



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SARAH LOTT MORETTO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE *PDCD1* NO
CÂNCER DE MAMA:
IMPLICAÇÕES NA PATOGÊNESE MAMÁRIA**

Londrina
2021

SARAH LOTT MORETTO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE *PDCD1* NO
CÂNCER DE MAMA:
IMPLICAÇÕES NA PATOGÊNESE MAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Angelica Ehara Watanabe

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Bruna Karina Banin Hirata

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Moretto, Sarah Lott.

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE PDCD1 NO CÂNCER DE MAMA :
IMPLICAÇÕES NA PATOGÊNESE MAMÁRIA / Sarah Lott Moretto. -
Londrina, 2021.
59 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Bruna Karina Banin Hirata.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de mama - Tese. 2. Polimorfismos de nucleotídeo único - Tese. 3. Receptor de morte programada 1 - Tese. 4. Resposta imune antitumoral - Tese. I. Watanabe, Maria Angelica Ehara. II. Hirata, Bruna Karina Banin. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

SARAH LOTT MORETTO

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DO GENE *PDCD1* NO
CÂNCER DE MAMA:
IMPLICAÇÕES NA PATOGÊNESE MAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Carvalho de Oliveira
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof^a. Dr^a. Julie Massayo Maeda Oda
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul -
UFMS

Londrina, 18 de maio de 2021.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dr^ª Maria Angelica, maravilhosa orientadora, por ter me dado essa oportunidade ímpar de participar do laboratório, por nunca ter duvidado de mim desde o meu primeiro dia, pela amizade, carinho, apoio, paciência, orientação, boas risadas e momentos... Serei eternamente grata a você.

À minha incrível coorientadora, Prof^ª Dr^ª Bruna, pela paciência, apoio, carinho, amizade, por compartilhar tudo e mais um pouco do seu conhecimento, pelas risadas, lanches e trilhas... aprendi e cresci muito com você.

Aos membros da banca examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Jaqueline Carvalho de Oliveira e Profa. Dra. Julie Massayo Maeda Oda, pelo aceite em avaliar o trabalho e pela colaboração e contribuição para a melhora do mesmo.

Aos meus pais, Antonio Carlos Moretto e Rossana Lott Rodrigues, que não soltaram minhas mãos desde o início dessa jornada, sempre me puxando para frente e acreditando em mim quando eu mais duvidava. Vocês são meus eternos alicerces.

A todos do Laboratório de Estudos e Análises de Polimorfismos Genéticos e Imunologia da Universidade Estadual de Londrina, Alberto, Carol Ariza, Carol Fernandes, Glauco, Isaura, Luiz, Mariana Pinsetta, Mariana Usso, Marla, Matheus, Mayara, Nathália e Vânia. Vocês fizeram cada PCR, gel e clivagem valer a pena.

A todos os meus colegas do mestrado, que conhecem, tanto quanto eu, a caminhada para chegar até aqui.

A todos os meus amigos, que de forma direta e indireta estiveram presentes, sempre me apoiando.

Ao meu namorado, Luiz Henrique, que sempre esteve ao meu lado, me fazendo sorrir e caminhar quando eu queria desistir. Você abriu essa porta para mim. Sou eternamente grata por ter você ao meu lado.

À equipe do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) que auxiliou na coleta de amostras utilizadas neste estudo e à equipe do setor de prontuários do Hospital do Câncer de Londrina, pelo auxílio na pesquisa de

informações clínicas das pacientes.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, Fundação Araucária e FAEPE-UEL pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À UEL, pela oportunidade de estudar na instituição e permitir que esse trabalho fosse realizado.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pela formação científica e profissional.

A todas as doadoras voluntárias que cederam amostras biológicas, contribuindo, de maneira inestimável, para este estudo, sem as quais não seria possível realizá-lo. Muito obrigada!

À minha família, que sempre torceu e me encorajou a seguir em frente. Vocês são um presente de Deus.

