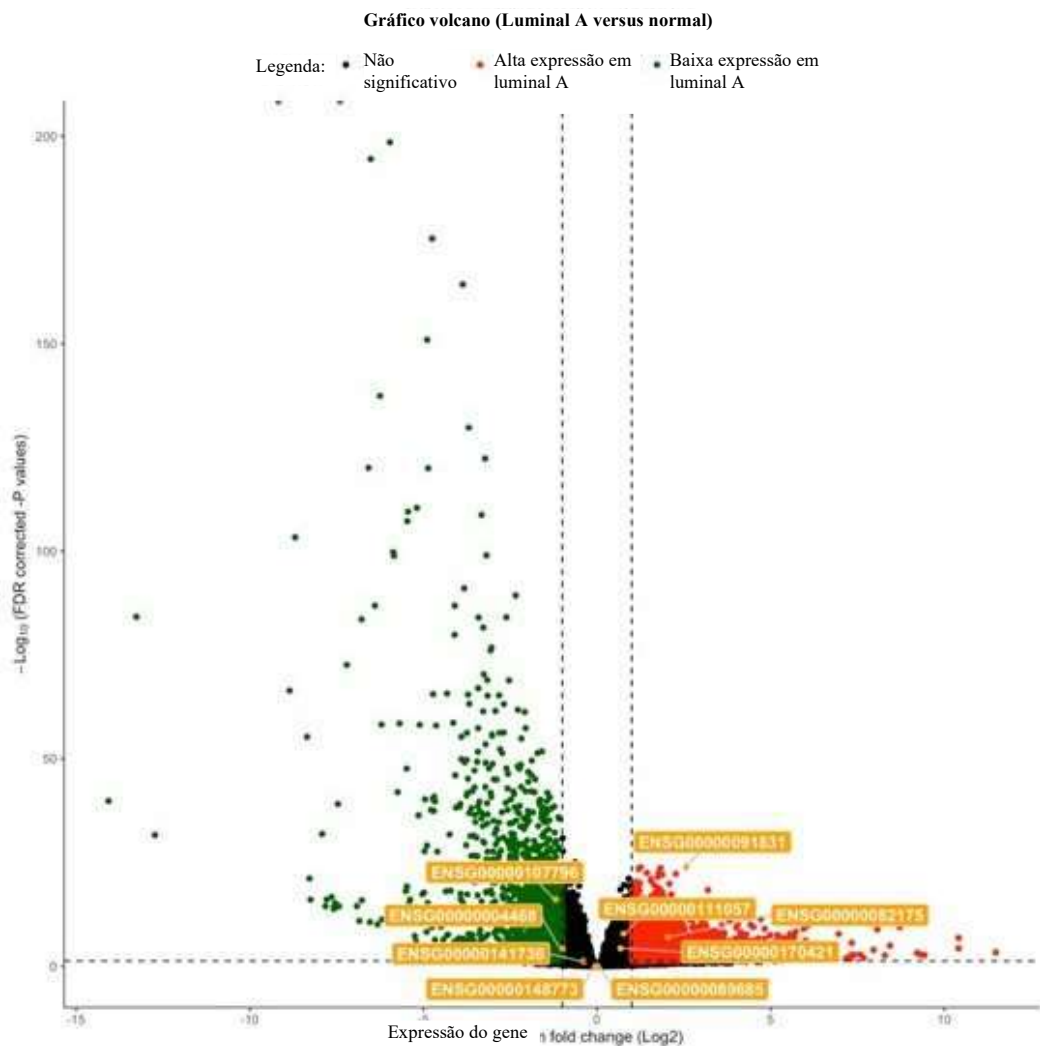
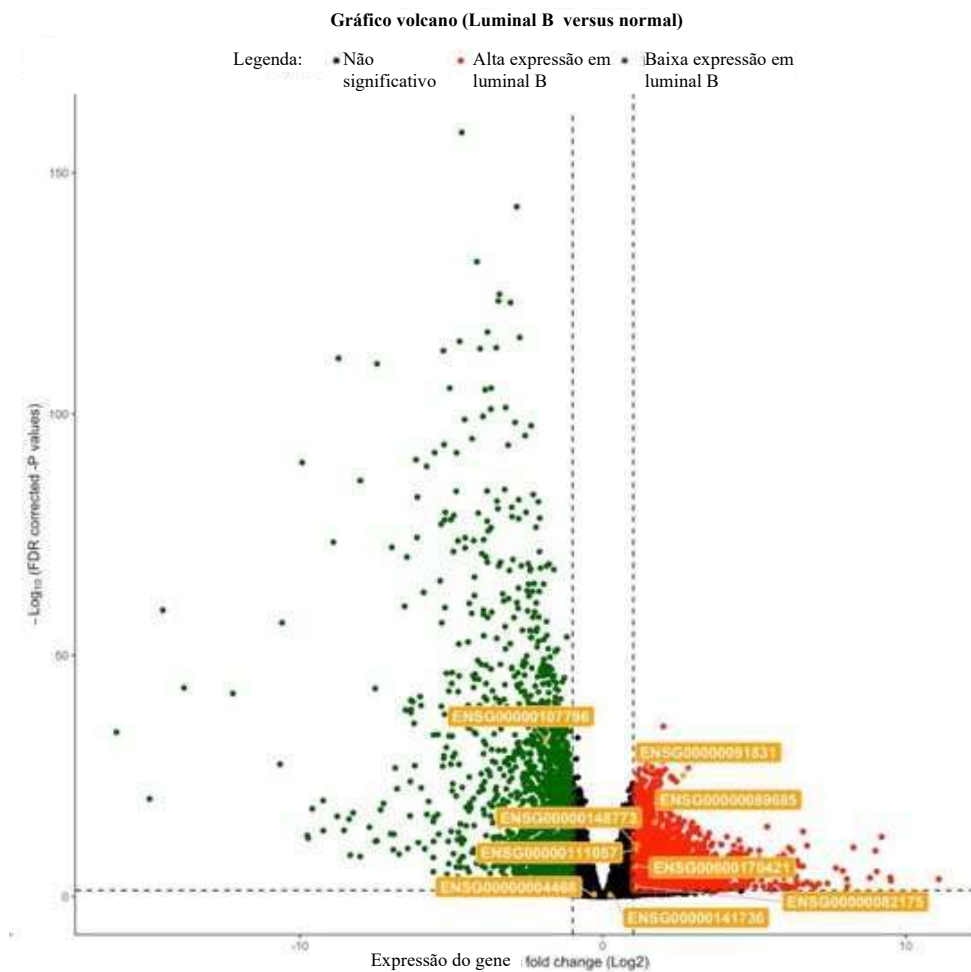


Figura 19 - Gráfico volcano da expressão diferenciada de genes expressos nos subtipos de câncer de mama quando comparado luminal B com normal. Os pontos vermelhos representam a alta expressão de genes, os pontos verdes representam a baixa expressão de genes, e os pontos pretos representam o background dos genes. O eixo x representa log fold change, o eixo y representa \log_{10} ajustado p-value. ENSG0000091831 (ESR1); ENSG0000082175 (PGR); ENSG0000141736 (ERBB2); ENSG0000148773 (MKI67); ENSG0000089685 (BIRC5); ENSG0000170421 (KRT8); ENSG0000111057 (KRT18); ENSG0000107796 (ACTA2);

ENSG0000004468 (CD38).



6.2 Células imunes e genes expressos identificados nos infiltrados dos tumores dos subtipos de câncer de mama

A análise preliminar usando o iPRECOG mostrou que apenas os plasmócitos, macrófagos não ativados e macrófagos ativados M1 e M2 estão aumentados no câncer de mama, sem especificar por subtipo molecular, numa fração de 22 subpopulações de leucócitos (Tabela 1). Esses resultados são provenientes da análise usando o algoritmo de deconvolução CIBERSORT, publicado anteriormente por Gentles e colaboradores (2015).

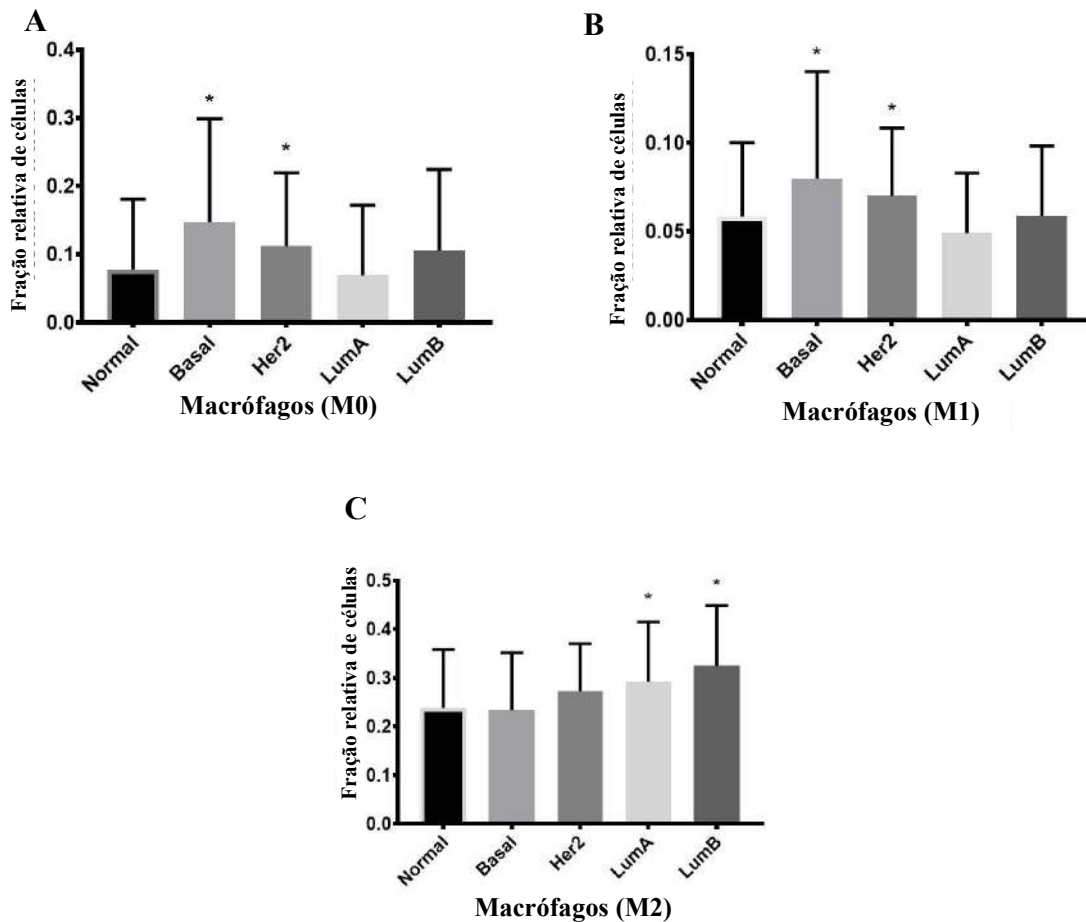
Tabela 1 - Células imunes no tumor de câncer de mama. Os valores representam a média da fração de cada população de células. Os valores marcados em vermelho indicam valores significativos para $p \leq 0,005$.

Plataforma	No. amostras analisadas ($P < 0,005$)	Total amostras	Plasmócitos	Macrófagos M0	Macrófagos M1	Macrófagos M2	Neutrófilos
HGU133A	183	198	0,17	0,10	0,09	0,17	0,01
HGU133A	154	318	0,18	0,09	0,08	0,13	0,01
HGU133A	125	173	0,14	0,14	0,09	0,16	0,01
HGU133Plus2	105	107	0,17	0,10	0,11	0,18	0,02

Fonte: Plataforma iPRECOG.

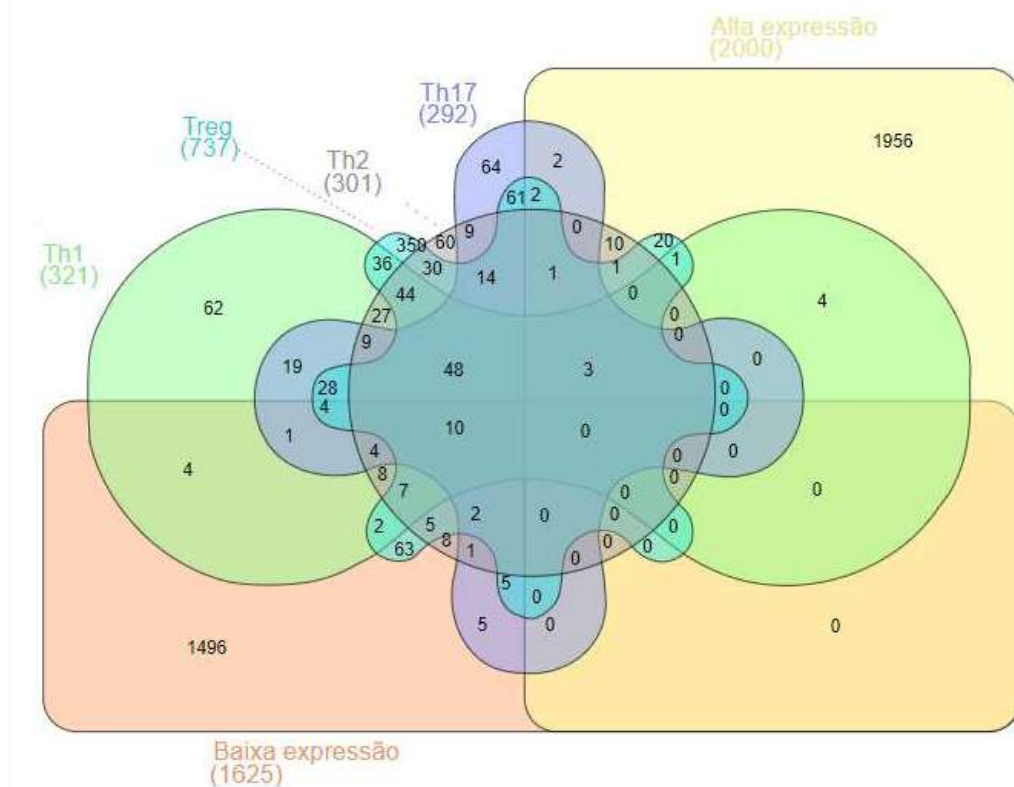
A fim de caracterização das frações de leucócitos nos subtipos de CM foram utilizados dados de células imunes do artigo de Thorsson e colaboradores (2018) de tumores dos subtipos de CM e apenas foi encontrada diferença significativa nas frações relativas dos macrófagos M0, M1 e M2 (Figura 20). Tanto em M0 como em M1 houve aumento na quantidade desses macrófagos nos subtipos basal e Her2 em relação as células imunes encontradas no tecido normal. Já nos macrófagos M2, o aumento ocorreu nos subtipos luminal A e luminal B em relação as células imunes no tecido normal.

Figura 20 - População relativa da polarização dos macrófagos M0 (A), M1 (B) e M2 (C) presente no microambiente tumoral nos subtipos de câncer de mama (CM) determinado pelo algoritmo CIBERSORT. Os subtipos de CM foram comparados entre si e com os controles normais, considerando significativo $p \leq 0,05$ em relação ao controle normal*.



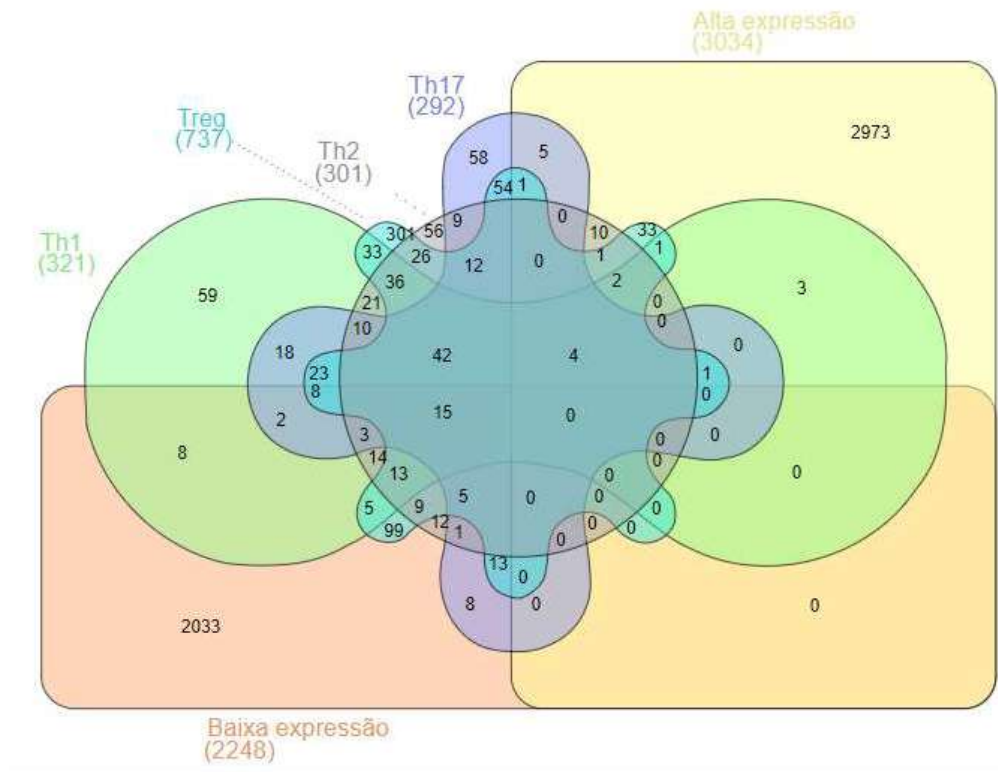
Devido as desregulações induzidas por câncer e a plasticidade fenotípica da célula imune que podem limitar a capacidade do CIBERSORT de caracterizar com precisão os componentes imunes do ambiente tumoral baseada apenas nas frações dos leucócitos, foi realizada uma comparação dos genes expressos associados às respostas imunes nos subtipos de CM. No subtipo de CM luminal A foi identificado a alta expressão de 4 genes associados à resposta Th1 (*Muc1*, *C4b*, *Wt1* e *Pla2g10*), 10 genes associados à resposta Th2 (*Myb*, *Il17rb*, *Pmaip1*, *Tmprss6*, *Tph1*, *Il20*, *Il19*, *Th2lcr*, *Chia* e *Sec14l3*), 2 genes associados à resposta Th17 (*Igflr* e *Hist3h3*), e 20 genes à resposta Treg (*Ccnd1*, *Cxcl14*, *Foxa1*, *Pbx1*, *Serpina 1*, *Prlr*, *Pgr*, *Retreg1*, *Pcsk1*, *Pdzk1*, *Slc6a4*, *Flt3*, *Cd177*, *Proc*, *Adcy10*, *Mir200a*, *Ins*, *Ctag2*, *Mir26a2* e *Mir141*) (Figura 21).

Figura 21 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama luminal A.



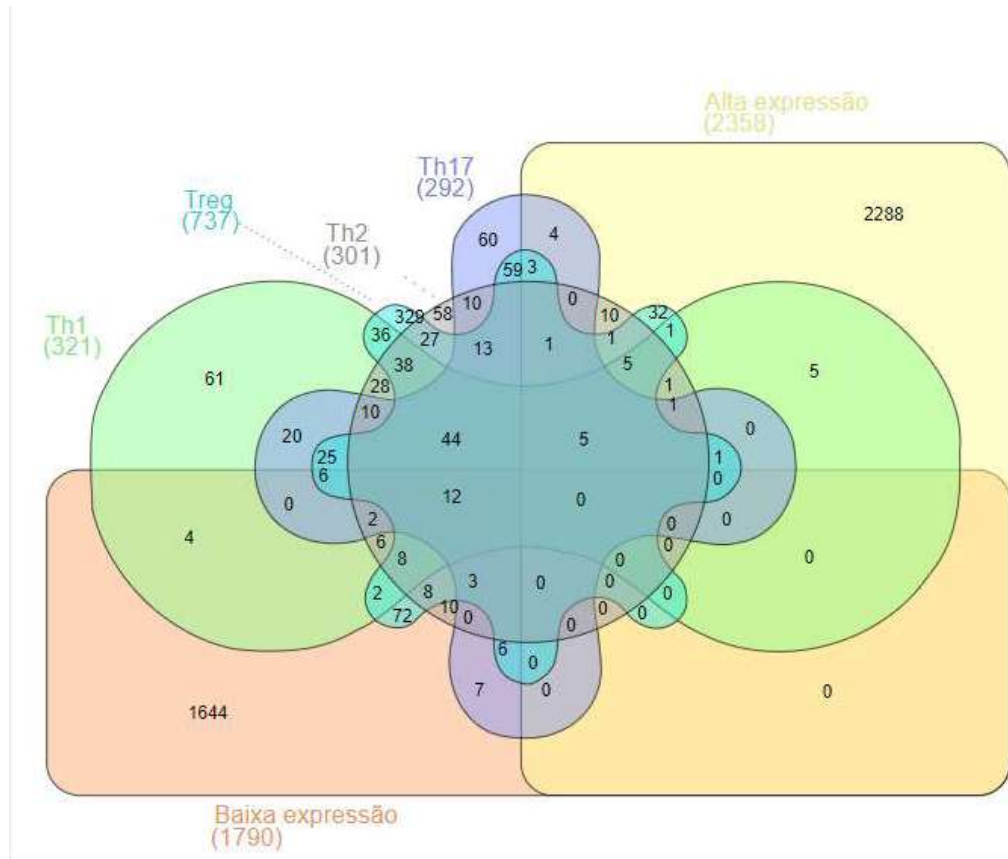
No subtipo de CM luminal B teve alta expressão de 3 genes associados à resposta Th1 (*Birc5*, *Wt1* e *Pla2g10*), 10 genes associados à resposta Th2 (*Myb*, *Il17rb*, *Pmaip1*, *Tmprss6*, *Tph1*, *Il20*, *Il19*, *Ifnl2*, *Chia* e *Sec14l3*), 5 genes associados à resposta Th17 (*Igf1r*, *Ren*, *Hist3h3*, *Adad1* e *Mir425*), e 35 genes à resposta Treg (*Hsp90aa1*, *Ccnd1*, *Pbx1*, *Foxa1*, *Laptm4b*, *Prlr*, *Cant1*, *Mki67*, *Pgr*, *Tk1*, *Retreg1*, *Foxm1*, *Pcsk1*, *Nek2*, *Ccna2*, *Hmmr*, *Pdzk1*, *Muc20*, *Cdkn3*, *Ccne1*, *Slc6a4*, *Cd177*, *Th*, *Adcy10*, *Tert*, *Il9r*, *Havcr1*, *Mir200a*., *Mir106b*, *Gad2*, *Ctag2*, *Mir26a2* e *Rag2* (Figura 22).