A Deus, pois tu és minha fortaleza.

Aos meus pais, Rossana e Antonio Carlos, pelo amor implacável.

Às minhas amadas vó Jacira e madrinha Sonáli e ao meu amado vô Antonio. Vocês são as estrelas de Deus que me guiaram até aqui.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

(Carl Sagan)

MORETTO, S. L. **Análise de polimorfismos do gene *PDCD1* no câncer de mama: implicações na patogênese mamária.** 2021. 58 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Os tumores são heterogêneos e incluem, além das células neoplásicas e do estroma circundante, as células do sistema imunológico. Os linfócitos T CD8⁺ ativados apresentam grande importância na resposta antitumoral. A proteína de morte celular programada 1 (PD-1), expressa principalmente por linfócitos T, faz parte de um importante ponto de checagem da resposta imune, podendo contribuir para a tumorigênese quando associado ao seu ligante PD-L1 ou PD-L2, expresso por células tumorais. Sabe-se que polimorfismos genéticos podem causar alterações estruturais e quantitativas, influenciando na resposta imunológica. Nesse contexto, este estudo teve por objetivo analisar as variantes alélicas 7146 G>A (rs11568821) e 7209 C>T (rs41386349) do gene *PDCD1*, o qual codifica para a proteína PD-1, em 204 pacientes com câncer de mama e em 400 mulheres livres de câncer, e correlacioná-las com parâmetros clínico-patológicos. A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue periférico e após a execução da técnica de reação em cadeia da polimerase, seguida de digestão enzimática (PCR-RFLP), os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de acrilamida para genotipagem e análise. Neste estudo de associação caso-controle, verificou-se que portadores do alelo A do polimorfismo genético 7146 G>A do gene *PDCD1* têm risco maior de desenvolver câncer de mama (OR = 2,42; IC 95% = 1,59 - 3,69; p < 0,001). Esse polimorfismo também se correlacionou com amostras positivas para receptores de estrogênio (τ = 0,25; p < 0,01) e progesterona (τ = 0,17; p = 0,021). No entanto, nenhuma associação entre a variação 7209 C>T e o câncer de mama foi encontrada. Esses resultados relacionados ao polimorfismo PD-1 7146 G>A podem contribuir como um marcador potencial de suscetibilidade e prognóstico para câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Polimorfismo genético. Linfócitos T citotóxicos. PD-1.

MORETTO, S. L. **Analysis of polymorphisms of the *PDCD1* gene in breast cancer**: implications for breast pathogenesis. 2021. 58 p. Dissertation (Master's in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Tumors are heterogeneous and include, in addition to neoplastic cells and surrounding stroma, cells of the immune system. Activated T CD8⁺ lymphocytes are of great importance in the antitumor response. The programmed cell death protein 1 (PD-1), expressed mainly by T lymphocytes, is part of an important checkpoint of the immune response, and may contribute to tumorigenesis when associated with its ligand PD-L1 or PD-L2, expressed by tumor cells. It is known that genetic polymorphisms can cause structural and quantitative changes, influencing the immune response. In this context, this study aimed to analyze the allelic variants 7146 G>A (rs11568821) and 7209 C>T (rs41386349) of the *PDCD1* gene, which encodes for PD-1 protein, in 204 patients with breast cancer and 400 cancer-free women, and correlate them with clinical-pathological parameters. DNA extraction was performed from peripheral blood samples and after performing the polymerase chain reaction technique, followed by enzymatic digestion (PCR-RFLP), DNA fragments were separated by acrylamide gel for genotyping and analysis. In this case-control association study, it was found that carriers of the A allele of the PD-1 7146 G>A genetic polymorphism have higher risk of developing breast cancer (OR = 2.42; CI 95% = 1.59 - 3.69; p < 0.001). This polymorphism also correlated with positive samples for estrogen (τ = 0.25; p < 0.01) and progesterone receptors (τ = 0.17; p = 0.021). However, no association was found between the 7209 C>T variation and breast cancer. These results about the PD-1 7146 G>A polymorphism may contribute as potential susceptibility and prognosis marker for breast cancer.

Key words: Breast cancer. Genetic polymorphism. Cytotoxic T lymphocytes. PD-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Interação entre o receptor PD-1 no linfócito T citotóxico com o ligante PD-L1 expresso na célula tumoral.....20
- Figura 2** – Estrutura esquemática do gene *PDCD1* e localização dos polimorfismos genéticos 7146 G>A (rs11568821) e 7209 C>T (rs41386349) no íntron 421
- Figura 3** – Análise dos polimorfismos da região intrônica 4 do *PDCD1*27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular dos tumores de mama	16
Tabela 2 – Concentrações de reagentes utilizados na reação de PCR	25
Tabela 3 – Condições utilizadas para a amplificação da região do gene <i>PDCD1</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Adenina
AgNO ₃	Nitrato de prata
APC	(<i>Antigen–Presenting Cell</i>): Célula Apresentadora de antígenos
BCR	(<i>B cell receptor</i>): Receptor de célula B
bp	(<i>Base pair</i>): par de base
C	Citosina
CD	(<i>Cluster of differentiation</i>): Grupo de diferenciação
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CTLA-4	(<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>): Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DC	Células dendríticas
DNA	(<i>Desoxyribonucleic Acid</i>): Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	(<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>): Ácido etilendiamino tetra-acético
ER	(<i>Estrogen receptor</i>): Receptor de estrógeno
G	Guanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HER2	(<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>): Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
HER2+	Câncer de mama HER2 enriquecido/superexpresso
IC95%	Intervalo de Confiança utilizando 95% como coeficiente de confiança.
IARC	(<i>International Agency for Research on Cancer</i>): Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IL-12	Interleucina-12
IFN γ	Interferon gamma
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITIM	(<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i>): Motif inibidor baseado em imunorreceptores tirosina-quinases
ITSM	(<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif</i>): Motif de troca baseado imunorreceptor-tirosina

Ki-67	Índice de proliferação celular Ki-67
LA	Câncer de mama Luminal A
LB	Câncer de mama Luminal B
LPS	Lipopolissacarídeo
mM	Milimolar
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células <i>natural killers</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	(<i>Odds Ratio</i>): Razão de Chances
pb	Par de base
PCR	(Polymerase Chain Reaction): Reação em cadeia da polimerase
PD-1	(Programmed cell death protein 1): Proteína de morte celular programada 1
PD-L1/2	(<i>Programmed death-ligand 1/2</i>): Ligante de morte programada 1/2
PR	<i>Progesterone receptor</i> (receptor de progesterona)
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RUNX1	Fator de transcrição1 relacionado com o gene RUNT
SLE	(<i>Systemic lupus erythematosus</i>): Lupus Eritematoso Sistêmico
SNP	(<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>): Polimorfismo de nucleotídeo único
T	Timina
TCR	(<i>T cell receptor</i>): Receptor de célula T
TILs	(<i>Tumor-infiltrating Lymphocytes</i>): Infiltrados linfocitários associados ao tumor
TN	Câncer de mama Triplo-negativo
TNM	Sistema Tumor-Nódulo-Metástase
Treg(s)	Célula(s) T regulatória(s)
U	Unidade
UICC	União Internacional para Controle do Câncer
USF	Fator de transcrição fator estimulador a montante/ <i>upstream</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	DESENVOLVIMENTO	14
2.1	CÂNCER DE MAMA FEMININO	14
2.1.1	Caracterização Clínica e Molecular de Tumores Mamários	15
2.2	RESPOSTA IMUNE AO TUMOR: TILS E <i>CHECKPOINTS</i> IMUNOLÓGICOS	17
2.2.1	Proteína de Morte Celular Programada 1 (PD-1).....	19
2.2.2	Alterações do Gene <i>PDCD1</i>	20
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVOS GERAIS	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	COLETA DE AMOSTRAS	24
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA	24
4.3	GENOTIPAGEM POR PCR-RFPL	25
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
5	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	28
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	48
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	49