Figura 22 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama luminal B.



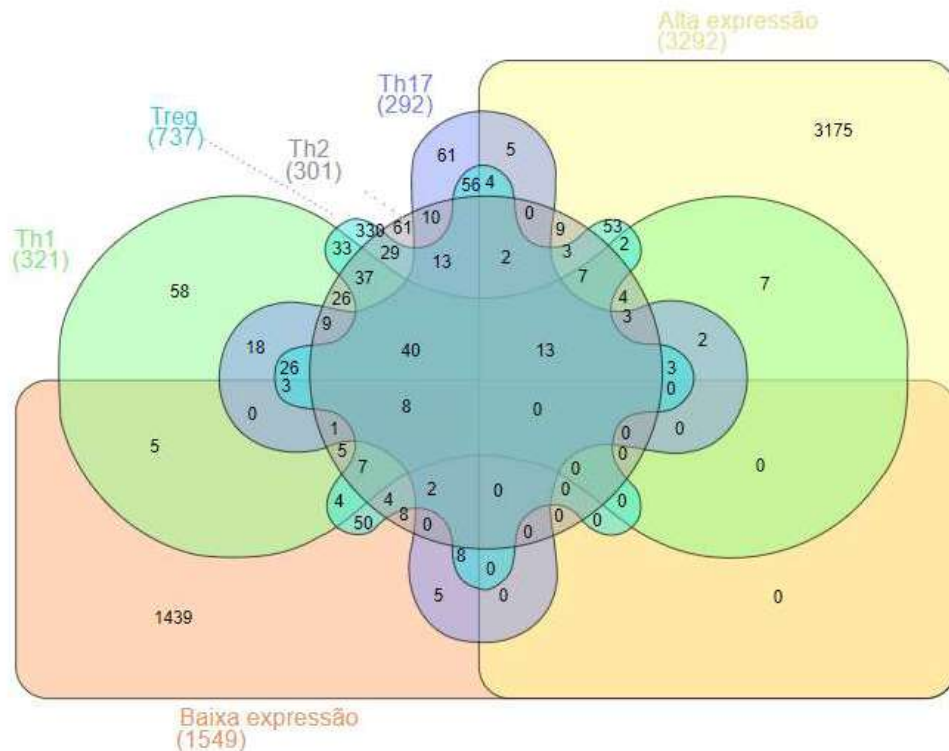
No subtipo de CM HER2 teve alta expressão de 5 genes associados à resposta Th1 (*Birc5*, *Wt1*, *Nkila*, *S100a7a* e *Pla2g10*), 10 genes associados à resposta Th2 (*Ormdl3*, *Spdef*, *Crisp3*, *Pcgf2*, *Crisp2*, *Scgb1a1*, *Il19*, *Clec6a*, *Ifnl2* e *Sec14l3*), 4 genes associados à resposta Th17 (*Muc6*, *Mmp1*, *Ren* e *Kir3dl2*), e 32 genes à resposta Treg (*Cd24*, *S100a9*, *Foxa1*, *S100a8*, *Mki67*, *Cxcl17*, *Tk1*, *Foxm1*, *Ccna2*, *Nek2*, *Hmmr*, *Hdac9*, *Dnmt3b*, *Cdkn3*, *Ascl2*, *Ccne1*, *Ca9*, *Slc6a4*, *Cd177*, *Magec1*, *Th*, *Proc*, *Il1rapl2*, *Paep*, *Il9r*, *Tert*, *Adcy10*, *Csag3*, *Art1*, *Ccl25*, *Havcr1* e *Ctag2*) (Figura 23).

Figura 23 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama HER2.



No subtipo de CM basal teve alta expressão de 7 genes associados à resposta Th1 (*Gbp1*, *Birc5*, *Ripk2*, *Hspa14*, *Tlr6*, *Nkila* e *Sftpd*), 9 genes associados à resposta Th2 (*Klk7*, *Pmaip1*, *Chst6*, *Ccl13*, *Adgre3*, *Clec6a*, *Chia*, *Ifnl2* e *Sec14l3*), 5 genes associados à resposta Th17 (*Lcn2*, *Mmp1*, *Casp5*, *Hist3h3* e *Adad1*), e 53 genes à resposta Treg (*Cd24*, *S100a9*, *Epcam*, *Dek*, *S100a8*, *Prom1*, *Mki67*, *Foxc1*, *Foxm1*, *Tk1*, *Muc16*, *Itgb8*, *Lamp3*, *Ccna2*, *Ptgs2*, *Nek2*, *Hmmr*, *Hdac9*, *Rasgrp1*, *Marco*, *Ccne1*, *Chrm3*, *Dnmt3b*, *Cdkn3*, *Ca9*, *Cxcl1*, *Adcyap1*, *Ankrd36b*, *Tg*, *Mir17hg*, *Gnb3*, *Tnfsf9*, *Prss3*, *Paep*, *Cd177*, *Tert*, *Th*, *Calca*, *Fgf11*, *Cngb1*, *Klf14*, *Mir25*, *Csag3*, *Ccl25*, *Il36g*, *Pglyrp1*, *Tbxt*, *Ccl1*, *Iapp*, *Ctag2*, *Rag2*, *Ifna10* e *Ifna4*) (Figura 24).

Figura 24 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados as repostas Th1, Th2, Th17 e Treg no subtipo de câncer de mama basal.



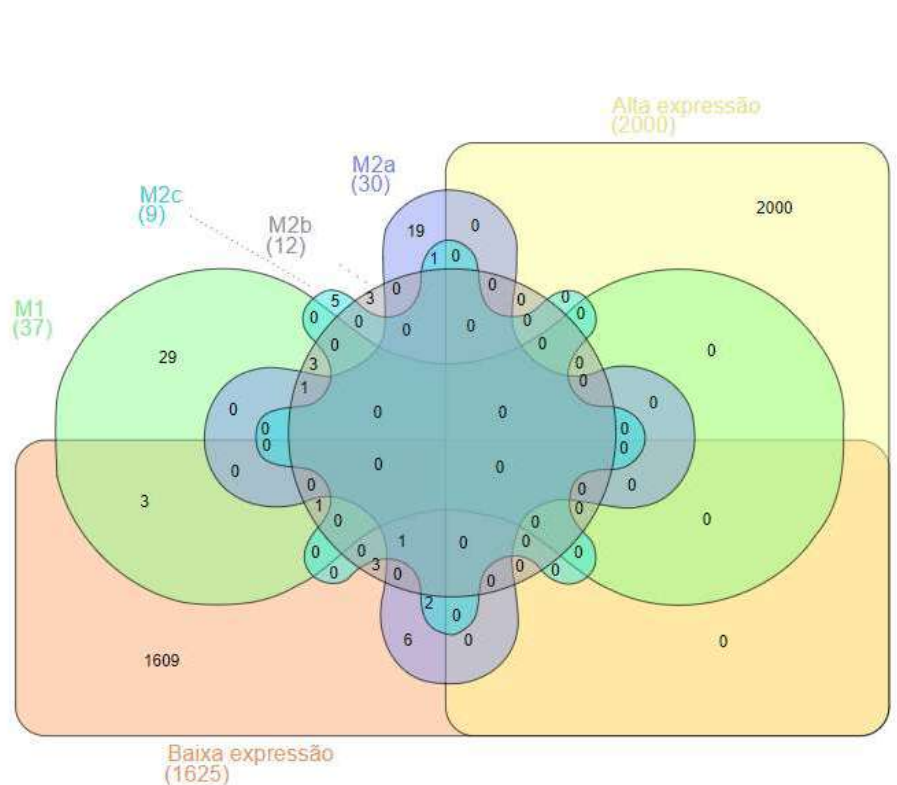
Com base na avaliação da lista de genes quanto à expressão dos genes associados aos subtipos de CM, nas respostas Th1, Th2 e Th17 não foi possível elucidar o tipo de resposta com base no quantitativo de genes mais expressos. Já na resposta Treg os genes mais expressos no subtipo de CM basal apresentou 53 genes, HER2 32 genes, luminal B 35 genes e luminal A 20 genes.

Após a comparação dos genes expressos associados às respostas imunes nos subtipos de CM foi realizada a comparação entre as subpopulações de macrófagos (Figura 25 à 28), subpopulação de neutrófilos (Figura 29), neuropeptídeos e neuroreceptores associados ao câncer (Figura 30) a fim de elucidar o perfil de resposta imune tendo em vista o perfil de macrófagos apresentado anteriormente na figura 20, no qual os subtipos com pior prognóstico (HER 2 e basal) apresentaram mais macrófagos do tipo M1 (Th1) e os de melhor prognóstico (luminal A e luminal B), mais macrófagos do tipo M2 (Th2).

No subtipo de CM luminal A nenhum dos 2000 genes com alta expressão foram encontrados em M1 e nas subpopulações de macrófagos M2a, M2b e M2c. Já dos 1625 genes

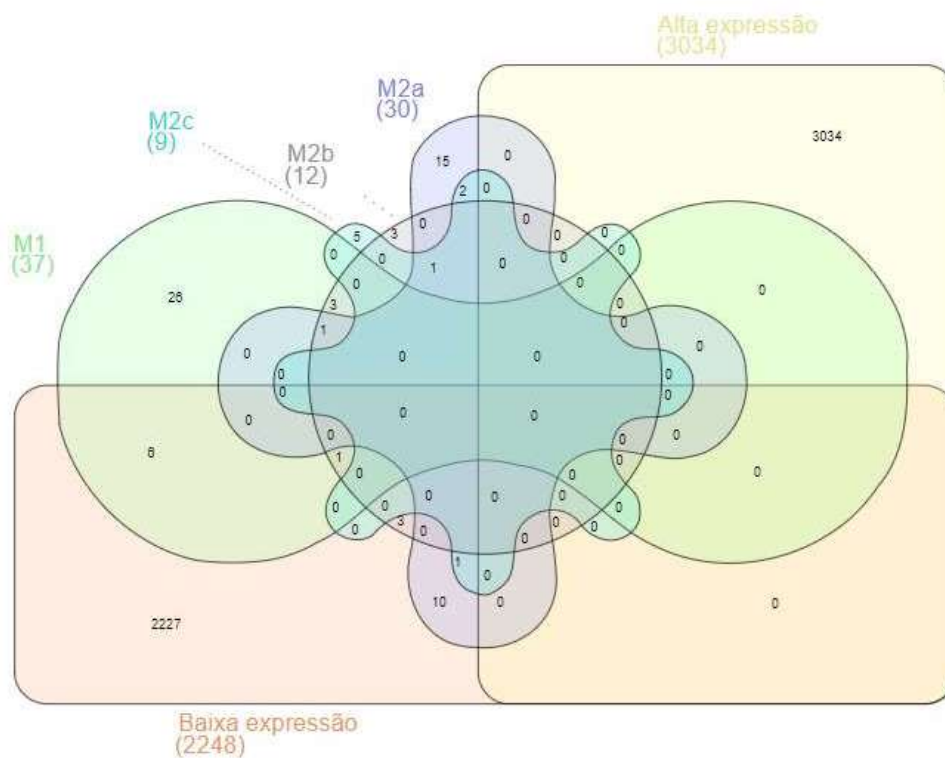
com baixa expressão foram identificados 3 genes (*Ccl2*, *Ccl19* e *Tlr2*) em M1, 6 genes (*Cd209*, *Ccl13*, *Arg1*, *Ccl23*, *Ccl24* e *Il13*) em M2a, 3 genes (*Cxcl2*, *Cxcl1* e *Cxcl3*) em M2b e nenhum gene em M2c (Figura 25).

Figura 25 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama luminal A.



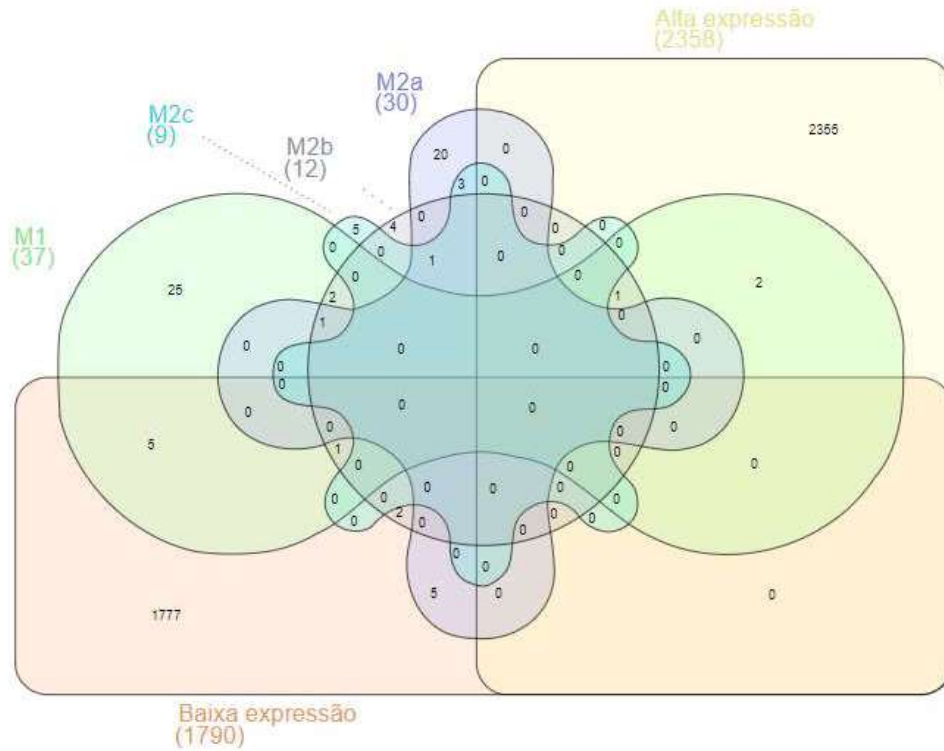
No subtipo de CM luminal B nenhum dos 3034 genes com alta expressão foram encontrados em M1 e nas subpopulações de macrófagos M2a, M2b e M2c. Já dos 2248 genes com baixa expressão foram identificados 6 genes (*Socs3*, *Cxcl13*, *Ccl19*, *Ccl2*, *Tlr2* e *Ccr7*) em M1, 10 genes (*Fgl2*, *Ccl22*, *Ccl14*, *Igf1*, *Cd209*, *Ccl17*, *Ccl23*, *Arg1*, *Ccl24* e *Il13*) em M2a, 3 genes (*Cxcl2*, *Cxcl1* e *Cxcl3*) em M2b e nenhum gene em M2c (Figura 26).

Figura 26 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama luminal B.



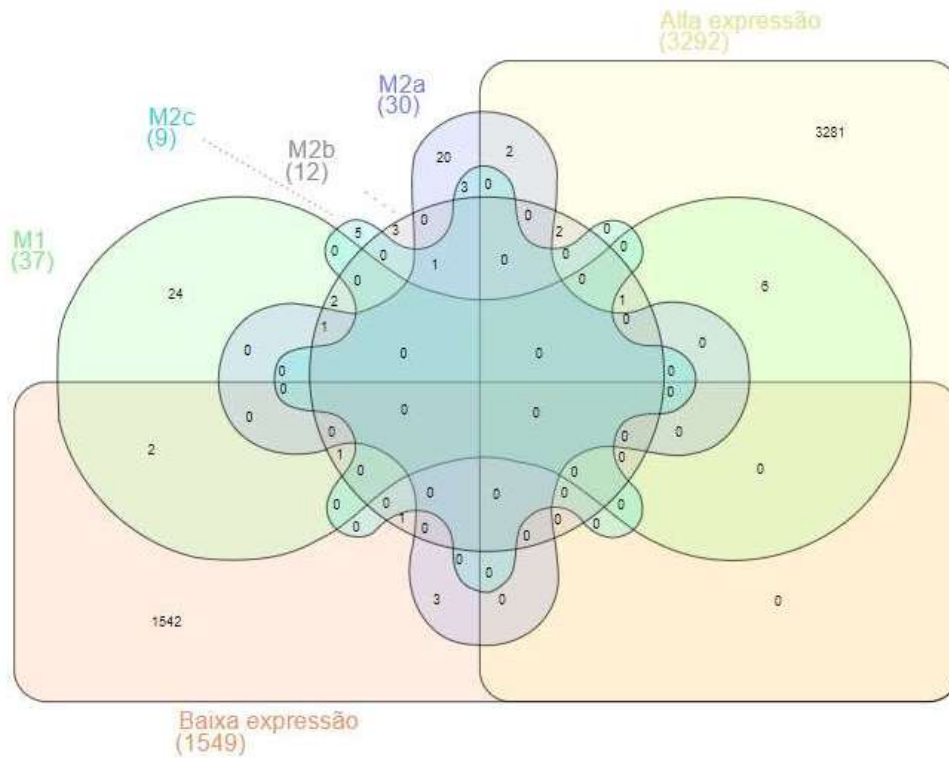
No subtipo de CM HER2 dos 2358 genes com alta expressão foram encontrados 2 genes (*Ccl11* e *Ifng*) em M1 e nenhum gene nas subpopulações de macrófagos M2a, M2b e M2c. Já dos 1790 genes com baixa expressão foram identificados 5 genes (*Socs3*, *Cxcl13*, *Ccl2*, *Ccl19* e *Il5*) em M1, 5 genes (*Ccl14*, *Igf1*, *Cd209*, *Arg1* e *Ccl23*) em M2a, 2 genes (*Cxcl2* e *Cxcl3*) em M2b e nenhum gene em M2c (Figura 27).

Figura 27 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama HER2.



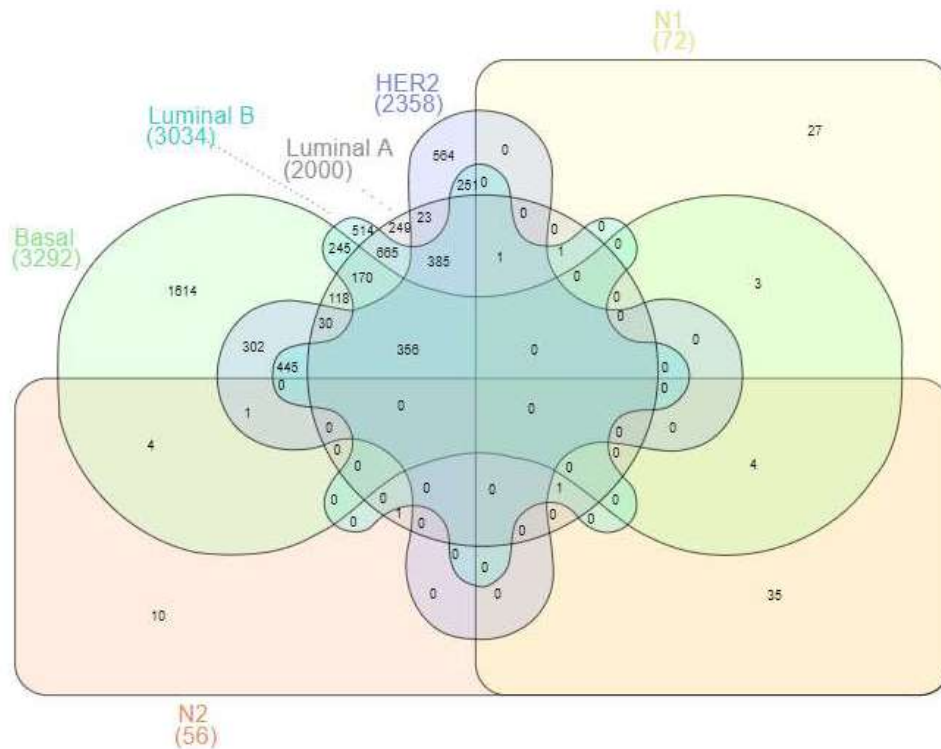
No subtipo de CM basal dos 3292 genes com alta expressão foram encontrados 6 genes (*Cxcl10*, *Cxcl11*, *Ccl8*, *Tnf*, *Cd80* e *Ifng*) em M1, 2 genes (*Ccl13* e *Ccl24*) em M2a, 2 genes (*Cxcl1* e *Ccl1*) em M2b e nenhum gene em M2c. Já dos 1549 genes com baixa expressão foram identificados 2 genes (*Cxcl13* e *Il5*) em M1, 3 genes (*Ccl14*, *Igfl* e *Arg1*) em M2a, 1 gene (*Cxcl2*) em M2b e nenhum gene em M2c (Figura 28).

Figura 28 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta e a baixa expressão dos genes associados aos macrófagos M1, M2a, M2b e M2c no subtipo de câncer de mama basal.



No subtipo de CM luminal A foi identificado um gene (*Serpina 1*) associado ao neutrófilo N2 e nenhum ao N1. Já no luminal B e HER2 não foi encontrado nenhum gene associado apenas ao N1 e/ou N2. No subtipo basal foi encontrado 3 genes (*Cxcl1*, *Cxcl10* e *Pla2g4a*) relacionados ao N1 e 4 genes (*Csf2*, *Cxcl5*, *Nos2* e *Il1a*) ao N2 (Figura 29).

Figura 29 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta expressão dos genes dos subtipos de CM com as subpopulações de neutrófilos N1 e N2.