1 INTRODUÇÃO

O câncer é, sem dúvida, uma doença de relevância mundial por ser a segunda maior causa de morte prematura (antes dos 70 anos) em todo o mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares. O crescente aumento da incidência de todos os tipos de câncer vêm como resultado do aumento da exposição a diversos fatores de risco e ao aumento da expectativa de vida, tanto em países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (INCA, 2019).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo, atrás apenas do câncer de pulmão, sendo o de maior incidência e de maior mortalidade na população feminina, representando cerca de 1,7 milhões de novos casos anuais. Para o triênio 2020-2022 no Brasil, o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) estima uma ocorrência de 625 mil novos casos de todos os tipos de câncer, com exceção dos tumores de pele não melanoma. A estimativa de novos casos de câncer de mama feminino gira em torno de 66.280 ocorrências por ano, sendo que a Região Sul ocupa o segundo lugar em número de casos por 100 mil habitantes (71,16/100 mil), atrás apenas da Região Sudeste (81,06/100 mil) (INCA, 2019).

O carcinoma mamário é uma doença heterogênea, com comportamentos biológicos distintos influenciados por diversos fatores extrínsecos e intrínsecos. A heterogeneidade destes tumores é observada nas diversas manifestações clínicas e morfológicas, variadas assinaturas genéticas e, conseqüentemente, diferenças nas respostas terapêuticas (INCA, 2019).

O estadiamento clínico anatômico, o qual inclui o estadiamento tumoral e o grau de diferenciação histológica, é uma importante classificação utilizada na clínica para auxiliar na orientação do tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC). Este sistema de classificação baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em consideração as características do tumor primário, os linfonodos do sistema de drenagem linfática do órgão em que o tumor está localizado e na presença ou ausência de metástases. A avaliação desses parâmetros permite, portanto, determinar o estadiamento do tumor, o qual varia entre os estadios 0 (*in situ*) ao IV (metastático) (MAUGHAN *et al.*, 2010).

Apesar de apresentar bom prognóstico quando detectado nos

estágios iniciais, o câncer de mama feminino permanece sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (BOYLE e FORBES, 2008; FERLAY *et al.*, 2015). Apesar de não existir um único fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama feminino, a idade acima dos 50 anos pode ser considerada o fator mais importante no Brasil (INCA, 2019). Em 2018, ocorreram 17.572 óbitos por câncer de mama feminina no Brasil, sendo o equivalente a um risco de 16,4 por 100 mil (INCA, 2021).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 CÂNCER DE MAMA FEMININO

No Brasil, o Ministério da Saúde preconizou ações de rastreamento populacional para o diagnóstico precoce do câncer de mama. As ações de rastreamento incluem os exames de mamografia, auto exame de mama, exame clínico, ressonância nuclear magnética e ultrassonografia. A mamografia é recomendada para mulheres de 50 a 69 anos de idade, com periodicidade bienal. (INCA, 2015).

O sintoma inicial mais frequente é o aparecimento de nódulo, geralmente indolor, duro e irregular, podendo apresentar, também, consistência branda, globosa e bem definida. Outros sinais são edema cutâneo semelhante à casca de laranja, retração cutânea, dor, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo e secreção papilar, especialmente quando é unilateral e espontânea. A secreção geralmente é transparente, podendo ser rosada ou avermelhada devido à presença de glóbulos vermelhos. Podem também aparecer linfonodos palpáveis na axila (INCA, 2015).

Não existe apenas um fator de risco para o carcinoma mamário, entretanto, a idade acima dos 50 anos é considerado o mais importante (INCA, 2019). Diversos fatores podem contribuir para o aumento do risco de desenvolver a doença como, por exemplo, fatores genéticos (mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2*) e fatores hereditários (câncer de ovário familiar) (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2019), além da menopausa tardia (fatores da história reprodutiva e hormonal), obesidade, sedentarismo e exposições frequentes a radiações ionizantes (fatores ambientais e comportamentais) (INCA, 2019).