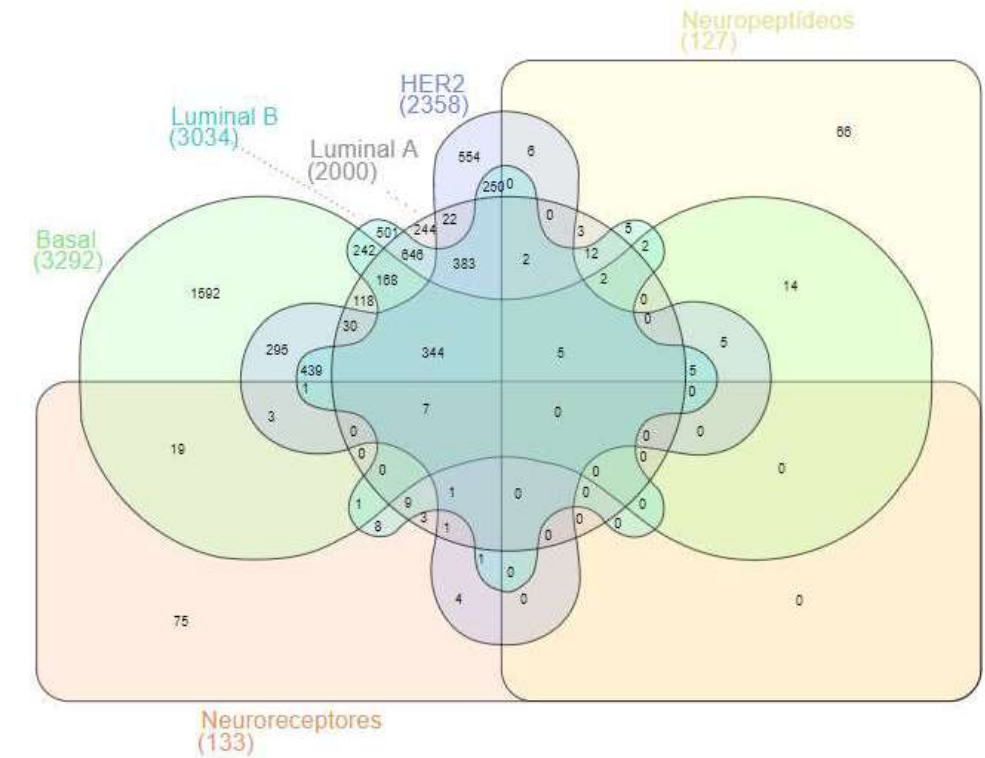


Além da análise entre os genes expressos nos subtipos do CM (luminal A, luminal B, HER2 e basal) nos macrófagos, neutrófilos e respectivas subpopulações, foi realizado a análise de 127 genes de neuropeptídeos e 133 neuroreceptores publicados por Zhao e colaboradores em 2017. Tendo em vista que estudos como o de Ganea e Delgado em 2001 relataram a síntese e liberação de neuropeptídeos pelos macrófagos e efeitos biológicos. Dentre os efeitos biológicos relatados por esses autores, foi suposto a hipótese de que o macrófago M1 presente no subtipos Basal e HER2 sejam modulados a apresentar esse fenótipo por neuropeptídeos ao invés de M2 que tem um efeito imunossupressor. Além de ter uma influência no fenótipo dos neutrófilos e também na sobrevida dos pacientes.

No subtipo de CM luminal A foi identificado 3 genes (*Ins*, *Nts* e *Ucn*) associados aos neuropeptídeos e 3 genes (*Lrp2*, *Lhcgr* e *Npy5r*) aos neuroreceptores. Já no luminal B, 5 genes (*Cbln1*, *Chga*, *Gnrh2*, *Nxph2* e *Trh*) associados aos neuropeptídeos e 8 genes (*Adipor2*, *Calcr*, *Sstr2*, *Sstr4*, *Sstr5*, *Mlnr*, *Brs3* e *Tacr3*) aos neuroreceptores. No subtipo HER2 foi encontrado 6 genes (*Csh1l*, *Dkk1*, *Gip*, *Nxph1*, *Nxph4* e *Prl*) associados aos neuropeptídeos e 4 genes (*Kremen2*, *Galr1*, *Gpr39* e *Prokr1*) aos neuroreceptores. No subtipo basal foi

encontrado 14 genes (*Acbd7*, *Adcyap1*, *Calca*, *Calcb*, *Cck*, *Gal*, *Gast*, *Gnrh1*, *Iapp*, *Nmb*, *Nppc*, *Pcsk1n*, *Pomc* e *Prok2*) relacionados aos neuropeptídeos e 19 genes (*Mc4r*, *Mas1*, *Cckbr*, *Tshr*, *Crhr1*, *Gpr151*, *Gcgr*, *Glp2r*, *Ghrhr*, *Rxfp4*, *Npffr1*, *Npr3*, *Npsr1*, *Npy4r*, *Oprk1*, *Prokr2*, *Qrfpr*, *Rxfp1* e *Trhr*) aos neuroreceptores (Figura 30).

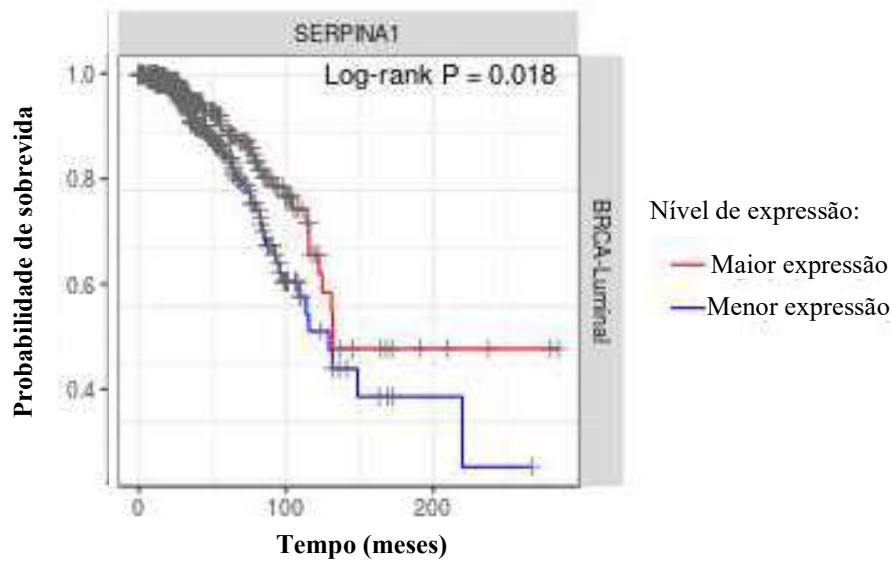
Figura 30 - Diagrama de Venn de genes diferencialmente expressos no perfil de expressão do mRNA do conjunto de dados. Associação entre a alta expressão dos genes dos subtipos de CM com os dos neuropeptídeos e neuroreceptores.



6.3 Relação da sobrevida com os genes expressos nos subtipos de câncer pelos macrófagos, neutrófilos, neuropeptídeos e neuroreceptores

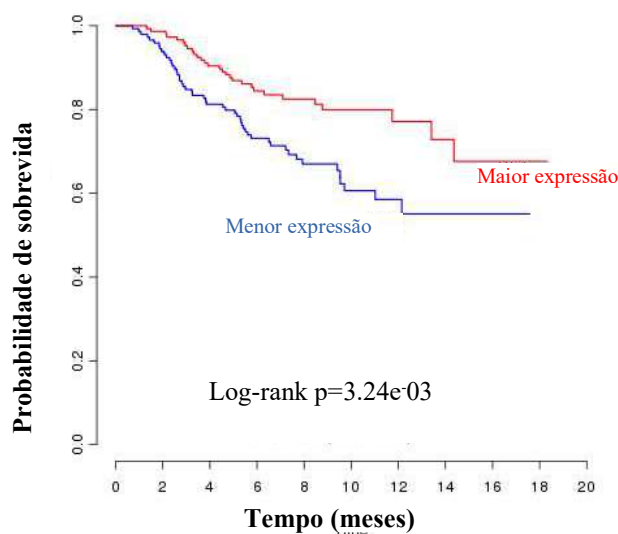
No subtipo de CM luminal A nenhum dos genes expressos pelos M1, M2a, M2b e M2c tiveram impacto na sobrevida. Com relação aos neutrófilos N1 e N2, apenas o gene *Serpinal1* expresso por N2 teve impacto na sobrevida (Figura 31). Já os genes dos neuropeptídeos não tiveram impacto na sobrevida, somente o gene *Lrp2* do neuroreceptor (Figura 32).

Figura 31 - Análise da sobrevida do gene *Serpina1* expresso pelo neutrófilo N2 nos subtipos luminais. Quanto maior a expressão do gene, maior a sobrevida do paciente com subtipo de câncer de mama luminais. O espaço amostral foi composto por 525 pacientes com o subtipo de câncer de mama luminais.



Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web TIMER.

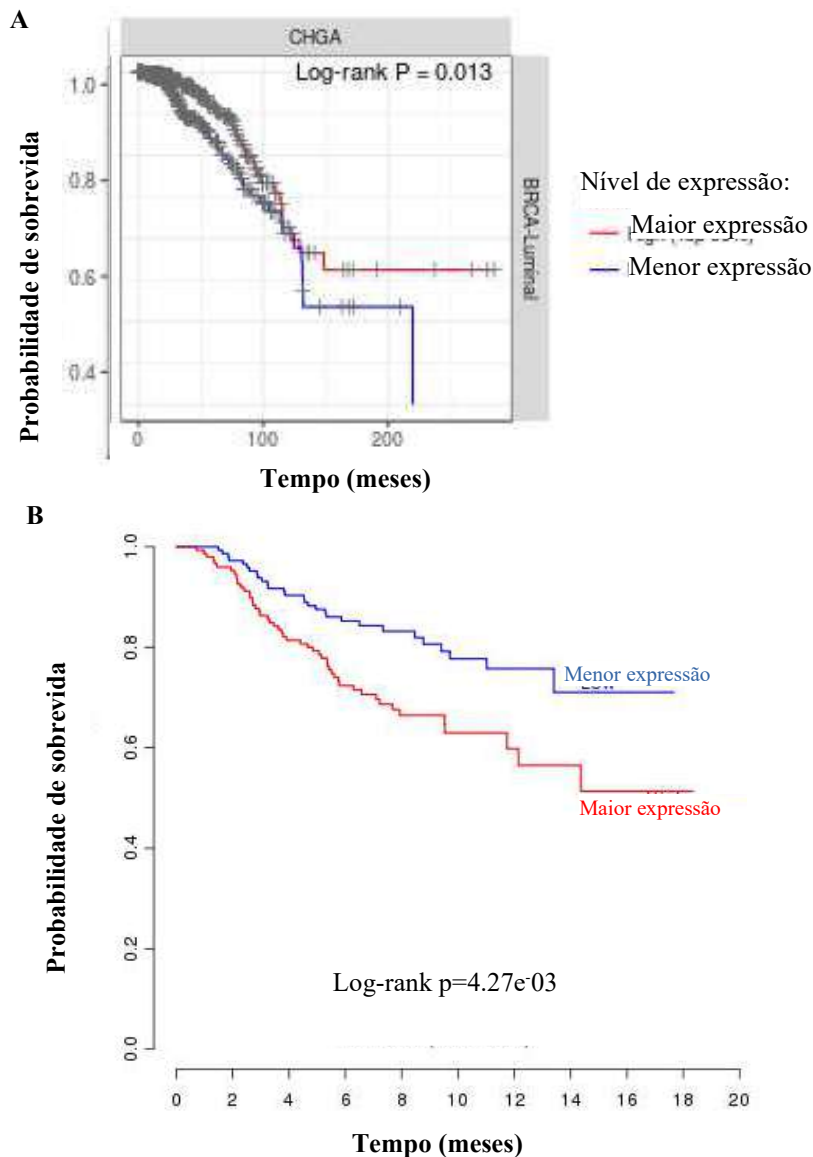
Figura 32 - Análise da sobrevida do gene *Lrp2* expresso pelos neuroreceptores no câncer de mama. Quanto maior a expressão do gene, maior a sobrevida do paciente com câncer de mama. O espaço amostral foi composto por 255 pacientes com CM.



Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

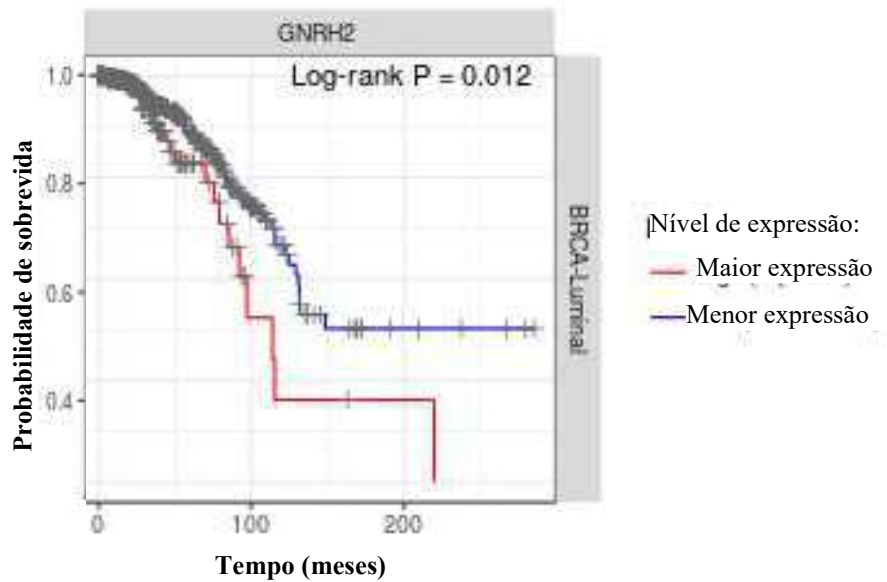
No subtipo de CM luminal B nenhum dos genes expressos pelos M1, M2a, M2b e M2c, N1 e N2 tiveram impacto na sobrevida. Os genes *Chga* (Figura 33) e *Gnrh2* (Figura 34) dos neuropeptídeos e o gene *Calcr* (Figura 35) do neuroreceptor tiveram impacto na sobrevida.

Figura 33 - Análise da sobrevida do gene *Chga* (A, B) expresso pelos neuropeptídeos nos subtipos luminais (A) e no câncer de mama (B). Quanto maior a expressão do gene, maior a sobrevida do paciente com subtipo de CM luminais (A). Já no câncer de mama (B), quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente. O espaço amostral foi composto por 525 pacientes com o subtipo de CM luminais (A) e 255 pacientes com câncer de mama (B).



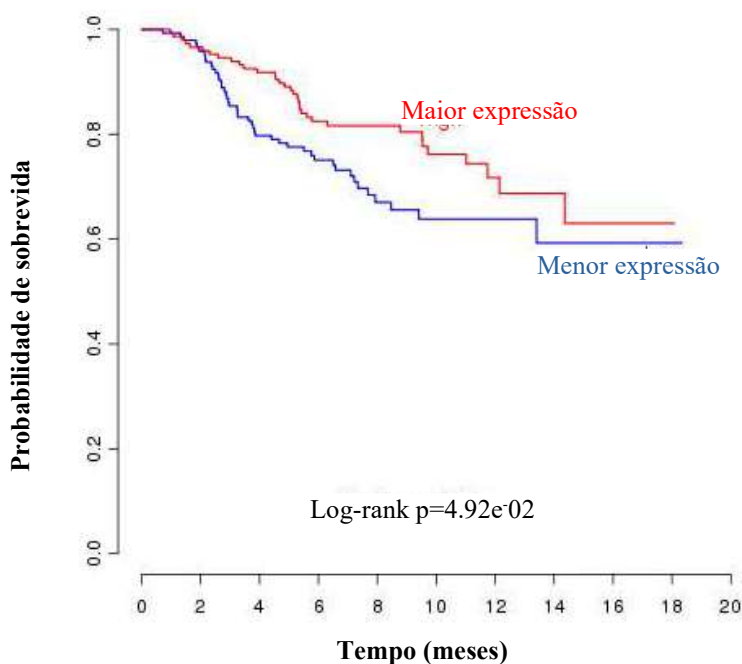
Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web TIMER (A) PRECOG (B).

Figura 34 - Análise da sobrevida do gene *Gnrh2* expresso pelo neuropeptídeo nos subtipos luminais. Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com subtipo de CM luminais . O espaço amostral foi composto por 525 pacientes com o subtipo de CM luminais .



Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web TIMER.

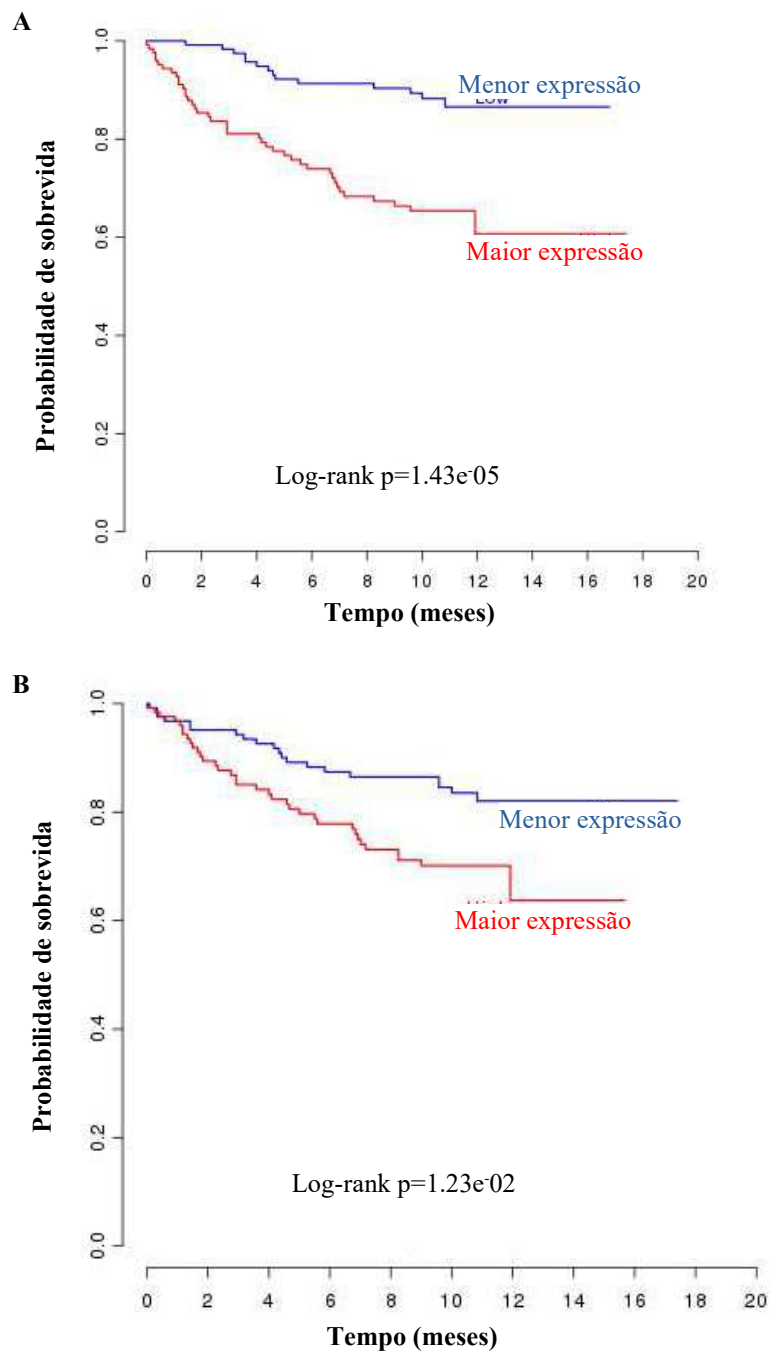
Figura 35 - Análise da sobrevida do gene *Calcr* expresso pelo neuroreceptor no câncer de mama. Quanto maior a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama. O espaço amostral foi composto por 255 pacientes com câncer de mama.



Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

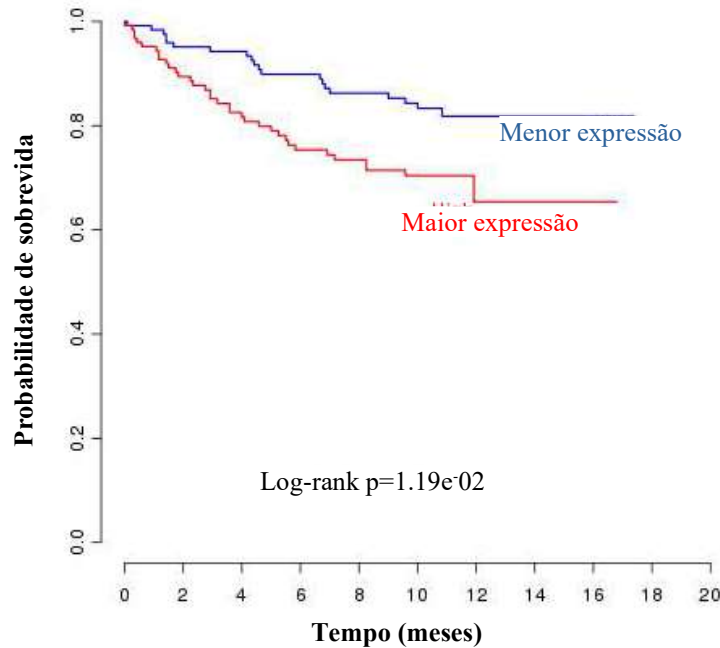
No subtipo de CM HER2 nenhum dos genes expressos pelos M1, M2a, M2b e M2c, N1 e N2 tiveram impacto na sobrevida. Os genes *Nxph1* e *Prl* (Figura 36) dos neuropeptídeos e o gene *Galr1* (Figura 37) do neuroreceptor tiveram impacto na sobrevida.

Figura 36 - Análise da sobrevida do gene *Nxph1* (A) e *Prl* (B) expresso pelo neuropeptídeos no câncer de mama. Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama. O espaço amostral foi composto por 251 pacientes com câncer de mama.



Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

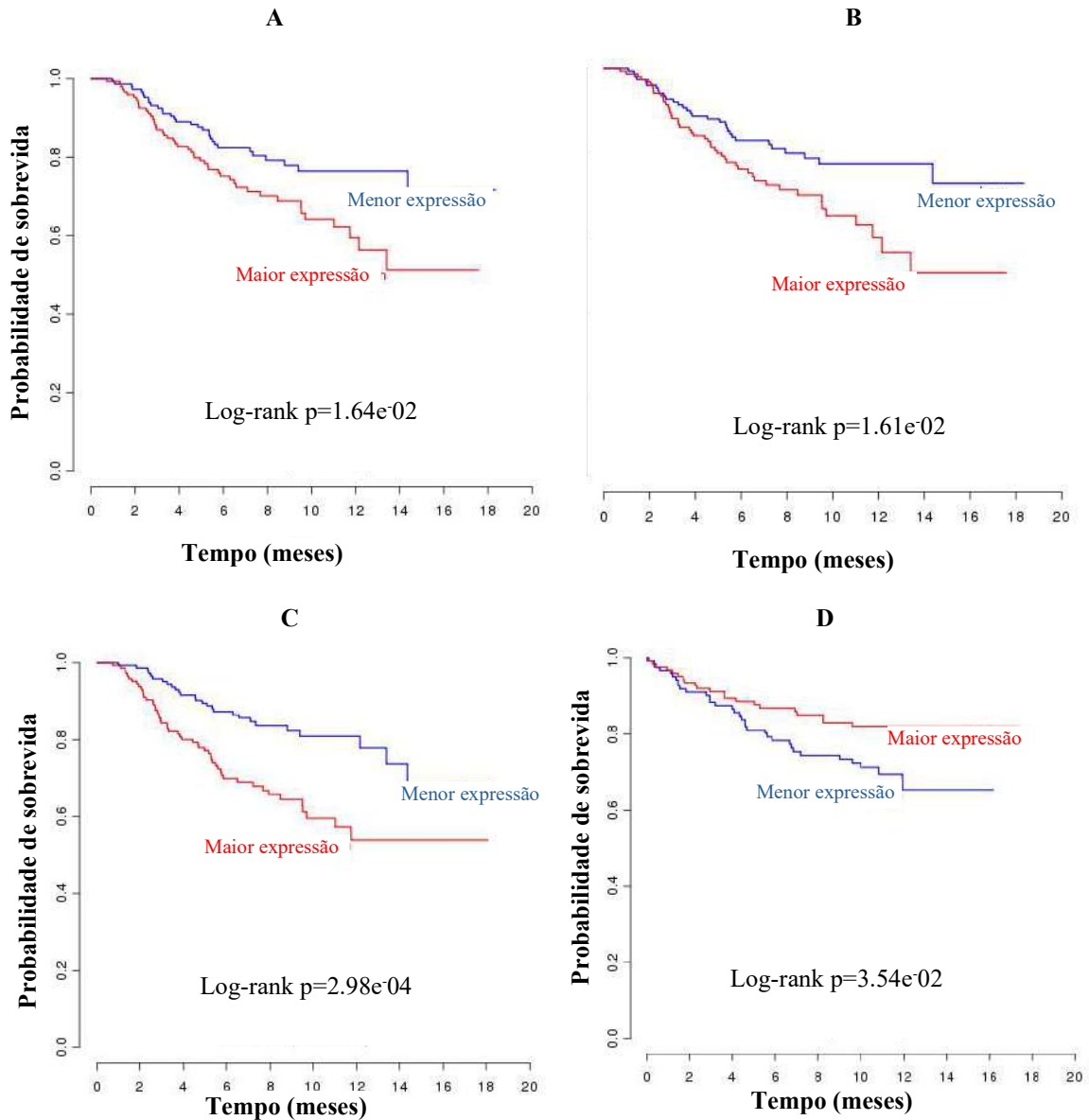
Figura 37 - Análise da sobrevida do gene *Galr1* expresso pelo neuroreceptor no câncer de mama. Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama. O espaço amostral foi composto por 251 pacientes com câncer de mama.



Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

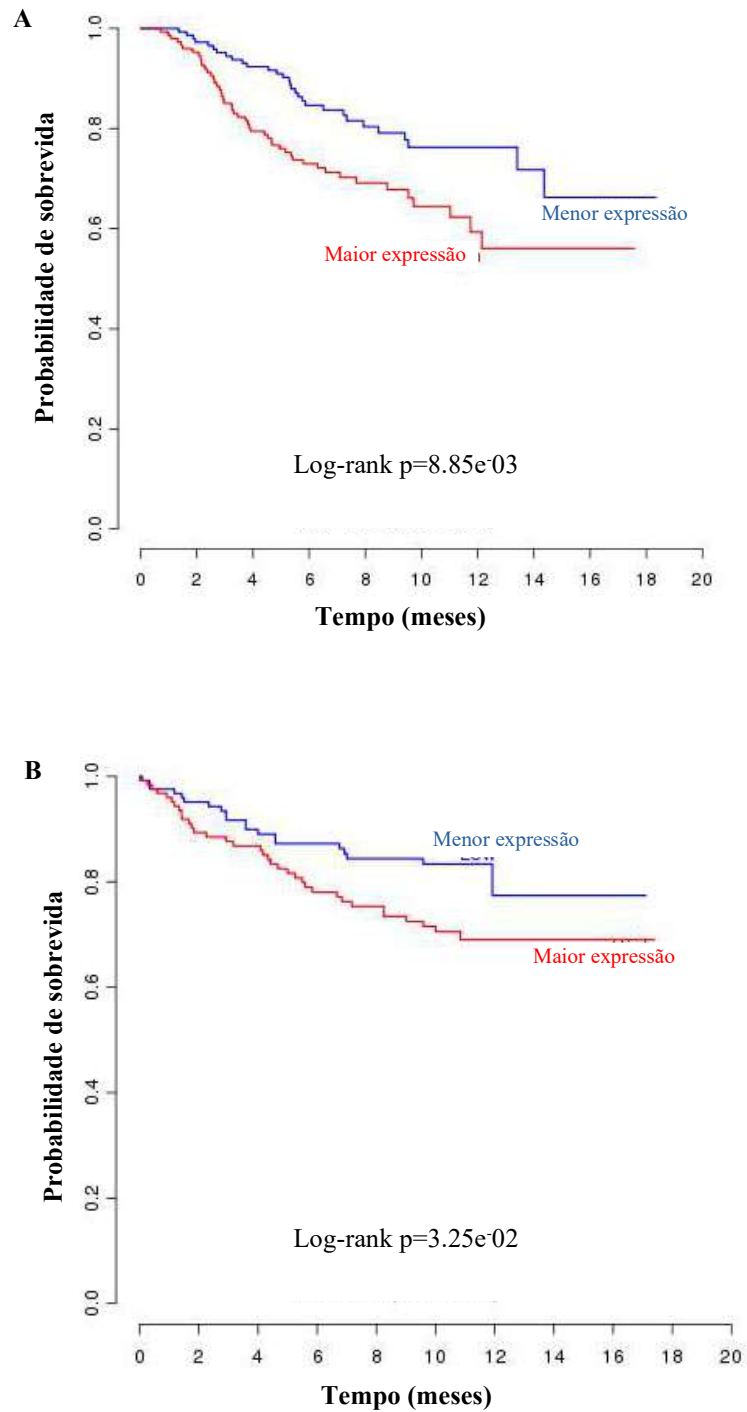
No subtipo de CM basal 4 genes (*Cxcl10*, *Cxcl11*, *Ccl8*, *Tnf*) expressos pelos M1 (Figura 38), 2 genes (*Ccl13* e *Ccl24*) em M2a (Figura 39), 1 gene (*Cxcl1*) em M2b (Figura 40), 3 genes (*Cxcl1*, *Pla2g4a* e *Cxcl10*) em N1 (Figura 40, 41 e 42, respectivamente), 1 gene (*Nmb*) nos neuropeptídeos (Figura 43) e 2 genes (*Npr3* e *Qrfpr*) nos neuroreceptores (Figura 44) tiveram impacto na sobrevida.

Figura 38 - Análise da sobrevida dos genes *Cxcl10* (A), *Cxcl11* (B), *Ccl8* (C), *Tnf* (D) expresso pelos macrófagos M1 no câncer de mama. Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama (A, B e C), já em D a relação é diretamente proporcional. O espaço amostral foi composto por 255 (A, B e C) e 251 (D) pacientes com câncer de mama.



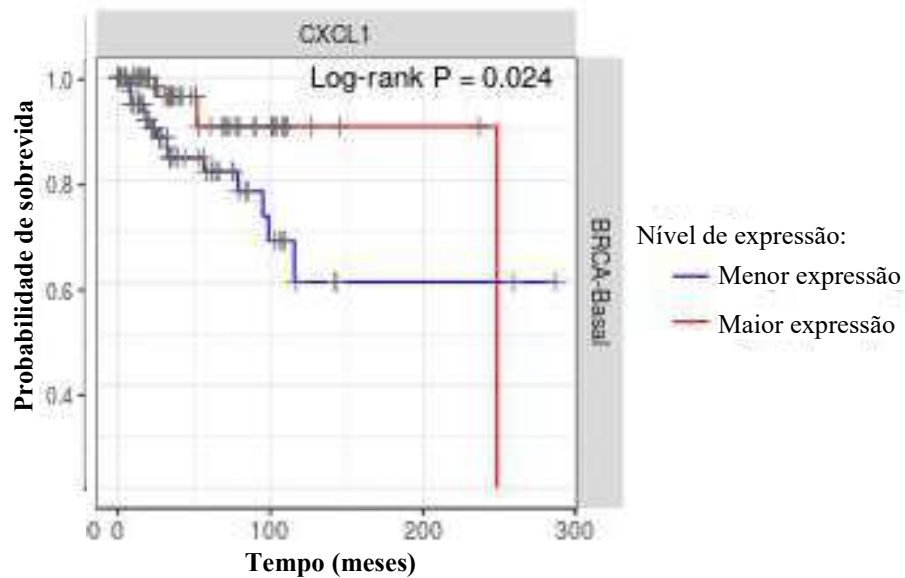
Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

Figura 39 - Análise da sobrevida dos genes *Ccl13* (A) e *Ccl24* (B) expresso pelos macrófagos M2a no câncer de mama. Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama. O espaço amostral foi composto por 255 (A), e 251 (B) pacientes com câncer de mama.



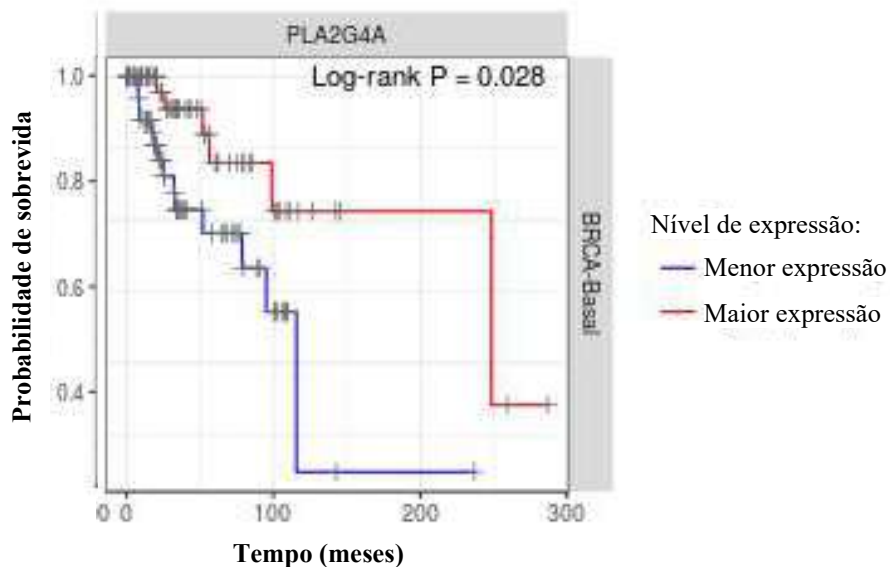
Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

Figura 40 - Análise da sobrevida do gene *Cxcl1* expresso pelos macrófagos M2b e neutrófilos N1 no subtipo de câncer de mama basal. Quanto maior a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com o subtipo de câncer de mama basal. O espaço amostral foi composto por 108 pacientes com subtipo de câncer de mama basal.



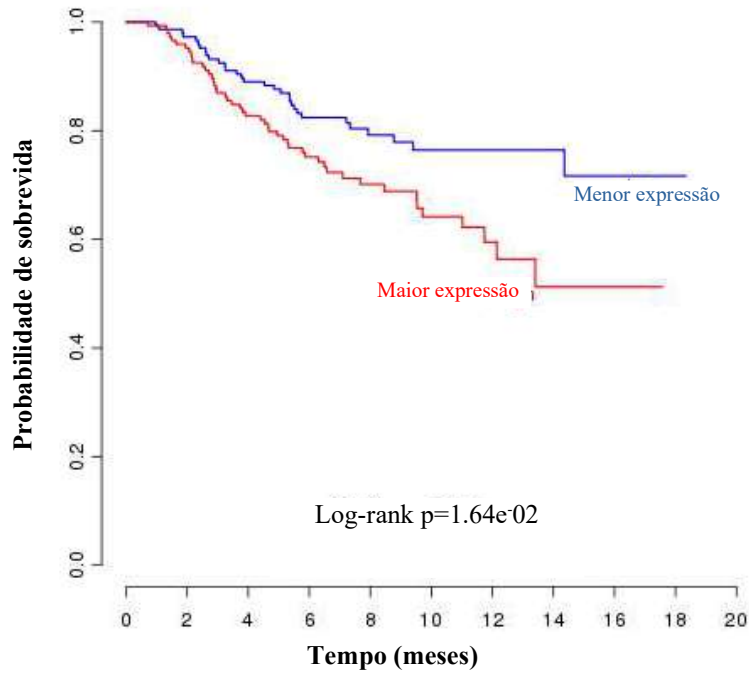
Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web TIMER.

Figura 41 - Análise da sobrevida do gene *Pla2g4* expresso pelos neutrófilos N1 no subtipo de câncer de mama basal. Quanto maior a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com o subtipo de câncer de mama basal. O espaço amostral foi composto por 108 pacientes com o subtipo de câncer de mama basal .



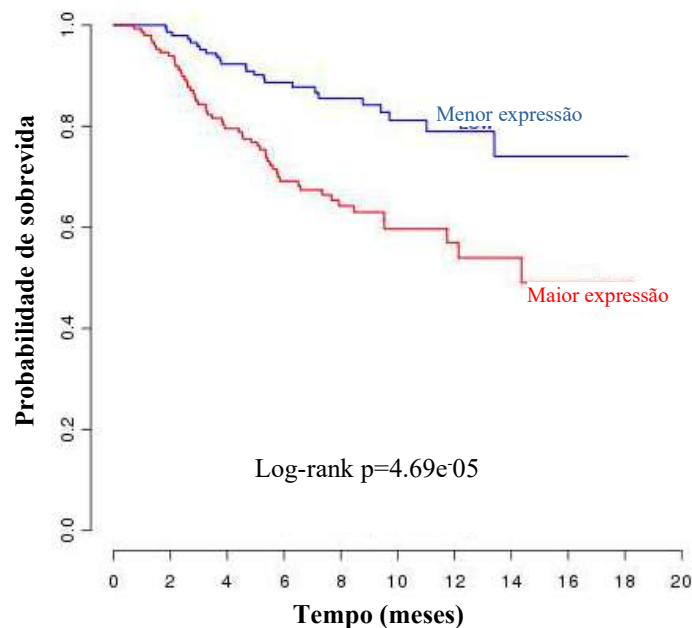
Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web TIMER.

Figura 42 - Análise da sobrevida do gene *Cxcl10* expresso pelos neutrófilos N1 no câncer de mama. Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama. O espaço amostral foi composto por 255 pacientes com câncer de mama.



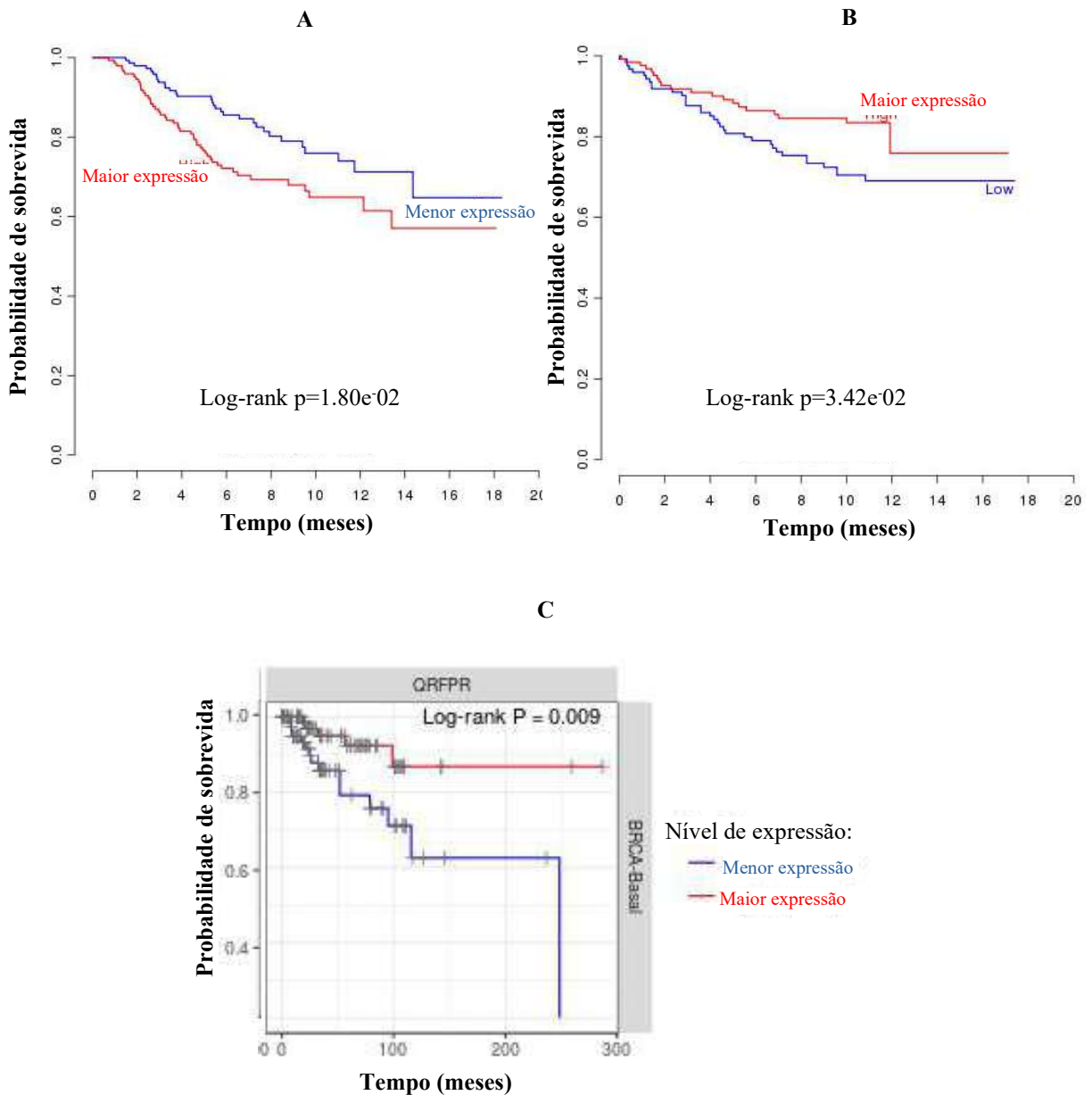
Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

Figura 43 - Análise da sobrevida do gene *Nmb* expresso por neuropeptídeos no câncer de mama. Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama. O espaço amostral foi composto por 255 pacientes com câncer de mama.



Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG.

Figura 44 - Análise da sobrevida do gene *NPR3* (A), *Mas1* (B) e *QRFPR* (C) expresso por neuroreceptores no câncer de mama (A, B) e no subtipo de câncer de mama basal (C). Quanto menor a expressão do gene, maior é a sobrevida do paciente com câncer de mama (A), já em B e C a relação é diretamente proporcional. O espaço amostral foi composto por 255 (A), 251 (B) e 108 (C) pacientes com câncer de mama.



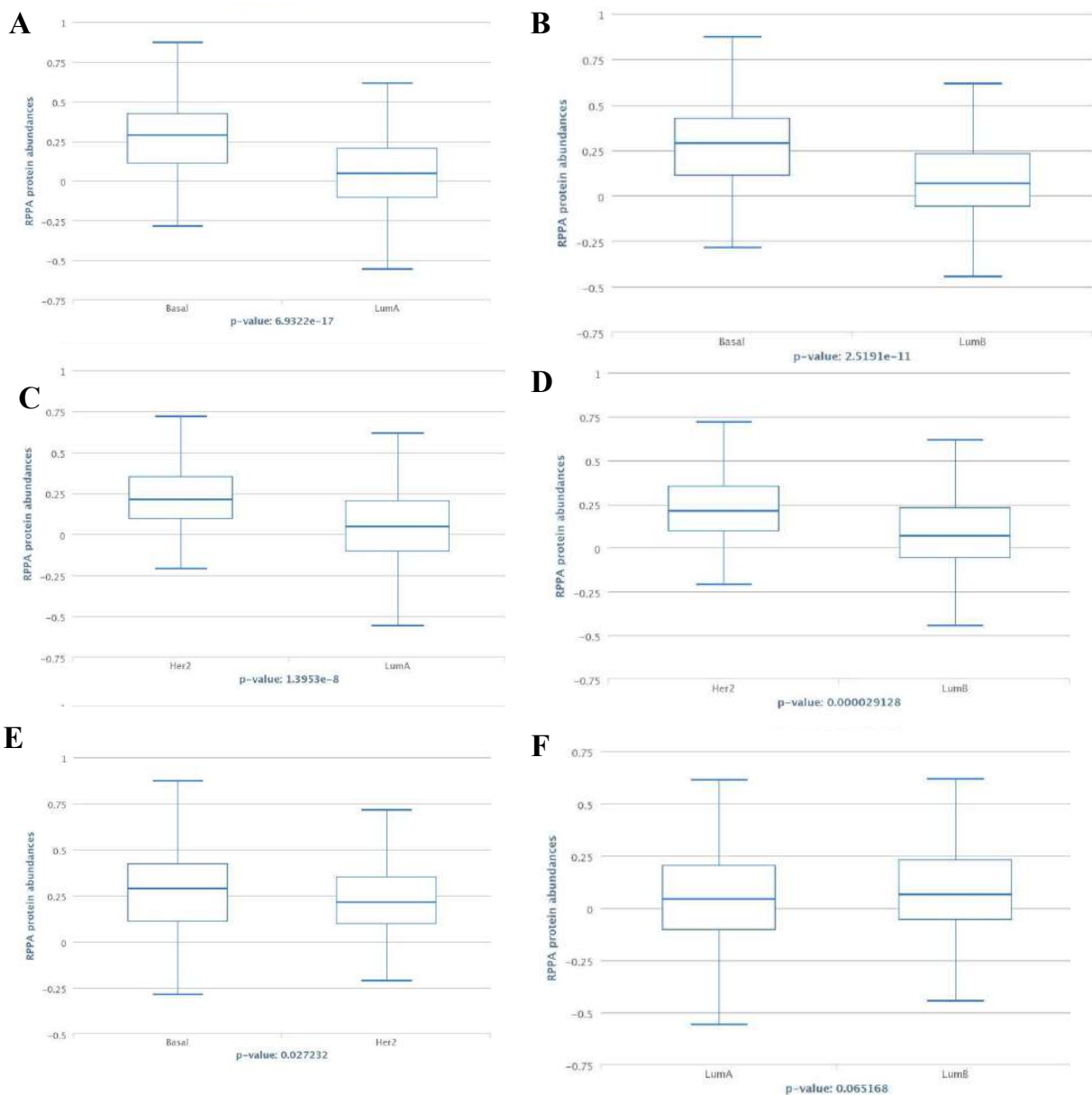
Fonte: Os dados foram obtidos e extraídos do servidor da web PRECOG (A e B) e TIMER (C).

6.4 Expressão de proteínas nos infiltrados dos tumores dos subtipos de câncer de mama

A análise da expressão da proteína PD-L1 (gene *Cd274*) é importante em estudos de células neoplásicas, pois é expressa nas células tumorais e indica imunossupressão. Houve

aumento da expressão da proteína PD-L1 nos subtipos basal e HER2 quando comparados com os subtipos luminal A e luminal B, e do basal em relação ao HER2. Já entre os subtipos luminais não houve diferença significativa (Figura 45).

Figura 45 - Expressão da proteína PD-L1 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína PD-L1 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).

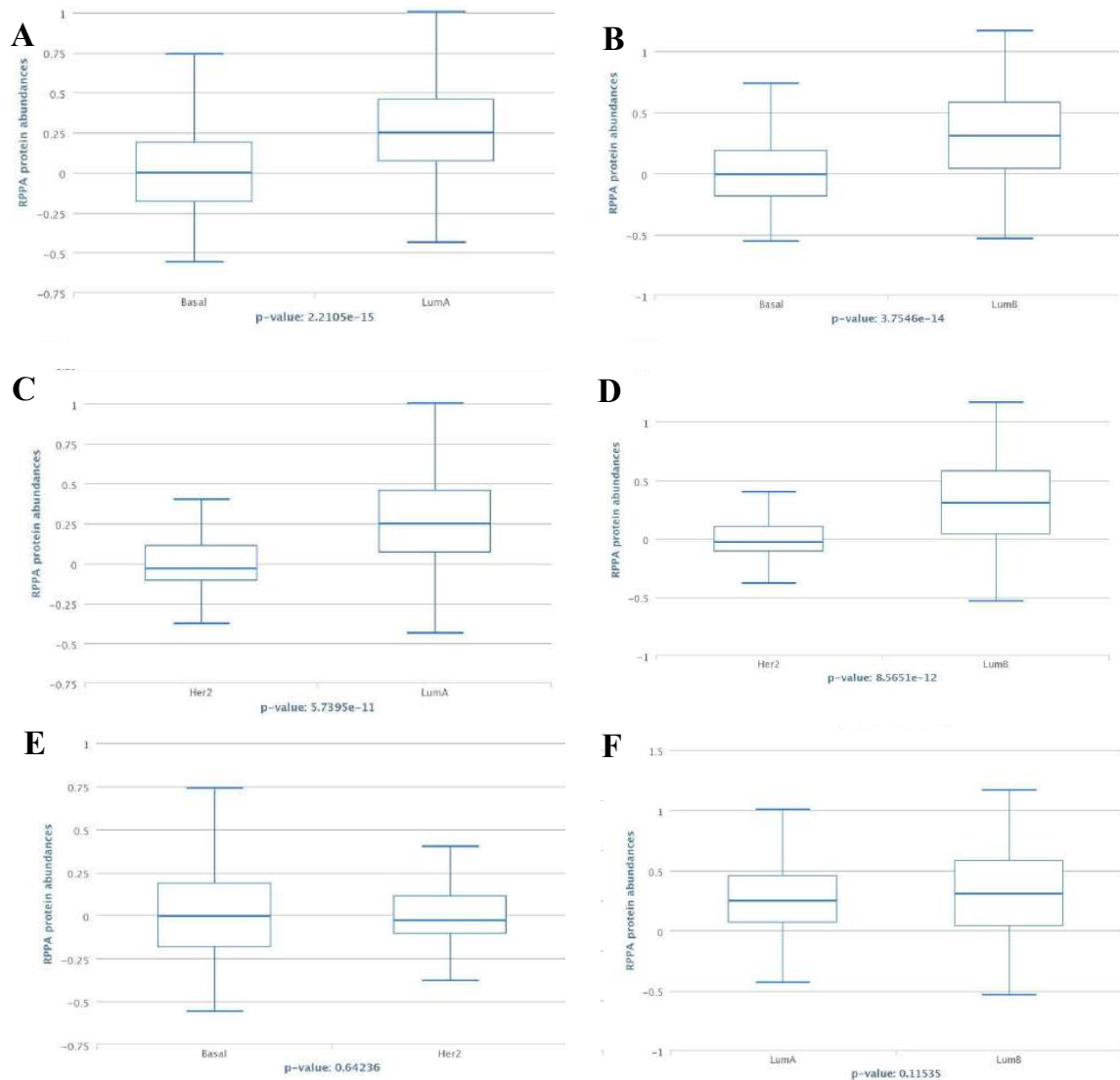


Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web T CPA.

A expressão das proteínas IRS1 (gene *Irs1*), AKT_pS473 (genes *Akt1*, *Akt2* e *Akt3*),

AKT_pT308 (genes *Akt1*, *Akt2* e *Akt3*) e PRAS40_pT246 (genes *Akt1*, *Akt2* e *Akt3*) foram comparadas entre os subtipos de CM (luminal A, luminal B, HER2 e basal). Essas proteínas foram selecionadas por serem componentes de processos biológicos que incluem proliferação, crescimento celular e angiogênese. Houve aumento da expressão da proteína IRS1 nos subtipos luminais tanto em relação ao basal quanto ao HER2. Já entre os subtipos luminais e entre o basal e HER2 não houve diferença significativa (Figura 46).

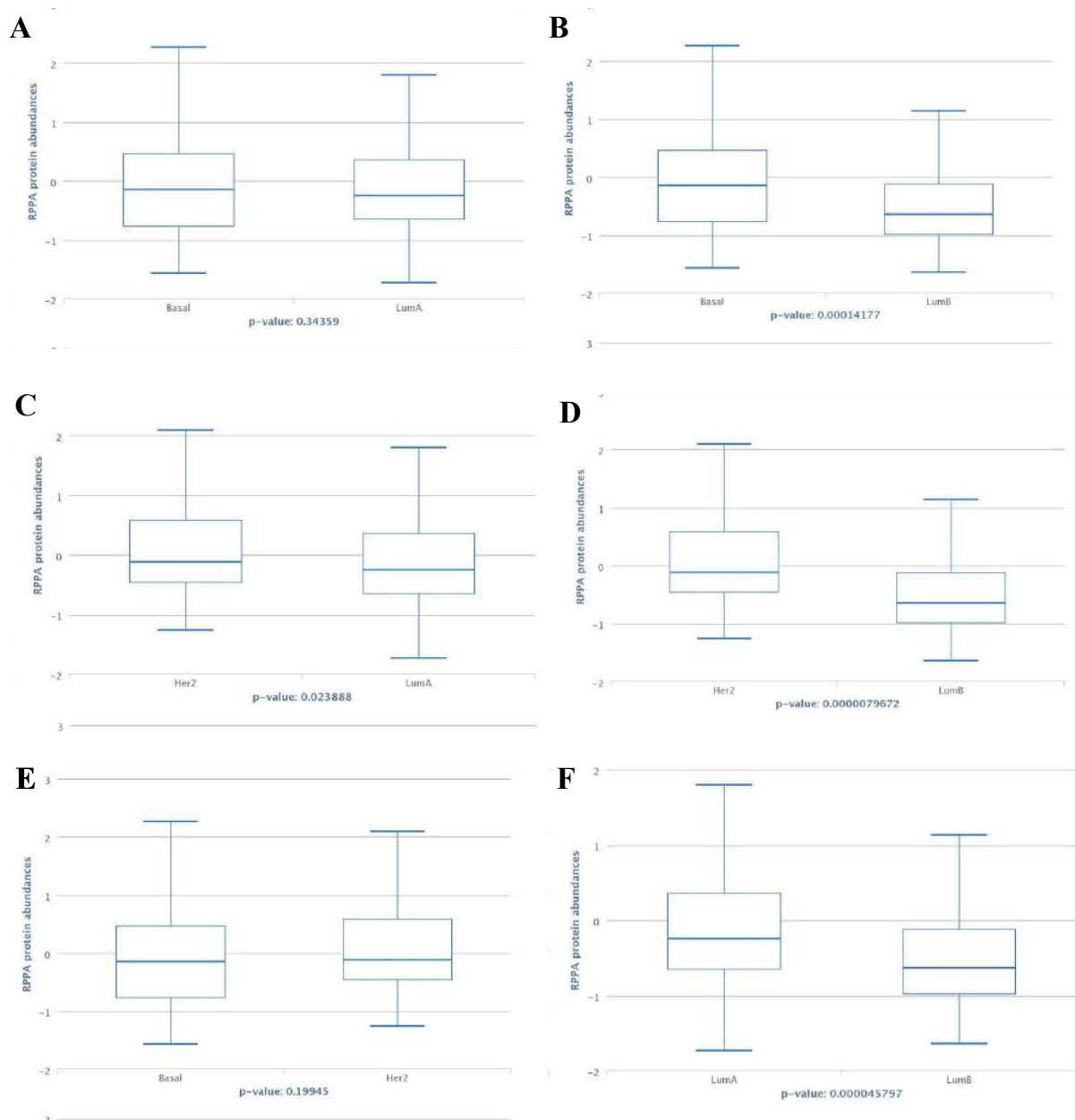
Figura 46 - Expressão da proteína IRS1 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína IRS1 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TCPA.

Houve aumento da expressão da AKT_pS473 no subtipo basal quando comparado com o luminal B, de HER2 em relação aos luminais e do luminal A em relação ao luminal B. Já entre o subtipo o basal em relação ao luminal A e HER2, não houve diferença significativa (Figura 47).

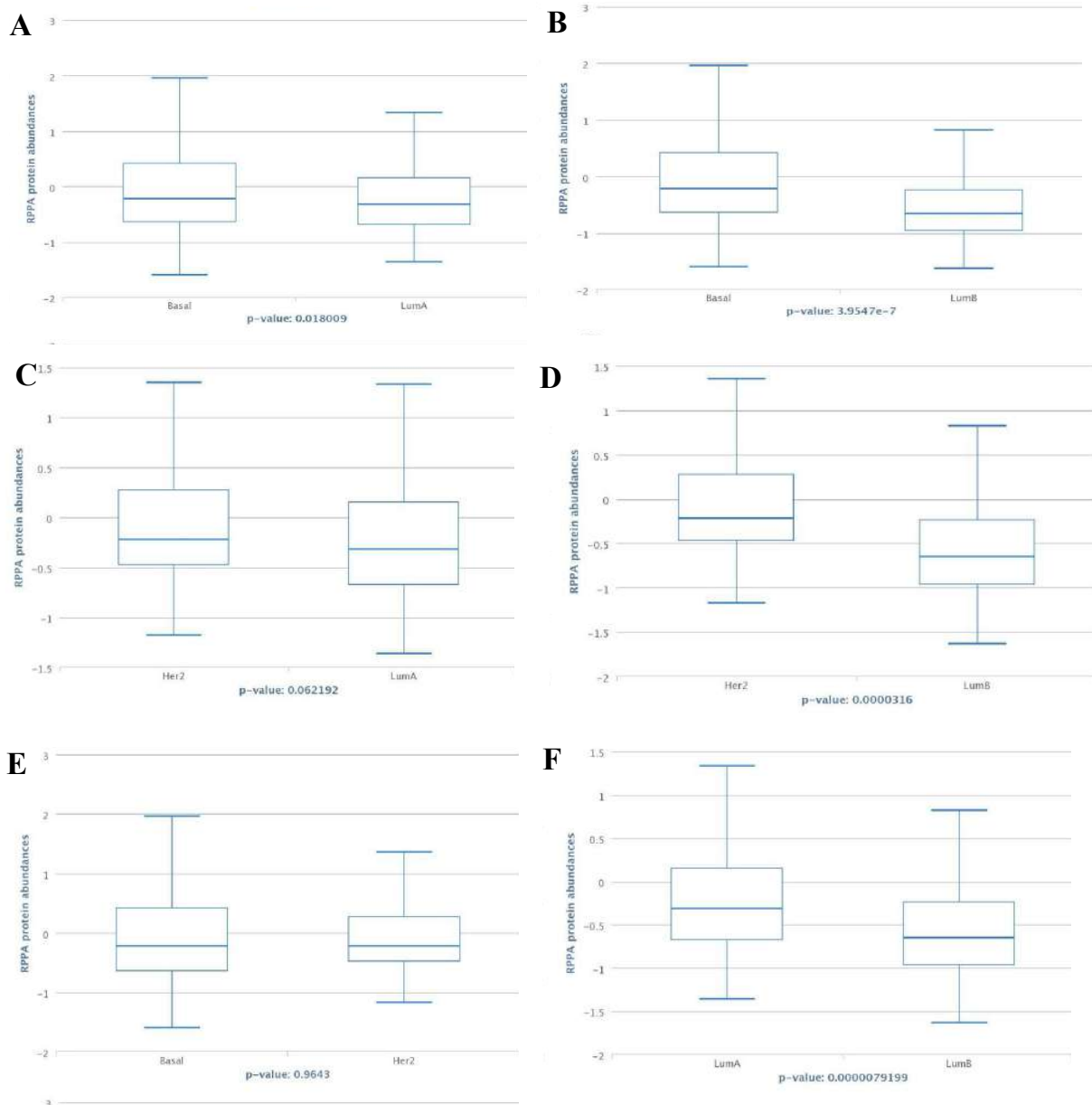
Figura 47 - Expressão da proteína AKT_pS473 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína AKT_pS473 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web T CPA.

Houve aumento da expressão da AKT_pT308 no subtipo basal quando comparado com os luminais, HER2 em relação ao luminal B e do luminal A em relação ao luminal B. Já entre o subtipo HER2 em relação ao luminal A e basal ao HER2, não houve diferença significativa (Figura 48).

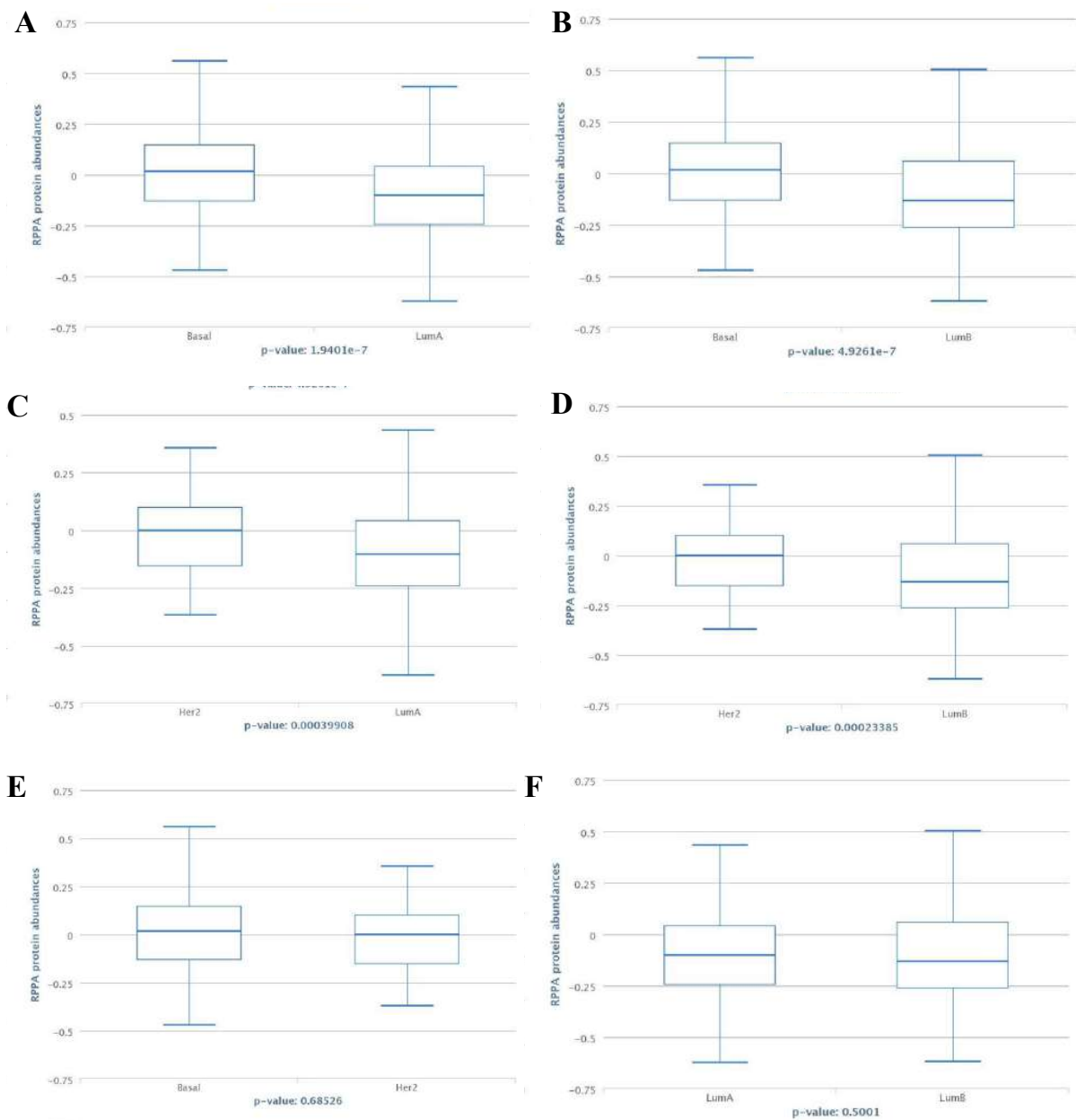
Figura 48 - Expressão da proteína AKT_pT308 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína AKT_pT308 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TCPA.

Houve aumento da expressão da PRAS40_pT246 no subtipo basal quando comparado com os luminais, HER2 em relação aos luminais. Já entre o subtipo HER2 em relação ao basal e entre os luminais, não houve diferença significativa (Figura 49).

Figura 49 - Expressão da proteína PRAS40_pT246 entre os subtipos de câncer de mama. O eixo das ordenadas representa a abundância da proteína PRAS40_pT246 e o eixo das abscissas os subtipos de câncer de mama (Basal versus Luminal A (A), Basal versus Luminal B (B), HER2 versus Luminal A (C), HER2 versus Luminal B (D), Basal versus HER2 (E), Luminal A versus Luminal B (F)).

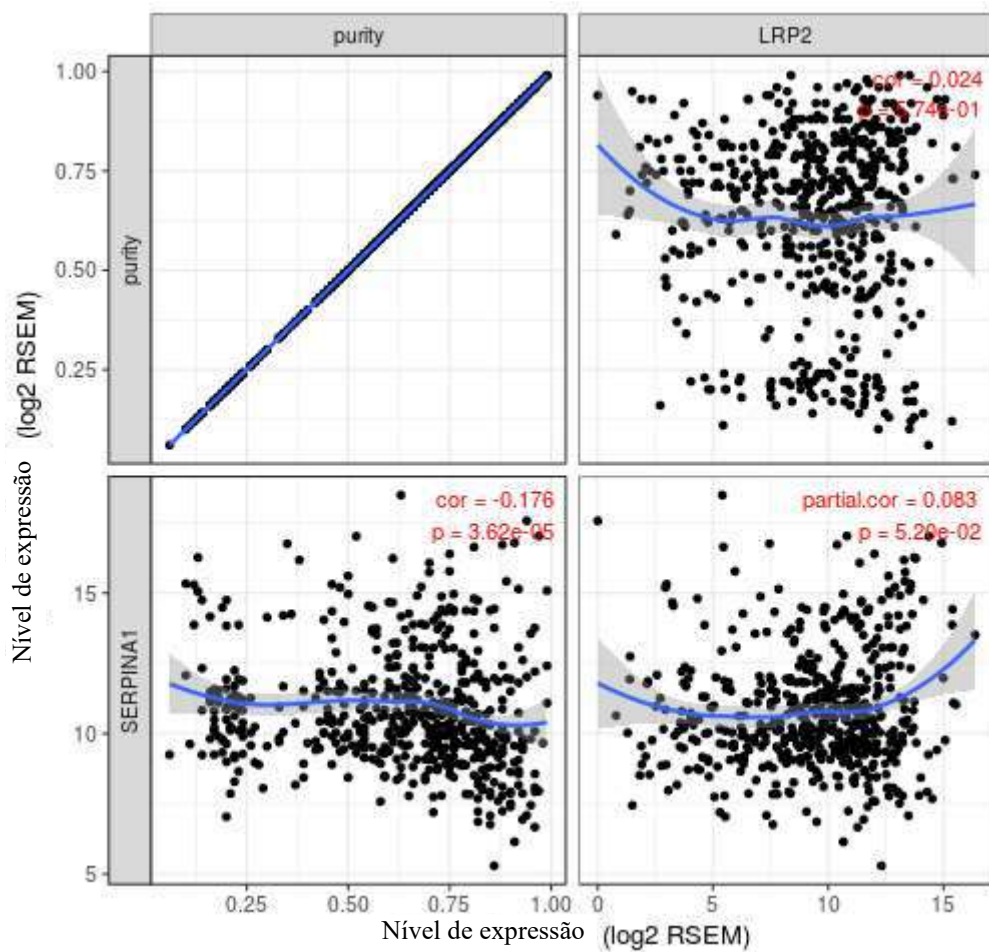


Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TCPA.

6.5 Correlação entre os genes que influenciaram na sobrevivência, as células imunes e o gene *Irs1*, associado a vias metabólicas que podem alterar o nível da proliferação celular.

Houve uma correlação positiva entre o gene *Serpina 1* e *Lrp2* expressos no subtipo de CM luminal A, ou seja, quando o gene expresso em N2 aumenta o nível do neuroreceptor expresso por *Lrp2* (Figura 50).