Apesar da maior incidência do câncer de mama ocorrer em mulheres a partir dos 50 anos de idade, alguns relatos indicaram um aumento na incidência e mortalidade em mulheres jovens em diferentes populações do mundo. Entre 50 e 60 anos de idade, o tumor apresenta aspectos de melhor prognóstico, os quais possibilitam tratamentos de maior sucesso (STIVAL *et al.*, 2014). De modo geral, menos de 1% de todos os carcinomas mamários ocorrem em mulheres com menos de 25 anos de idade (CHOY e GIULIANO, 2014).

Os fatores hereditários estão relacionados à ocorrência de mutações em determinados genes de alta penetrância, principalmente *BRCA1* e *BRCA2*.

Mulheres com histórico familiar de carcinoma mamário e/ou pelo menos um caso de câncer de ovário em parentes consanguíneos, principalmente em idade jovem, ou câncer de mama masculino, também em parente consanguíneo, podem ter predisposição genética e apresentam alto risco para o desenvolvimento da doença. Entretanto, o câncer de mama hereditário representa apenas 5% a 10% do total de casos da doença (TRICHOPOULOS *et al.*, 2008).

Os fatores hormonais estão relacionados principalmente ao estímulo estrogênico, seja endógeno ou exógeno, com aumento do risco quanto maior for a exposição. Esses fatores incluem: história de menarca precoce (primeira menstruação antes dos 12 anos), menopausa tardia (após os 55 anos), primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade (ausência de gravidez), uso de contraceptivos orais (estrogênio-progesterona) e terapia de reposição hormonal pós-menopausa (estrogênio-progesterona) (IARC, 2015; WHO, 2015).

Os fatores ambientais e comportamentais melhor estabelecidos incluem a exposição à radiação ionizante, sobrepeso e obesidade na pós-menopausa e a ingestão de bebida alcoólica (INUMARU *et al.*, 2011; IARC, 2016). O risco de desenvolver câncer de mama devido à radiação ionizante é proporcional a dose e a frequência da exposição (TRICHOPOULOS *et al.*, 2008). Desde doses baixas e frequentes, como observado nos exames de mamografia, a doses altas ou moderadas, como ocorre em tratamentos na região do tórax em mulheres jovens, parecem influenciar no risco do desenvolvimento do câncer de mama, aumentando-o (GOLUBICIC *et al.*, 2008).

2.1.1 Caracterização Clínica e Molecular de Tumores Mamários

Histologicamente, os tumores de mama podem ser classificados em ductais e lobulares, de acordo com o local de origem da neoplasia. Os ductais representam cerca de 80% dos tumores, se desenvolvendo nos ductos mamários. Os lobulares desenvolvem-se no interior dos lóbulos e representam cerca de 10 a 15% dos casos. Outros subtipos representam menos de 10% dos casos diagnosticados por ano (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

O carcinoma mamário apresenta-se como uma doença heterogênea, com diversificados aspectos histológicos e moleculares. Além da classificação histológica (ductal e lobular), estudos recentes demonstraram que o câncer de mama apresenta aspectos moleculares que permitem sua classificação em vários subtipos, os quais possuem curso clínico distintos e respostas diferenciadas aos tratamentos.