Figura 50 - Correlação entre os genes *Serpina 1* e *Lrp2* expressos pelos neutrófilos N2 e neuroreceptor, respectivamente, nos subtipos de CM luminais.

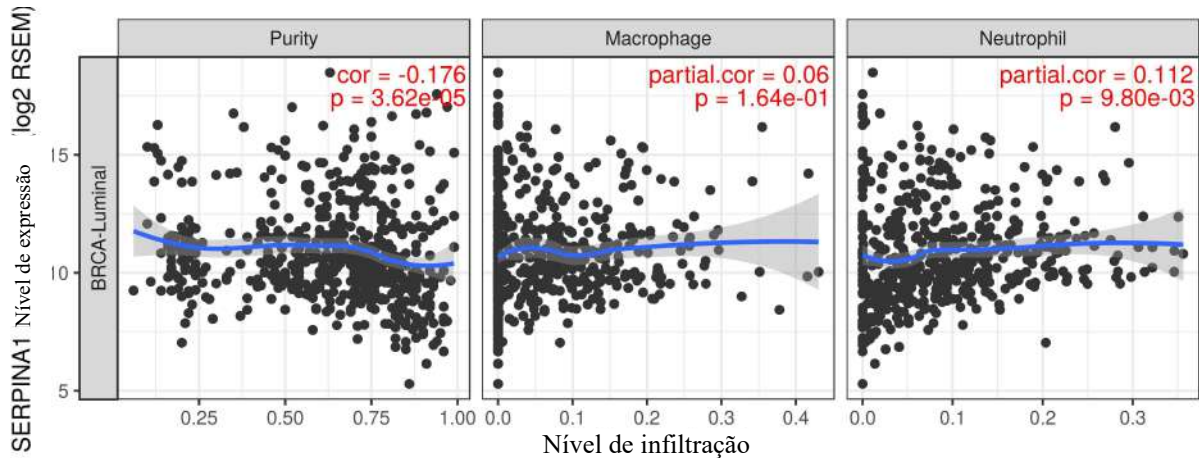


Fonte:

Já na correlação avaliando os macrófagos e neutrófilos nos subtipos de CM luminais em relação aos genes *Serpina 1* e *Lrp2* foi encontrado apenas correlação significativa com os neutrófilos. No gene *Serpina 1* foi encontrada uma correlação positiva, ou seja, quando o nível de expressão desse gene aumenta ocorre um aumento da quantidade de neutrófilos (Figura 51). Já no gene *Lrp2* foi identificada uma correlação negativa nos neutrófilos, ou seja,

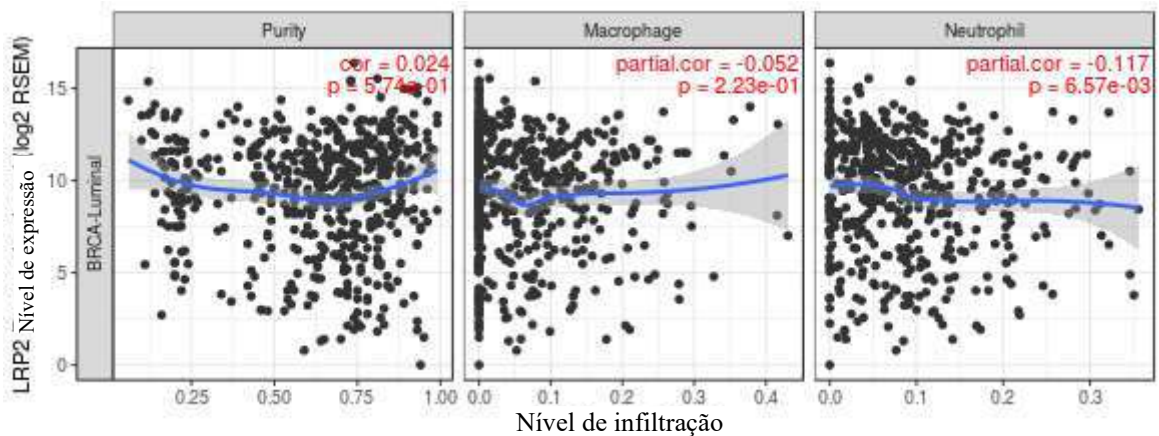
quando o nível de expressão desse gene aumenta ocorre uma diminuição dos neutrófilos (Figura 52).

Figura 51 - Correlação entre o gene *Serpina 1*, macrófagos e neutrófilos nos subtipos luminais.



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TIMER.

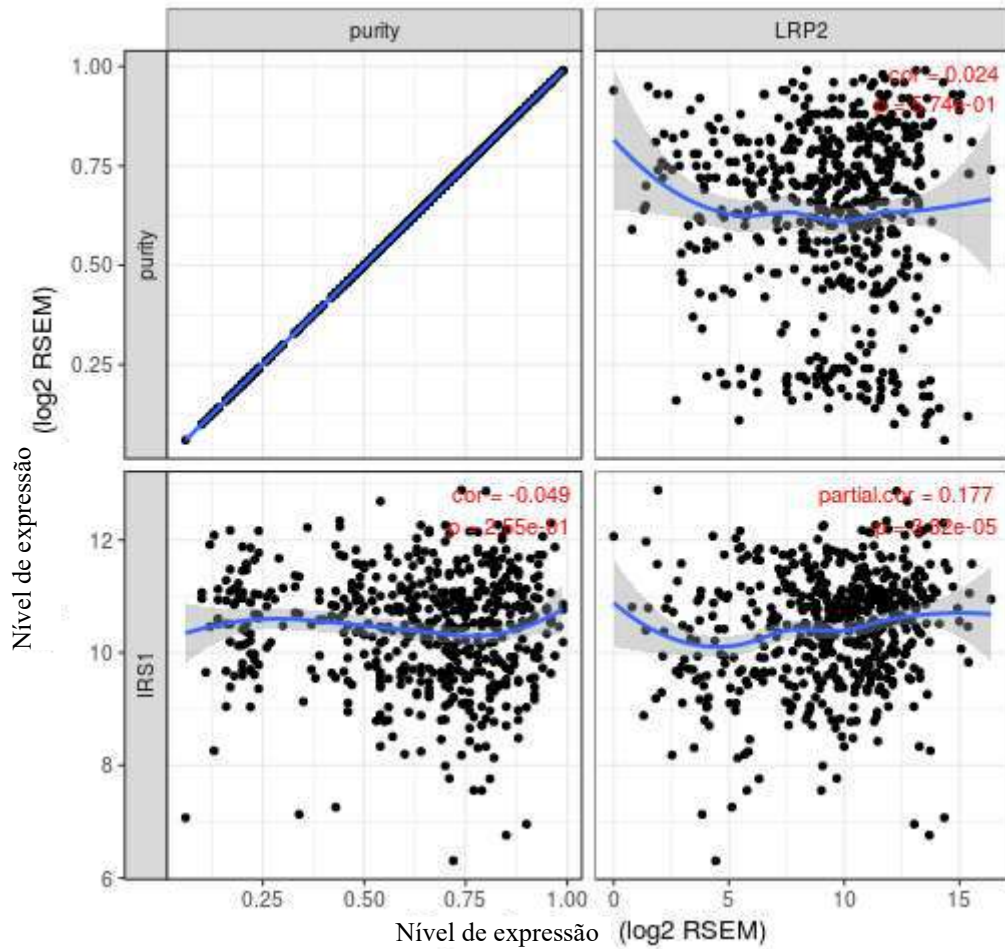
Figura 52 - Correlação entre o gene *Lrp2*, macrófagos e neutrófilos nos subtipos luminais.



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TIMER.

Quando a correlação envolveu a análise do gene *Irs1* com os genes *Serpina 1* e *Lrp2* expressos no subtipo de CM luminal A apenas esse último apresentou uma correlação positiva significativa (Figura 53).

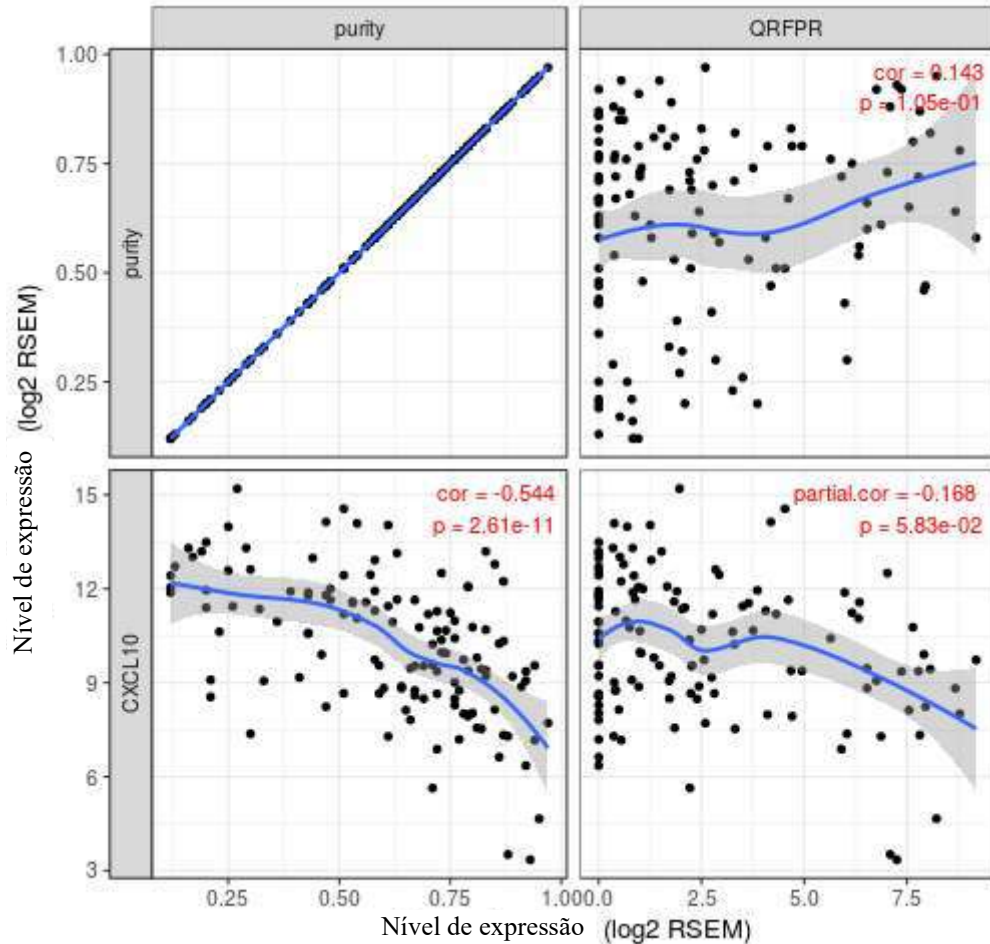
Figura 53 - Correlação entre o gene *Irs1* com o gene *Lrp2* nos subtipos luminais.



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TIMER.

Na análise dos genes *Cxcl10* e *Qrfpr* expressos no subtipo de CM basal respectivamente, em M1/N1 e pelos neuroreceptores, houve uma correlação negativa, ou seja quando um desses genes diminui a expressão ocorre o aumento da expressão do outro (Figura 54).

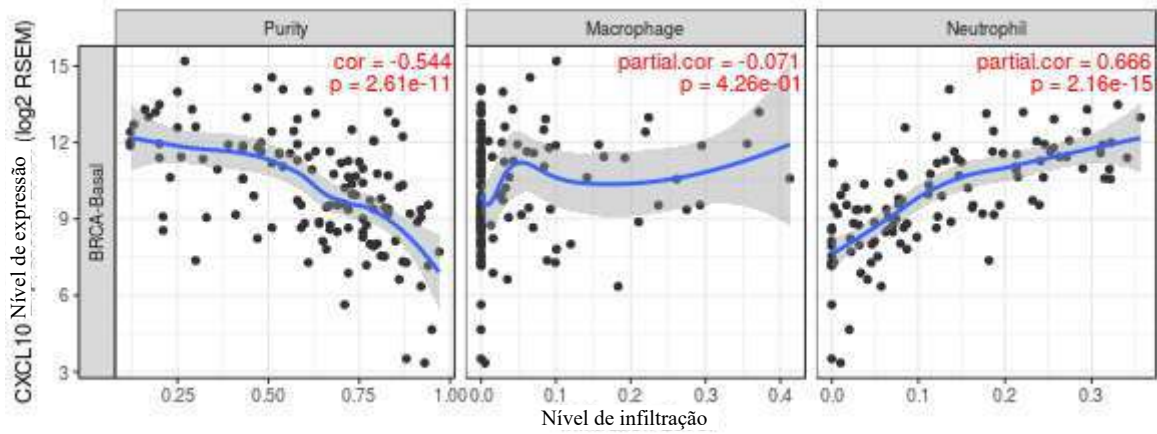
Figura 54 - Correlação entre os genes *Cxcl10* e *Qrfpr* expressos pelos neutrófilos M1/N1 e neuroreceptor, respectivamente, nos subtipos de CM basal.



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TIMER.

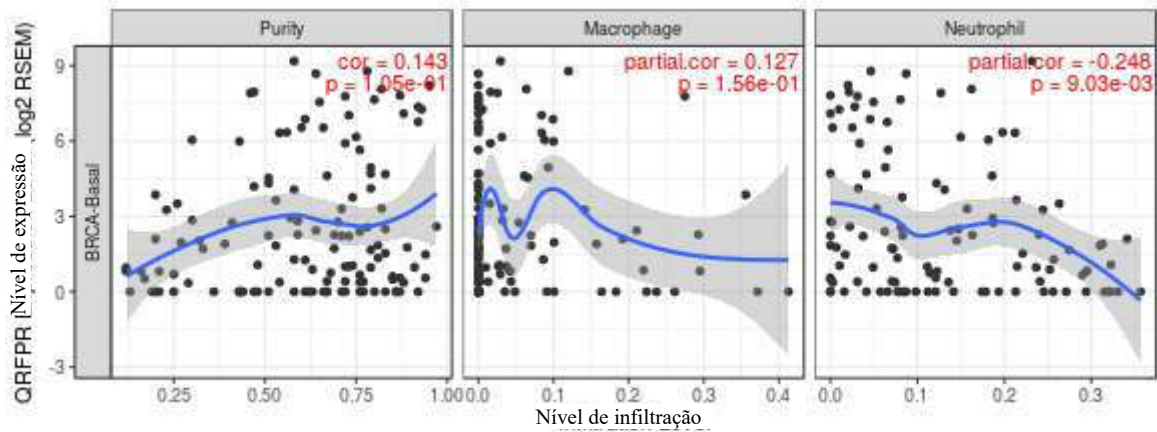
Já na correlação avaliando os macrófagos e neutrófilos no subtipo de CM basal em relação aos genes *Cxcl10* e *Qrfpr* foi encontrado apenas correlação significativa com os neutrófilos. No gene *Cxcl10* foi encontrada uma correlação positiva, ou seja, quando o nível de expressão desse gene aumenta ocorre um aumento da quantidade de neutrófilos (Figura 55). Já no gene *Qrfpr* foi identificada uma correlação negativa nos neutrófilos, ou seja, quando o nível de expressão desse gene aumenta ocorre uma diminuição dos neutrófilos (Figura 56).

Figura 55 - Correlação entre o gene *Cxcl10*, macrófagos e neutrófilos no subtipo de CM basal.



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TIMER.

Figura 56. Correlação entre o gene *Qrfpr*, macrófagos e neutrófilos no subtipo de CM basal.



Fonte: Os dados foram extraídos do servidor da web TIMER.

Quando a correlação envolveu a análise do gene *Irs1* com os genes *Cxcl10* e *Qrfpr* expressos no subtipo de CM basal nenhum deles apresentou correlação significativa.

7. DISCUSSÃO

A análise bioinformática das amostras de CM humano apresentada neste estudo abrangeu subtipos clínicos na tentativa de elucidar a diversidade fenotípica do sistema imunológico no microambiente tumoral do CM. Os dados obtidos revelaram uma heterogeneidade fenotípica entre os tumores de mama e as células imunes. A análise histopatológica prévia, através da expressão de genes associados a vias metabólicas do câncer, possibilitou a identificação de genes específicos dos subtipos de CM basal, luminal A, luminal B e Her2+.

As frequências desses biomarcadores foram comparáveis com as achados histopatológicos correspondentes. Quando foi comparado os genes diferencialmente expressos (GDEs) do subtipo de CM basal com o tecido mamário normal, foi demonstrado que o gene *Cd38* foi expresso apenas no subtipo basal. A proteína CD38, codificada pelo gene *Cd38*, é uma proteína transmembranar tipo 2 que funciona como molécula de adesão (DEAGLIO et al., 2001). A expressão dessa proteína no sistema imunológico é alta nas populações de células para as quais as interações célula a célula são importantes (MALAVASI et al., 1994). Essa proteína induz nos linfócitos T a mobilização citoplasmática de cálcio, ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e ativação da via da fosfolipase C- γ 1 (PLC- γ 1), que estimulam fatores de transcrição a sintetizarem citocinas, como IFN- γ , IL-6, IL-2, IL-10 (DEAGLIO et al., 2001). A densidade de células plasmáticas CD38⁺ intratumoral demonstrou ser um marcador prognóstico independente da idade do paciente, grau do tumor, tamanho, status dos linfonodos e densidade de células T CD3⁺ infiltradas em tumores e células B CD20⁺ (PLITAS et al., 2016; SU et al., 2017).

Já na comparação entre HER2 e o tecido mamário normal foi identificado o gene *ErbB2* expresso apenas no subtipo HER2. O gene *ErbB2* é um oncogene, que codifica a proteína HER2, a qual pertence à superfamília dos receptores tirosina quinase, está envolvido nas vias de sinalização celular que podem levar à proliferação, crescimento, apoptose e diferenciação, os quais são processos essenciais para a vida, mas a perda de controle está associado principalmente ao câncer (ELETXIGERRA et al., 2015). Essa proteína é um marcador diagnóstico de tumores que superexpressa em aproximadamente em 20-25% dos câncer de mama invasivo e está associado ao pior prognóstico e menor sobrevida (PATRIS et al., 2014; ELETXIGERRA et al., 2015).

Nos subtipos luminais comparados com o tecido mamário normal foi identificado os

genes *Esr1* e *Pgr* são exclusivamente expressos nos subtipos luminais. O gene *Esr1* codifica os receptores de estrôgeno que está relacionado ao desenvolvimento sexual e função reprodutiva, mas patologicamente é expresso um nível elevado de receptores no carcinoma ductal *in situ* na mama (MOELANS et al., 2010). Já o gene *Pgr*, codifica os receptores de progesterona, que podem ser expresso por células neoplásicas nos subtipos de câncer de mama luminais, é considerado um marcador prognóstico para diagnóstico dos subtipos de CM e estão associados ao controle da expressão de vários reguladores do ciclo celular (CENCIARINI; PROIETTI, 2019).

Além da caracterização pelos GDEs nos subtipos de CM a partir de genes envolvidos em algumas vias metabólicas do câncer, foi avaliado as células imunes encontradas nos tecidos dos pacientes com subtipos de CM basal, HER2 e luminais assim como o tipo de resposta imune baseada na expressão dos genes associados às células imunes. O papel das células de resposta imune tem sido debatido ao longo dos anos. Diversos estudos demonstraram diferentes vias pelas quais as células do infiltrado inflamatório podem favorecer a progressão neoplásica ou impedir o seu desenvolvimento. A heterogeneidade das células tumorais compromete a ação do sistema imunológico, havendo diferentes estratégias que bloqueiam a ação de células imunes (GATENBY; GILLIES, 2008; WAGNER et al., 2019). As imunoterapias do câncer têm sido reconhecidas como uma das principais revoluções associadas ao tratamento dos pacientes, especialmente para pacientes refratários (ROOIJEN et al., 2015). A razão pela qual a resposta a esses tratamentos ocorre diferentemente permanece como uma intensa área de investigação.

A nível celular as células imunes mais abundantes encontradas nesse estudo foram as plasmócitos e macrófagos. Sendo os macrófagos confirmados em dois bancos de dados analisados. Sendo possível em um desses bancos de dados avaliar especificamente dois fenótipos dos macrófagos M1 e M2. Os subtipos de CM que são considerados na literatura com pior prognóstico (HER2 e basal), curiosamente tiveram uma maior quantidade de macrófagos M1 e os de melhor prognóstico (luminal A e luminal B) apresentaram M2. Assim como ocorre com as células T, os macrófagos que envolvem vários tumores, podem exercer atividades tanto antitumorais quanto pró-tumorais (BISWAS & MANTOVANI, 2010).

Os macrófagos exibem plasticidade funcional considerável. Dois estados relativamente distintos de polarização para essas células foram reconhecidos: macrófagos M1 e M2 (MARTINEZ; GORDON, 2014). Os macrófagos M1 se polarizam em resposta a citocinas

Th1, via expressão de proteínas, tais como IFN- γ e TNF- α . Essas células são caracterizadas por alta capacidade de apresentação de antígenos, alta produção de IL-12 e IL-23, alta produção de intermediários tóxicos como óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio e alta expressão do antígeno leucocitário humano (HLA-DR). Por outro lado, os macrófagos M2 se desenvolvem em resposta a vários estímulos, como citocinas Th2, havendo a subdivisão nas subpopulações M2a, M2b e M2c (CHEN et al., 2012; STEWART et al., 2012; MARTINEZ; GORDON, 2014). Os macrófagos M2a são estimulados por IL-4 e IL-13, enquanto M2b macrófagos são induzidos por complexos imunes, lipopolissacarídeos, receptores e pelo antagonista do receptor da interleucina-1 (IL-1RA). A subpopulação M2c é induzida pela IL-10, TGF- β e glicocorticóides. Os tumores sólidos representam um exemplo de tecido com múltiplas características, incluindo hipóxia e altas taxas de morte celular. Assim, precisa da ajuda direta de macrófagos para restabelecer a homeostase tecidual. No câncer, essa resposta auxilia no crescimento do tumor, produzindo fatores angiogênicos, remodelação tecidual, inibição de vias apoptóticas e desenvolvimento de microambientes imunossupressores que atenuam a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ (CHEN et al., 2012; STEWART et al., 2012; MARTINEZ; GORDON, 2014).

A fim de entender os fenotipos de macrófagos encontrados nos subtipos de CM foi realizado um estudo comparativo entre os GDEs nos subtipos de CM e os relacionados as respostas Thelper 1, Thelper 2, Thelper 17 e Treg. As células Th1 produzem citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12, conhecidas pelas funções centrais na ativação das respostas imunes antitumorais, aumentando a sobrevida dos pacientes em cânceres de mama positivos para receptores hormonais, mas não no subtipo TNBC (GU-TRANTIEN et al., 2013; MILLER et al., 2016; ZHAO et al., 2019). Teschendorff e colaboradores (2010) demonstram que nos CM ER-negativos, o aumento de IL-13 e produção de TGF- β , induzida pela ativação de Th2, está associada a um pior prognóstico, enquanto o aumento dos níveis de IL-2 e IFN- γ está correlacionado com bom prognóstico. As células Th2 também produzem IL-10 e IL-4, que contribuem para o crescimento do tumor, inibindo o sistema imunológico do hospedeiro (ATHIE-MORALES et al., 2004). Além disso, a polarização para o fenótipo Th2 foi observada em pacientes com CM luminal em estágio avançado no estudo realizado por Zhang e colaboradores (2015). Por outro lado, sabe-se que as células Th2 não apenas promovem, mas também mediam efeitos antitumorais (DEMEHRI et al., 2016).

Neste estudo foi encontrado diversos genes superexpressos nas resposta Th1, Th2,

Th17 e Treg, os quais alguns eram comuns a HER2 e basal e/ou aos subtipos luminais. Com relação aos genes estudados para a resposta Treg, o subtipo de CM basal apresentou a maior quantidade de genes expressos quando relacionados aos outros subtipos. Um dos mecanismos que promovem o crescimento tumoral inclui a inibição da função antitumoral de células T efetoras e células NK pelas células Treg intratumorais (COUSSENS; POLLARD, 2011). Além disso, Plitas e colaboradores. (2016) relataram que as células Treg isoladas de células tumorais de mama não tratadas foram ativadas quando comparadas aquelas isoladas do tecido mamário ou sangue periférico. Assim, este estudo também corrobora com o trabalho realizado por Stanton e Disis (2016), que observaram que o subtipo basal tem a quantidades mais elevadas de células Treg em comparação com os demais subtipos. No entanto, as células Treg estão associadas a um prognóstico menos favorável para pacientes com CM (SU et al., 2017). Os resultados deste trabalho sugerem que as células Treg ativadas comprometem a resposta imune no câncer de mama basal, resultando em um pior prognóstico para as pacientes com este subtipo de CM. No entanto, não foi possível elucidar a resposta dos outros subtipos com base apenas nos quantitativos de genes mais expressos nos subtipos de CM. Além disso, não corroborou com o tipo de macrófago encontrado nas análises anteriores deste trabalho.

Foi observado que a composição dos subtipos de macrófagos parece ser diferente nos vários subtipos de CM. Stewart e colaboradores (2012) demonstraram que os TAMs em células basais de CM tinham maior capacidade de induzir diferenciação e polarização para o fenótipo M1 e M2 do que o subtipo luminal, sugerindo que a resposta imune mediada por macrófagos no CM basal pode ser diferente de outros subtipos. Esses dados também podem explicar em parte o que verificamos neste estudo. No entanto, nesse trabalho não corroboram com os resultados observados por Medrek e colaboradores (2012), o qual mostrou que a prevalência do M2 é maior nos CM basais do que nos CM positivo para receptores hormonais, mas esses autores incluíram apenas 15 pacientes com tumores do subtipo basal.

Embora, as células Tregs tenham sido historicamente apontadas como os principais elementos responsáveis por modular a resposta imune no câncer de mama, estudos recentes têm demonstrado que os TAMs podem ser determinantes da supressão imunológica nessas lesões (ATHIE-MORALES et al., 2004; STOKMAN et al., 2006; RANDOLPH et al., 2008; FRIDLENDER et al., 2009; HINGORANI et al., 2016; WAGNER et al., 2019). Os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente elucidados, mas estudos *in vitro* demonstraram que as TAMs são capazes de inibir a proliferação linfocitária de células T

CD8⁺, um evento que pode ocorrer independentemente do metabolismo de L-arginina e parece envolver a família de moléculas B7 (NIEDBALA et al., 2007). Além disso, há um envolvimento significativo de macrófagos M2 no recrutamento de células Treg para o microambiente tumoral, particularmente através da secreção de quimiocinas, como CCL20 e CCL22 (MARTINEZ; GORDON, 2014). A hipótese de que os TAMs adquirem um fenótipo M2 ainda é controversa, uma vez que essas células possuem alta plasticidade e flexibilidade, permitindo adaptação em diferentes microambientes.

A fim de explicar os fenótipos dos macrófagos encontrados nos subtipos de CM, surgiu a hipótese que a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por M1 poderia potencialmente aumentar a taxa de mutação celular e, assim, acelerar a tumorigênese nos subtipos basal e/ ou Her2 (REUTER et al., 2010). As funções protumorigênicas do fenótipo M1 podem ser suprimidas pela ação do microambiente tumoral em uma tentativa de induzir a repolarização de macrófagos. Além disso, as evidências sugerem que um subtipo de tumor pode conter vários subconjuntos de macrófagos com funções distintas (MOVAHEDI et al., 2010).

A concepção de que M1 e M2 podem mimetizar as respostas das células Thelper 1 e Thelper 2 respectivamente, tornou-se cada vez mais ampla, dificultando a compreensão da patogênese. Os genes estudados dos M1 e os subconjuntos M2a, M2b e M2c não foram elucidativos quando avaliados em relação aos subtipos de CM luminais, já que nenhum gene foi superexpresso. Já em HER2 foi identificado apenas dois genes em M1 (*Ccl11* e *Ifng*) e no basal 5 genes em M1 (*Cxcl10*, *Cxcl11*, *Tnf*, *Cd80* e *Ifng*), 2 genes em M2a (*Ccl13* e *Ccl24*) e 2 genes em M2b (*Cxcl1* e *Ccl1*). Neste estudo, a inexistência de genes superexpressos nos subtipos luminais não possibilitou fazer inferências quanto aos tipos de macrófagos encontrados nos subtipos. Macrófagos são células moduladoras-chave e efetoras na resposta imune, sendo que sua ativação influencia a resposta de outras vias do sistema imunológico (FRIDLENDER et al., 2009; MEDREK et al., 2012).

A partir desse resultado, outra hipótese defendida foi que os macrófagos poderiam estar liberando neuropeptídeos e/ou expressando neuroreceptores que desempenhariam o papel de recrutar/ativar outros tipos de células imunes, como os neutrófilos, que apresentam também dois fenótipos distintos, N1 e N2, assim como os macrófagos, e influenciariam na polarização dos macrófagos. As células do sistema imune, especialmente macrófagos M2, produzem neuropeptídeos e hormônios, como catecolaminas, substância P, adiponectina e fatores de

crescimento, em resposta a sinais anti-inflamatórios. Esses neuropeptídeos podem atuar de forma autócrina e /ou parácrina através de receptores específicos expressos em diferentes tipos celulares (CHEN et al., 2012). Peptídeos neuroendócrinos, hormônios e citocinas produzidos por macrófagos são também associado à indução e polarização de neutrófilos. Dependendo do microambiente tumoral, os neutrófilos podem exercer funções antitumoral (fenótipo N1) ou protumoral (fenótipo N2) (FRIDLENDER et al., 2009; MANTOVANI et al., 2011). Os TANs são polarizados do fenótipo N1 para o N2 na ausência de IFN- γ . A produção de metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), a expressão da colagenase, inibição da apoptose e a ativação do AKT foram associados aos neutrófilos N2. Os neutrófilos N2 estimula a angiogênese e gera recrutamento e supressão imunológica de leucócitos através da produção de quimiocinas e arginase (JAHANYAR et al., 2007; FRIDLENDER et al., 2009; ZHOU et al., 2014; MANTOVANI et al., 2011).

Neste estudo foi identificado 14 neuropeptídeos e 19 neuroreceptores associados ao subtipo de CM basal. Sendo esse subtipo o que apresentou mais genes de neuropeptídeos e neuroreceptores em relação aos outros subtipos. Já na avaliação dos fenótipos dos neutrófilos, foi encontrado apenas 1 gene (*Serpina 1*) associado ao N2 no subtipo luminal A e nenhum ao N1. Nos subtipos luminal B e HER2 não foi identificado nenhum gene dos dois fenótipos de neutrófilos. No entanto, no subtipo basal foi encontrado 3 genes (*Cxcl1*, *Cxcl10* e *Pla2g4a*) associados ao N1 e 4 genes (*Csf2*, *Cxcl5*, *Nos2* e *Il1a*) ao N2. Tanto os genes expressos nos subtipos de CM nos M1,co subconjunto de M2, neuropeptídeos, neuroreceptores, N1 e N2 foram avaliados quanto ao impacto na sobrevida dos pacientes e correlação com outros genes que tem relevância nas vias metabólicas do câncer.

O gene *Serpina 1*, expresso por N2 no subtipo luminal A, teve impacto positivo na sobrevida nos pacientes com câncer de mama, ou seja, quanto maior for a expressão, maior será a sobrevida do paciente. Embora esse subtipo expresse um gene com impacto positivo em N2, sugere-se que algum mecanismo que possivelmente envolva a liberação de neuropeptídeos e expressão de neuroreceptores estejam polarizado e controlando o efeito imunossupressor inerente de M2 e N2. Embora, no câncer gástrico a expressão aumentada de *Serpina 1* foi significativamente associada ao aumento do tamanho do tumor, estágio T avançado, invasão perineural, invasão linfovascular, metástases linfonodais e menor sobrevida global (KWON et al., 2014).

O impacto positivo na sobrevida identificado no subtipo de CM luminal A também ocorre com gene *Lrp2* expresso pelo neuroreceptor. As proteínas relacionadas ao receptor de LDL (LRPs) são receptores transmembranares envolvidos na endocitose, sinalização celular e tráfego de outras proteínas celulares (GONIAS et al., 2017). Segundo Gonias e colaboradores (2017), não existe correlação desse gene com a sobrevida dos pacientes no câncer de mama. Embora neste trabalho tenha sido identificada uma correlação com relação a sobrevida. Tanto o gene *Serpina 1* quanto o *Lrp2* são possíveis marcadores para o prognóstico no câncer de mama, especificamente, o luminal A.

Não foram identificados nesse estudo genes dos macrófagos M1, subconjuntos M2a, M2b, M2c, neutrófilos N1, N2 que tivessem impacto na sobrevida dos pacientes nos subtipos luminal B e HER2. No entanto, foi encontrado 1 gene (*Nmb*) entre os neuropeptídeos e 3 genes (*Mas1*, *Npr3* e *Qrfpr*) entre os neuroreceptores que nesses subtipos tiveram impacto na sobrevida. No subtipo de CM basal foi identificados genes com impacto na sobrevida em M1, M2a, M2b, N1, N2, neuropeptídeos e neuroreceptores. Dentre esse genes encontramos o *Cxcl10* em comum a M1 e N1 que teve impacto negativo na sobrevida dos pacientes, no qual quanto maior a expressão menor foi a sobrevida dos pacientes. Embora tenha sido demonstrado em vários tipos de cânceres humano que o aumento da expressão de CXCL10 no local do tumor está correlacionada com o melhor prognóstico (KARIN; RAZON, 2018). A quimiocina codificada por esse gene exerce um importante papel na polarização das células T CD8⁺ e Th1 CD4⁺, é produzida no microambiente tumoral e em sítios inflamatórios potencializando a atividade efetora antitumoral dessas células (KARIN; RAZON, 2018).

As células tumorais podem escapam do reconhecimento do sistema imunológico através de várias mecanismos, incluindo a regulação negativa de antígenos tumorais, que permitem a geração de um microambiente imunossupressor. A sinalização PD-L1 e PD-1 já foi demonstrada estar associado à imunossupressão de diferentes tipos de neoplasias (STANTON; DISIS, 2016; LI et al., 2016; WAGNER et al, 2019; LI et al., 2019). PD-L1 está presente nas células tumorais, enquanto PD-1 é observado nos linfócitos T e B ativados e na superfície das células mieloides (SCANDIUZZI et al., 2011). Conseqüentemente, a associação PD-L1 e PD-1 resulta em um efeito imunossupressor que permite que as células tumorais escapem à destruição pelo sistema imunológico. O aumento na regulação do PD-1 no subtipo basal quando comparado aos subtipos de CM luminal A, luminal B e Her2⁺ foi observado no presente estudo. Os dados são consistentes com estudos prévios, mostrando que

as células PD-L1⁺ são vistas mais frequentemente no subtipo basal quando comparados aos demais subtipos de CM (MITTENDORF et al., 2014; SOLIMAN et al., 2014). A regulação positiva do gene *Pd1l* no subtipo basal pode estar associada a TAM e células CD8⁺ (MITTENDORF et al., 2014), modulando os ecossistemas tumorais através de ações imunossupressoras. Da mesma forma, as células de CM basais com maior expressão da PD-L1 estão mais associada a motilidade, invasão e resistência à fármacos do que nas linhagens celulares basais que expressam PDL1 em menores quantidades (SOLIMAN et al., 2014). A associação entre superexpressão de PD-L1 com os parâmetros recidiva e sobrevida já foi demonstrado (WANG et al., 2017), como a evidência de que a expressão da PD-L1 pode ser considerada como um fator preditivo significativo da sobrevida no subtipo basal, mas não em outros tumores da mama (LI et al., 2016).

Também existem relatos na literatura que a expressão da proteína CXCL5 está diretamente associada à expressão da PD-L1 em células de melanoma via de sinalização PI3K/AKT (LI et al., 2019). Neste estudo foi verificado a regulação positiva de *Cxcl5* no CM basal, sugerindo que a expressão aumentada de PD-L1 e *Cxcl5*, podem ter um efeito quimioatraente associado aos neutrófilos, uma vez que o *Cxcl5* é produzido por este tipo celular (ZHOU et al., 2014). Além disso, um estudo recente demonstrou que o p-eIF2a poderia inibir a expressão de CXCL5 e, conseqüentemente, do PDL1 no CM TNBC/basal, resultando no aumento da atividade de células imunes infiltradas nos tumores e menor incidência de metástases (ZOU et al., 2017), corroborando com a nossa hipótese.

A ativação de alguns receptores estimula as vias de sinalização MAPK e AKT (MONNIER; SAMSON, 2010; GOI et al., 2014) estimulando muitas ações biológicas, como angiogênese, hematopoiese e a resposta do sistema imunológico (LIU et al., 2009). Nesse estudo foi identificado o aumento da expressão da proteína AKT em basal em relação ao luminal B, de HER2 em relação aos luminais e do luminal A em relação ao luminal B. A desregulação da via AKT promove a formação do tumor por alterar o ritmo das etapas que precedem a mitose da fase G1/S (SHARMA et al., 2019). No câncer de mama, a AKT atua na via de transdução de sinal PI3K-AKT-mTOR, a qual é frequentemente alterada na maioria dos cânceres (SHARMA et al., 2019).

Outros resultados interessantes observados nas análises deste trabalho foram a correlação positiva encontrada entre o gene *Irs1* e o gene *Lrp2* expresso pelos neuropeptídeos do subtipo luminal A. Já foi demonstrado que os receptores de insulina (IR) são uma família

de seis proteínas adaptadoras de sinalização intracelular que integram e coordenam numerosas sinais celulares extracelulares (GUAL et al., 2005; SHI et al., 2014). O IRS1, a primeira proteína identificada e clonada, que foi originalmente descrito no hepatoma murino, sendo ativado por IGFR e IR. Mais tarde, IRS1 foi observado no cérebro, miocárdio, músculo, adipócito, rins, ovários e glândulas mamárias. Embora o IRS não tenha atividade quinase intrínseca e exija ativadores a montante, vários estudos mostraram que essas proteínas são oncogênicas e podem induzir a carcinogênese (GUAL et al., 2005). A superexpressão do IRS1 induz carcinogênese em fibroblastos derivados de embriões de camundongos (BRITSCHGI et al., 2012). O aumento da expressão de IRS1 nas células NIH3T3 induz transformação neoplásica através da interação com GRB2 e SHP2, que ativam a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (LEE et al., 2003; GUAL et al., 2005; MA et al., 2006; BRITSCHGI et al., 2012; SHI et al., 2014). Recentemente, a supressão de IRS1 e ativação de AKT demonstrou promover metástases dos tumores mamários (MA et al., 2006). Alguns estudos identificaram que a superexpressão da proteína IRS1 está associada com pior sobrevida em câncer de mama para pacientes positivos para receptores de estrogênio (WANG et al., 2016).

Os genes estudados apresentaram indícios que no luminal A o gene *Lrp2* expresso pelos neuropeptídeos exerce um papel importante na expressão do gene *Irs1* e no recrutamento de neutrófilos para o microambiente. Já os genes *Serpina1* no subtipo luminal A, e os genes *Cxcl10* e *Qrfpr* no subtipo basal regulam via algum mecanismo o recrutamento dos neutrófilos para o microambiente tumoral. Esses genes podem ser sugestivos para auxiliar no prognóstico dos pacientes com câncer de mama desde que realizados testes *in vitro* e *in vivo* que corroborem com os resultados obtidos por bioinformática translacional e elucidem as vias metabólicas que envolvem esses genes.

8. CONCLUSÃO

As análises dos genes permitiram reconhecer os subtipos de CM (basal, HER2, luminal A e luminal B), identificar as células imunes que desempenharam um papel mais importante no microambiente tumoral em cada subtipo de CM, realizar um estudo comparativo entre os genes expressos nas respostas imunes Thelper 1, Thelper 2, Thelper 17 e Treg e os expressos nos subtipos de CM, identificar os genes desses subtipos expressos pelos macrófagos, neutrófilos, neuropeptídeos e neuroreceptores, investigar as proteínas expressas nos subtipos de CM e a influência desses genes no prognóstico e sobrevida dos pacientes.

Apesar do prognóstico ser pior nos subtipos de CM HER2 e Basal e ser esperado encontrar macrófagos M2, nesse estudo foi identificado M1. Já nos subtipos de CM luminais foi encontrado M2, ao invés de M1. Os genes superexpressos nos subtipos não foram suficientes para se confirmar um tipo de resposta imune. Apesar de ser encontrado mais genes superexpressos em Treg no subtipo basal em relação aos outros subtipos.

O estudo comparativo dos genes superexpressos em M1, subpopulações M2a, M2b, M2c, neutrófilos N1, N2, neuropeptídeos e neuroreceptores entre os subtipos permitiu a seleção de genes que foram avaliados quanto ao impacto na sobrevida dos pacientes na tentativa explicar os tipos de macrófagos encontrados nos subtipos de CM. Dentre as correlações estabelecidas entre os genes avaliados o *Lrp2* no subtipo luminal A teve impacto na sobrevida dos paciente, tem correlação positiva com o gene *Irs1*, no qual codifica a proteína IRS1 que promove a carcinogênese, e regula por algum mecanismo o recrutamento dos neutrófilos. Já os genes *Serpinal* no subtipo luminal A, e os genes *Cxcl10* e *Qrfpr* no subtipo basal também apresentam indícios de recrutamento dos neutrófilos

As proteínas PDL1, IRS1 e AKT avaliadas no tecido mamário tumoral de cada subtipo demonstrou que no subtipo de CM basal PDL1 e AKT tiveram uma maior expressão quando comparado com os outros subtipos de CM. Já em IRS1 houve uma maior expressão nos subtipos luminais em relação aos outros subtipos de CM.

Portanto, os genes *Lrp2*, *Serpinal*, *Cxcl10* e *Qrfpr*, e as proteínas PDL1, IRS1 e AKT podem ser utilizados como genes-alvos para estudos *in vivo* e *in vitro* para elucidar melhor as vias metabólicas no qual estão envolvidos, compreender as diferenças entre os prognósticos e os tipos de células imunes presentes nos tecidos mamários neoplásicos de cada subtipo de CM.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- AMERICAN MEDICAL INFORMATICS ASSOCIATION (AMIA). Disponível em: <http://www.amia.org/applications-informatics/translational-bioinformatic>. Acessado em: 26 de outubro de 2019.
- ASADZADEH, Z. et al. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. **Cellular Immunology**, v. 322, p. 15–25, 2017.
- ATHIE-MORALES, V. et al. Sustained IL-12 Signaling Is Required for Th1 Development. **The Journal of Immunology**, 2004.
- BECKER, S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v.131, p. 36–39, 2015.
- BEDOUI, S. et al. Relevance of Neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. **Journal of Neuroimmunology**, v. 134, p. 1–11, 2003.
- BEDOUI, S. et al. Neuropeptide Y receptor-specifically modulates human neutrophil function. **Journal of Neuroimmunology**, v. 195, p. 88–95, 2008.
- BEDOUI S. et al. .Differential effects of neuropeptide Y (NPY) on leukocyte subsets in the blood: mobilization of B-1-like B-lymphocytes and activated monocytes. **J. Neuroimmunol.**, v. 117, p. 125-132, 2001.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, p. 889–896, 2010.
- BONAVITA, O.; MASSARA, M.; BONECCHI, R. Chemokine regulation of neutrophil function in tumors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 30, p. 81–86, 2016.
- BRIGATI, C. et al. Tumors and inflammatory infiltrates: Friends or foes? **Clin Exp Metastasis**, v. 19, n. 3, p. 247-258, 2002.
- BRITSCHGI, A. et al. JAK2/STAT5 Inhibition Circumvents Resistance to PI3K/mTOR Blockade: A Rationale for Cotargeting These Pathways in Metastatic Breast Cancer. **Cancer Cell**, 2012.
- BROWN, M. R. et al. Bombesin affects the central nervous system to produce hyperglycemia in rats. **Life Sciences**, v. 21, n. 12, p.1729–1734, 1977.
- BUCHAN, N. S. et al. The role of translational bioinformatics in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 16, p. 426–434, 2011.