A classificação baseada em um perfil molecular, feito a partir de uma análise da expressão de diversos genes, leva em consideração o *status* dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona), a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) e o índice de proliferação celular Ki-67 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

Os 4 subtipos principais do câncer de mama (Tabela 1) são: Luminal A, o qual possui melhor prognóstico e é caracterizado por ser receptor de estrógeno (RE) e/ou receptor de progesterona (RP) positivo, HER2 não superexpresso e baixo Ki-67 (<14%); Luminal B, o qual apresenta prognóstico intermediário, caracterizado por ser RE e/ou RP positivo e alto índice Ki-67 (>14%), podendo ser HER2 negativo ou positivo; HER2 enriquecido (HER2+), o qual tem como característica receptores hormonais negativos e a superexpressão do HER2; e, por fim, o subtipo Triplo-negativo (TN), caracterizado por apresentar negatividade para os receptores hormonais e, também, HER2 não superexpresso (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular dos tumores de mama.

Subtipo molecular	Padrão de imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14% RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2+)
HER2 enriquecido	RE-, RP- e HER2+
Triplo negativo	RE-, RP-, HER2-

Fonte: adaptado de Cirqueira *et al.* (2011).

Os receptores de estrógeno e progesterona são expressos tanto no epitélio quanto no estroma mamário (HASLAM e SHYAMALA, 1981; DANIEL; SILBERSTEIN; STRICKLAND, 1987; HASLAM, 1989). Os RE e RP são os marcadores mais investigados nos estudos de câncer de mama. Em comparação com neoplasias negativas para receptores hormonais, o câncer de mama hormônio positivo apresenta melhor resposta clínica ao tratamento hormonal e aparência morfológica mais diferenciada (HENDERSON e PATEK, 1998). Além disso, as pacientes com esse tipo de tumor apresentam maior sobrevida, tanto livre de doença, quanto global (WITTLIFF; 1984; HARVEY *et al.*, 1999).

O subtipo HER2+ é caracterizado pela superexpressão deste receptor e é geralmente negativo para RE e RP, apresentando alta expressão de genes

relacionados à progressão do ciclo celular (SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE, 2004). Este subtipo representa cerca de 15 a 20% das pacientes com câncer de mama. Do ponto de vista clínico, é considerado de prognóstico intermediário com relação aos subtipos luminais, apesar de, na última década, o tratamento com anticorpo monoclonal anti-HER2, conhecido pelo nome trastuzumab, ter aumentado significativamente a sobrevida tanto nas doenças em estágios iniciais quanto em estágios avançados de metástase (PARKER *et al.*, 2009; PICCART-GEBHART, 2010).

Os tumores TN representam cerca de 10-20% de todos os carcinomas mamários e são considerados os mais agressivos em relação aos outros subtipos (KUREBAYASHI, 2009). Comumente, tumores TN apresentam alto grau histológico, além de serem o subtipo de carcinoma de mama mais frequente em portadores de mutação no gene *BRCA1* (DAWSON *et al.*, 2009). Este subtipo também possui relação com o gene *TP53*, e estudos epidemiológicos indicaram uma alta prevalência entre as mulheres mais jovens e de ascendência Africana (CAROTENUTO *et al.*, 2010). Particularmente, possui um comportamento mais agressivo e predileção por metástase visceral, favorecendo um pior prognóstico (MAEGAWA e TANG, 2010).

A interação entre os tumores e seu microambiente é complexa e difícil de decifrar e sua compreensão é fundamental para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e estratégias terapêuticas (FRIDMAN *et al.*, 2012).

2.2 RESPOSTA IMUNE AO TUMOR: TILS E *CHECKPOINTS* IMUNOLÓGICOS

É estabelecido na literatura que a patogênese do câncer é iniciada e modulada pela interação entre as células malignas transformadas, o estroma circundante e o sistema imune inato e adaptativo. Essas interações são de alta complexidade e envolvem diversos componentes do sistema imune, os quais atuam tanto na defesa quanto em favor da iniciação, crescimento, invasividade e desenvolvimento de metástase (YAQUB e AANDAHL, 2009).