- BURKE, E. E. et al. Vaccine Therapies for Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, 2019.
- CANCER TOMORROW. **World Health Organization**. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. Acessado em 26 de novembro de 2018.
- CENCIARINI, M. E.; PROIETTI, C. J. Molecular mechanisms underlying progesterone receptor breast cancer: Insights into cell proliferation stem cell regulation. **Steroids**, 152, 2019.
- CHEANG, M. C. U. et al. O. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 101(10), 736–750, 2009.
- CHEN, W. et al. Macrophage polarization induced by neuropeptide methionine enkephalin (MENK) promotes tumoricidal responses. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 2012.
- COLAPRICO, A. et al.. TCGAAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 8, 2016.
- COUSSENS L. M.; POLLARD J. W. Leukocytes in Mammary Development and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 3, n. 3, p. 1-22, 2011.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860–867, 2002.
- DAI, X., LI, T. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929-2943, 2015.
- DEAGLIO, S.; MEHTA, K.; MALAVASI, F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. **Leukemia Research**, p. 1-12, 2001.
- DEMEHRI, S. et al. Thymic stromal lymphopoietin blocks early stages of breast carcinogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, 2016.
- DENKERT C. et al. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 1, p. 105–113, 2010.
- DIECI, M. V. et al. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? **Cancer Treatment Reviews**, v. 46, p. 9–19, 2016.
- DISIS M. L.; STANTON S. E. Triple-Negative Breast Cancer: Immune Modulation as the New Treatment Paradigm. **Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book**, p. 25-30, 2015.
- DU, J.; KEEGAN, B. P.; NORTH, W. G. Key peptide processing enzymes are expressed by breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 165, n. 2, p. 211–218, 2001.

- DUCATMAN, B. S.; WANG, H. H. Breast. **Cytology**, p. 221–254, 2009.
- EARLY DIAGNOSIS AND SCREENING (BREAST CANCER). **World Health Organization**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/prevention/Diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. Acessado em: 26 de novembro de 2018.
- ELENKOV, I.J. et al. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacol Rev.**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000.
- ELETXIGERRA, U. et al. Amperometric magnetoimmunosensor for ErB2 breast cancer biomarker determination in human serum, cell lysates and intact breast cancer cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 34-41, 2015.
- ESS, S. M., H. et al. Impact of subtypes and comorbidities on breast cancer relapse and survival in population-based studies. **The Breast**, v. 41, p. 151–158, 2018.
- ESTEVA, F. J. et al. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. **The Lancet Oncology**, v. 20, n.3, p.175–186, 2019.
- EUBANK, T. D. et al. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Inhibits Breast Cancer Growth and Metastasis by Invoking an Anti-Angiogenic Program in Tumor-Educated Macrophages. **Cancer Research**, v. 69, n. 5, p. 2133–2140, 2009.
- FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n.2, p. 77–106, 2018.
- FRAGOMENI, S. M.; SCIALIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018.
- FRICKER, L. D. Neuropeptides and Other Bioactive Peptides: From Discovery to Function. **Colloquium Series on Neuropeptides**, v.1, n. 3, p. 1–122, 2012.
- FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183–194, 2009.
- FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, 2012.
- GALOIAN, K.; PATEL, P. Epigenetic control of cancer by neuropeptides. **Biomedical Reports**, v. 6, p. 1, p. 3–7, 2017.
- GALOIAN, K. A.; TEMPLE, T. H.; GALOYAN, A. Cytostatic effect of novel mTOR

- inhibitor, PRP-1 (galarmin) in MDA 231 (ER-) breast carcinoma cell line. PRP-1 inhibits mesenchymal tumors. **Tumor Biology**, v. 32, n. 4, p. 745–751, 2011.
- GALOIAN, K. et al. Antitumorigenic Effect of Brain Proline Rich Polypeptide-1 in Human Chondrosarcoma. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 12, p. 2117–2121, 2009.
- GALON J. et al. The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 11-26 , 2013.
- GANEA, D.; DELGADO, M. Inhibitory neuropeptide receptors on macrophages. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 2, p. 141–147, 2001.
- GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, 2008.
- GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells, **Science**, p. 656-661, 2010.
- GENTLES, A. J. et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 938–945, 2015.
- GOI, T. et al. Anti-Prokineticin1 (PROK1) Monoclonal Antibody Suppresses Angiogenesis and Tumor Growth in Colorectal Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, 2014.
- GOLDSTEIN, N. S.; ZIEGFELD, C. R. Risk Factors and Risk Assessment. Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Breast Cancer. **Breast Cancer**, p. 55–69, 2011.
- GONIAS et al. Expression of LDL receptor-related proteins (LRPs) in common solid malignancies correlates with patient survival. **Plos One**, v.12, n. 10, 2017.
- GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol**, v. 5, p. 953–964, 2005.
- GUAL, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, 2005.
- GUN, S. Y. et al. Targeting immune cells for cancer therapy. **Redox Biology**, 2019.
- GU-TRANTIEN, C. et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. **Journal of Clinical Investigation**, 2013.
- HAMMERL D. et al.. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. **Semin Cancer Biol**, v. 52, n. 2, p. 178-188, 2018.
- HAO, J. et al. Nicotinic Receptor $\beta 2$ Determines NK Cell-Dependent Metastasis in a Murine Model of Metastatic Lung Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.
- HARBECK, N. et al. Breast Cancer. **Nature Reviews Disease Primer**, v. 5, n. 1, 2019.

- HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, 2015.
- HINGORANI, D. V. et al. Impact of MMP-2 and MMP-9 enzyme activity on wound healing, tumor growth and RACPP cleavage. **PLoS ONE**, 2018.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009.
- HUANG, Y.; FENG, Z. The good and bad of microglia/macrophages: new hope in stroke therapeutics. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 6–7, 2013.
- HUSSEIN M. R.; HASSAN H. I. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. **J Clin Pathol**, v. 59, n. 9, p. 972-977, 2006.
- IRWIG, L.; MACASKILL, P.; HOUSSAM, N. Evidence relevant to the investigation of breast symptoms: the triple test. **The Breast**, v. 11, n. 3, p. 215-220, 2002.
- JAHANYAR, J. et al. Mast Cell-Derived Cathepsin g: A Possible Role in The Adverse Remodeling of The Failing Human Heart. **Journal of Surgical Research**, v. 140, n. 2, p.199–203, 2007.
- JIANG, X.; SHAPIRO, D. J. The immune system and inflammation in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 673–682, 2014.
- KARIN, N. ; RAZON, H. Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity. **Cytokine**, v. 109, p. 24-28, 2018.
- KARIN, N. Chemokines and cancer: new immune checkpoints for cancer therapy. **Current Opinion in Immunology**, v. 51, p. 140–145, 2018.
- KAWAMURA N. et al. Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse helper T cell subsets. **Neuroimmunomodulation**, v. 5, p. 9-15, 1998.
- KIM, R. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. **Cancer Immunotherapy**, p. 9–27, 2007.
- KITLINSKA, J. Neuropeptide Y (NPY) in neuroblastoma: Effect on growth and vascularization. **Peptides**, v. 28 n. 2, p. 405–412, 2007.
- KLIMBERG, V. S.; BLAND, K. I. In Situ Carcinomas of the Breast. **The Breast**, p.130–144, 2018.
- KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation

- regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Pharmacol Rev.**, v. 53, n. 4, p. 487-525, 2001.
- KUMAR, P.; SAINI, S.; PRABHAKAR, B. S. Cancer Immunotherapy with Check Point Inhibitor Can Cause Autoimmune Adverse Events Due to Loss of Treg homeostasis. **Seminars in Cancer Biology**, 2019.
- KUOL, N. et al. Crosstalk between cancer and the neuro-immune system. **Journal of Neuroimmunology**, v. 315, p. 15–23, 2018.
- KWON, C. H. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 is a biomarker of poor prognosis in gastric cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, p. 1993-2002, 2014.
- LACEY-JR, J. V.; CHUNG, N. T.; BERNSTEIN, L. Breast Cancer Epidemiology. **Women and Health**, 2. ed., p. 1099-1112, 2013.
- LEE S. M.; CHOW L. Q. A new addition to the PD-1 checkpoint inhibitors for non-small cell lung cancer—the anti-PDL1 antibody—MEDI4736. **Transl Lung Cancer Res**, v. 3, n. 6, p. 408–410, 2014.
- LEE, Y. H. et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.
- LEVITE M.; CHOWERS Y. Nerve-driven immunity: neuropeptides regulate cytokine secretion of T cells and intestinal epithelial cells in a direct, powerful and contextual manner. **Ann. Oncol.**, v.12, p. 19-25, 2001.
- LI, B. et al. Comprehensive analyses of tumor immunity: implications for cancer immunotherapy. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, 2016.
- LI, J. et al. Explore, Visualize, and Analyze Functional Cancer Proteomic Data Using the Cancer Proteome Atlas. **Cancer Research**, v. 77, n. 21, p. 51-54, 2017.
- LI, J. et al. TCPA: a resource for cancer functional proteomics data. **Nature Methods**, v. 10, p. 1046-1047, 2013.
- LI, Z. et al. PD-L1 expression is associated with tumor FOXP3⁺regulatory T-cell infiltration of breast cancer and poor prognosis of patient. **Journal of Cancer**, 2016.
- LI, Z. et al. Cancer-associated fibroblasts promote PD-L1 expression in mice cancer cells via secreting CXCL5. **International Journal of Cancer**, 2019.
- LIANG, Y. et al. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, 2019.
- LIN, E. Y. et al. Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast

- Cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 23, p. 11238–11246, 2006.
- LIU, H.; LEAK, R. K.; HU, X. Neurotransmitter receptors on microglia. **BMJ**, v. 1, n. 2, p. 52–58, 2016.
- LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 8, p. 627–644, 2009.
- LONDIN, E. R.; BARASH, C. I. What is translational bioinformatics? **Applied & Translational Genomics**, v. 6, p. 1–2, 2015.
- LOTTI, T.; D'ERME, A. M.; HERCOGOVÁE, J. The role of neuropeptides in the control of regional immunity. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 5, p. 633–645, 2014.
- LOTTI, T.; HAUTMANN, G.; PANCONESI, E. Neuropeptides in skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, n. 3, p. 482–496, 1995.
- LOSURDO A. et al. Controversies in clinicopathological characteristics and treatment strategies of male breast cancer: a review of the literature. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 113, p. 283–291, 2017.
- LUNDBERG, J. M. et al. Co-release of neuropeptide Y and catecholamines during physical exercise in man. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 133, n. 1, p. 30–36, 1985.
- MA, Z. et al. Suppression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) Promotes Mammary Tumor Metastasis. **Molecular and Cellular Biology**, 2006.
- MALAVASI, F. et al. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. **Immunology Today**, v. 15, p. 95-97, 1994.
- MANCINO, M. et al. The neuronal influence on tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1816, n. 2, p. 105–118, 2011.
- MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. **F1000Prime Reports**, 2014.
- MCPHERSON K.; STEEL C. M.; DIXON J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v. 321, p. 624–628, 2000.

- MEDREK, C. et al. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. **BMC Cancer**, 2012.
- MELSSSEN, M.; SLINGLUFF, C. L. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v. 47, p. 85–92, 2017.
- MILLER, L. D. et al. Immunogenic subtypes of breast cancer delineated by gene classifiers of immune responsiveness. **Cancer Immunology Research**, 2016.
- MITTENDORF, E. A. et al. PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Immunology Research**, 2014.
- MOELANS et al. ESR1 amplification is rare in breast cancer and is associated with high grade and high proliferation: a multiplex ligation-dependent probe amplification study. **Analytical Cellular Pathology / Cellular Oncology**, v. 33, p. 13-18, 2010.
- MOODY, T. W.; MORENO, P.; JENSEN, R. T. Neuropeptides as lung cancer growth factors. **Peptides**, v. 72, p. 106–111, 2015.
- MOVAHEDI, K. et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. **Cancer Research**, 2010.
- MURRAY, P. J. et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 2014.
- NAGARAJAN, D.; MCARDLE, S. E. B. Immune Landscape of Breast Cancers. **Biomedicines**, v. 6, n. 1, 20, 2018.
- NARENDRA, B. L. et al. Immune system: a double-edged sword in cancer. **Inflammation Research**, v. 62, n. 9, p. 823–834, 2013.
- NAWAZ, S. The Normal Breast and Benign Diseases of the Breast. Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Breast Cancer. **Breast Cancer**, p. 1–10, 2011.
- NEMEROFF, C. B. et al. Neurotensin-induced hypothermia: Evidence for an interaction with dopaminergic systems and the hypothalamic-pituitary-thyroids axis. **Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 69–84, 1980.
- NIEDBALA, W. et al. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3- regulatory T cells from CD4+CD25- T cells via p53, IL-2, and OX40. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2007.
- NORDLIND, K.; MUTT, V.; SUNDSTRÖM, E. Effect of neuropeptides and monoamines on lymphocyte activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 2, n. 4, p. 282–292, 1988.
- PALUCKA, K.; COUSSENS, L. M.; O'SHAUGHNESSY, J. Dendritic Cells, Inflammation,

- and Breast Cancer. **The Cancer Journal**, v. 19, n. 6, p. 511–516, 2013.
- PARSONS, R. The Oncogenetic Basis of Breast Cancer. **Breast Cancer**, p. 15–26, 2005.
- PATHRIA, P.; LOUIS, T. L.; VARNER, J. A. Tumor- Associated Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 4, p. 310-327, 2019.
- PATRIS, S. et al. Nanoimmunoassay onto a screen printed electrode for HER2 breast cancer biomarker determination. **Talanta**, v. 130, p. 164-170, 2014.
- PEREIRA, L. X. et al. Correlation between renin-angiotensin system (RAS) related genes, type 2 diabetes, and cancer: Insights from metanalysis of transcriptomics data. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2019.
- PIAO, Y. J. et al. Breast cancer cell-derived exosomes and macrophage polarization are associated with lymph node metastasis. **Oncotarget**, 2018.
- PICCARD, H.; MUSCHEL, R. J.; OPDENAKKER, G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 82, n. 3, p. 296–309, 2012.
- PLITAS, G. et al. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. **Immunity**, 2016.
- POWELL, D. R.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 1, p. 41–52, 2016.
- PRABHA, A. T.; SEKAR, D. Deciphering the molecular signaling pathways in breast cancer pathogenesis and their role in diagnostic and treatment modalities. **Gene Reports**, v. 7, p. 1–17, 2017.
- PRAT, A. et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **The breast**, v. 24, p. 26-35, 2015.
- PRUNERI, G.; VINGIANI, A.; DENKERT, C. Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. **The Breast**, p. 207-214, 2018.
- QIU, S.-Q. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? **Cancer Treatment Reviews**, v. 70, p. 178–189, 2018.
- RANDOLPH, G. J.; JAKUBZICK, C.; QU, C.. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. **Current Opinion in Immunology**, 2008.
- RAO, S.; GHARIB, K.; HAN, A. Cancer Immunosurveillance by T Cells. **International Review of Cell and Molecular Biology**, 2018.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free**

Radical Biology and Medicine, 2010.

RIDNOUR, L. A. et al. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2007.

ROOIJEN J. M. V. et al. Immunotherapeutic options on the horizon in breast cancer treatment. **Pharmacol Ther**, v. 156, p. 90-101, 2015.

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G. F.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 356–363, 2009.

ROZENGURT, E. Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 3, p. 128–134, 2002.

SAID, S. I.; MUTT, V. Polypeptide with Broad Biological Activity: Isolation from Small Intestine. **Science**, v. 169, n. 3951, p. 1217–1218, 1970.

SAKAGUCHI, S. et al Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**, v.155, p. 1151–64, 1995.

SALEH, R. A.; ELKORD, E. Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors. **Cancer Letters**, v. 457, p. 168-179, 2019.

SALGADO, R. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 2, p. 259–271, 2014.

SAM; COLINS. **American Cancer Society**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>. Acessado em: 05 de dezembro de 2019.

SANCHEZ, L. et al. Long-term treatment for emotional distress in women with breast cancer. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 42, p. 126–133, 2019.

SAUSSEZ, S. et al. Towards Neuroimmunotherapy for Cancer: the Neurotransmitters Glutamate, Dopamine and GnRH-II augment substantially the ability of T cells of few Head and Neck cancer patients to perform spontaneous migration, chemotactic migration and migration towards the autologous tumor, and also elevate markedly the expression of CD3-zeta and CD3-epsilon TCR-associated chains. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 1007–1027, 2014.

SCANDIUZZI, L.; GHOSH, K.; ZANG, X. T cell costimulation and coinhibition: genetics

and disease. **Discovery medicine**, 2011.

SCHOPPMANN, S. F. et al. Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 3, p. 947–956, 2002.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011.

SHARMA, V. et al. Recent nanotechnological interventions targeting PI3K/Akt/mTOR pathway: A focus on breast cancer. **Seminars in Cancer**, v. 59, p. 133-146, 2019.

SHERAFATIAN, M. Tree-based machine learning algorithms identified minimal set of miRNA biomarkers for breast cancer diagnosis and molecular subtyping. **Gene**, v. 677, p. 111–118, 2018.

SHI, Y. et al. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2014.

SHI, W. et al. Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8+ T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer. **Experimental Cell Research**, 2018.

SIBBERING, M.; COURTNEY, C. A. Management of breast cancer: basic principles. **Surgery (Oxford)**, 2019.

SILVA, T. C. et al. TCGAbiolinksGUI: A graphical user interface to analyze cancer molecular and clinical data. **F1000Research**, 2018.

SIRINTRAPUN, S. J. et al. Translational Bioinformatics and Clinical Research (Biomedical) Informatics. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 36, n. 1, p. 153–181, 2016.

SMYTH, M. J. et al. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. **Immunological Reviews**, v. 202, n. 1, p. 275–293, 2004.

SOLIMAN, H.; KHALIL, F.; ANTONIA, S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. **PLoS ONE**, 2014.

SOLINAS, C. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer according to tumor subtype: Current state of the art. **The Breast**, v. 35, p. 142–150, 2017.

SPICER, D. Risk Factors for Development of Breast Cancer. **Breast Cancer**, p. 49–57, 2005.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Autocrine growth factors and cancer. **Nature**, v. 313, n.

6005, p. 745–747, 1985.

ST-PIERRE, S. et al. Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Bone Marrow-Derived Pro-Inflammatory Monocyte Production and Survival. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

STANTON, E.; RAMOS, E.; DISIS, M. L. Immunologic Approaches to Breast Cancer Therapy. *Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. **The Breast**, v. 5, p. 924-933, 2018.

STANTON, S. E.; DISIS, M. L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, 2016.

STEWART, D. A. et al. Basal breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages. **Molecular Cancer Research**, 2012.

STOKMAN, M. A. et al. Preventive intervention possibilities in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: Results of meta-analyses. **Journal of Dental Research**, 2006.

STRAUB, R.H. et al. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, p. 553-558, 2000.

SU, S. et al. Blocking the recruitment of naive CD4+ T cells reverses immunosuppression in breast cancer. **Cell Research**, 2017.

SUBRAMANI, R.; LAKSHMANASWAMY, R. Pregnancy and Breast Cancer. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 151, n. 3, p. 81-111, 2017.

TAO Z. et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochem Biophys**, v. 72, p. 333–338, 2015.

TENENBAUM, J. D. Translational Bioinformatics: Past, Present, and Future. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 31–41, 2016.

TESCHENDORFF, A. E. et al. Improved prognostic classification of breast cancer defined by antagonistic activation patterns of immune response pathway modules. **BMC Cancer**, 2010.

TOMITA, H. et al. Inhibition of Gastric Carcinogenesis by the Hormone Gastrin Is Mediated by Suppression of TFF1 Epigenetic Silencing. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 879–891, 2011.

THORSSON, V., et al. The Immune Landscape of Cancer. **Immunity**, v. 48, n. 4, p. 812–830, 2018.

TSENG, D. et al. Cancer Immunology. **Abeloff's Clinical Oncology**, 6 ed., p. 84-96, 2020.

TSUNG, K. et al. Macrophages as effector cells in interleukin 12- induced T cell-dependent

- tumor rejection. **Cancer Res.**, v. 62, p. 5069–5075, 2002.
- TULOTTA, C.; OTTEWELL, P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. **Endocrine-Related Cancer**, v. 25, n. 7, p. 421–434, 2018.
- VAHIDIAN, F. et al. Interactions between cancer stem cells, immune system and some environmental components: friends or foes? **Immunology Letters**, 2019.
- VENEMA, C. M. et al. Consideration of breast cancer subtype in targeting the androgen receptor. **Pharmacology & Therapeutics**, p. 135-147, 2019.
- VERMA R. et al. Pathological and epidemiological factors associated with advanced stage at diagnosis of breast cancer. **Br Med Bull.**, v. 103, n. 1, p. 129-45, 2012.
- VESELY, M. D. et al. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n.1, p. 235–271, 2011.
- VOGEL V. G. Epidemiology of Breast Cancer. **The Breast (Fifth Edition) Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases**, p. 207-218, 2018.
- WAGNER, J. et al. A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. **Cell**, 2019.
- WANG, Z. Q. et al. PD-L1 and intratumoral immune response in breast cancer. **Oncotarget**, 2017.
- WANG, Y. mir-195 inhibits tumor growth and angiogenesis through modulating IRS1 in breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 95-101, 2016.
- WELLENSTEIN, M. D.; DE VISSER, K. E. Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the tumor immune landscape. **Immunity**, v. 48, n. 3, p. 399–416, 2018.
- WU, J. et al. Dopamine inhibits the function of Gr-1+ CD115+ myeloid-derived suppressor cells through D1-like receptors and enhances anti-tumor immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 1, p. 191–200, 2014.
- WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 2013.
- ZHAO, M. et al. Multi-tissue transcriptomics for construction of a comprehensive gene resource for the terrestrial snail *Theba pisana*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.
- ZHAO, M. et al. Copy number alteration of neuropeptides and receptors in multiple cancers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- ZHAO, X. et al. Saikosaponin A Inhibits Breast Cancer by Regulating Th1/Th2 Balance. **Frontiers in Pharmacology**, 2019.

ZHANG, N.; OPPENHEIM, J. J. Neuropeptides That Regulate Immune Responses. **Handbook of Biologically Active Peptides**, p. 579–584, 2006.

ZHANG, Q. et al. CCL5-Mediated Th2 Immune Polarization Promotes Metastasis in Luminal Breast Cancer. **Cancer Research**, 2015.

ZHOU, S. L. et al. CXCL5 contributes to tumor metastasis and recurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma by recruiting infiltrative intratumoral neutrophils. **Carcinogenesis**, 2014.

ZOU, W. et al. PERK-Phosphorylated eIF2 α Pathway Suppresses Tumor Metastasis Through Downregulating Expression of Programmed Death Ligand 1 and CXCL5 in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, 2017.