Os infiltrados linfocitários associados ao tumor (TILs) são células imunes presentes dentro e ao redor do tecido tumoral. Este microambiente tumoral contém células imunes pró-inflamatórias assim como células com atividades imunossupressoras. Células Th1, linfócito T citotóxicos (CTL), células natural killers (NK), células dendríticas (CD) e macrófagos M1 caracterizam uma resposta imune eficaz, enquanto macrófagos M2, células mielóides supressoras e as células T reguladoras (Treg) têm funções supressoras (DUSHYANTHEN *et al.*, 2015; SPELLMAN e TANG, 2016).

No início da tumorigênese, ocorre uma resposta inflamatória aguda, a qual resulta no recrutamento de componentes efetores do sistema imune inato, como macrófagos, células NK e CDs. Tal recrutamento leva à liberação de interferon gamma (IFN γ) e interleucina-12 (IL-12), as quais atuam estimulando a atividade dos macrófagos e NKs para causar a morte das células tumorais. Simultaneamente, as CDs atuam na apresentação de antígenos tumorais para células T *naïve* (SWOBODA e NANDA, 2018).

As células T *naïve* representam uma gama de células T que, ao se diferenciarem em células efetoras, atuam em diversas frentes, prejudicando ou favorecendo o desenvolvimento tumoral. As células T CD4⁺, por exemplo, desempenham importante papel na imunidade antitumoral, sendo essenciais para a ativação e proliferação de células T CD8⁺ tumor-específicas, assim como para a geração de células T CD8⁺ de memória (JANSSEN *et al.*, 2003). Já as células Tregs podem prevenir respostas imunes protetoras contra tumores, promovendo a progressão do câncer (SAKAGUCHI *et al.*, 2010).

Os TILs já foram relatados na literatura em diversos tipos de câncer, sem exceção ao câncer de mama. Diversos estudos demonstraram que 93,6% dos tumores mamários apresentam infiltrados de células inflamatórias substanciais no estroma circundante assim como entre as células tumorais (MAHMOUD *et al.*, 2012; LOI *et al.*, 2013).

No câncer de mama, níveis mais elevados de TILs foram observados em tumores TN e HER2⁺, em comparação com tumores RE⁺/HER2⁻ (LOI *et al.*, 2013). As células T abrangem a maioria da população de TILs no câncer de mama (SAVAS *et al.*, 2016) e a ocorrência de TILs nos tumores mamários fornecem informações sobre sua imunogenicidade, sugerindo que os subtipos TN e HER2⁺ são mais imunogênicos do que os tumores RE⁺/HER2⁻ (LUEN *et al.*, 2016).

O valor prognóstico dos TILs no câncer de mama foi avaliado extensamente em amostras de tumor de milhares de pacientes em estudos prospectivos de quimioterapia adjuvante. Foi demonstrada uma relação linear significativa entre níveis elevados de TILs no momento do diagnóstico e melhor prognóstico, assim como melhora da sobrevida livre de recorrência em pacientes com câncer de mama TN e HER2⁺ (LOI *et al.*, 2013; LOI *et al.*, 2014; ADAMS *et al.*, 2014; PRUNERI *et al.*, 2016; SAVAS *et al.*, 2016).

Recentemente, o papel prognóstico dos TILs na doença metastática foi investigado. Verificou-se que em pacientes com câncer de mama HER2⁺ avançado

tratados com docetaxel, trastuzumabe e pertuzumabe ou placebo, níveis mais elevados de TILs foram significativamente associados à melhora da sobrevida global. A compreensão da relação entre TILs e tumores mamários RE+ é mais complicada devido à associação de TILs com maiores taxas de proliferação celular, sendo isso associado a piores resultados nos cânceres de mama luminais (LUEN *et al.*, 2017).

Taxas mais altas de resposta e sobrevida mais longa foram observadas em pacientes com níveis mais elevados de TILs (SCHMID *et al.*, 2017), o que sugere que os TILs podem ter um papel como um biomarcador para a identificação de pacientes que podem responder à imunoterapia (WEIN *et al.*, 2018).

Os tumores possuem diversas maneiras de driblar o sistema imunológico antitumoral. Dentre os diversos mecanismos de evasão tumoral, a anergia ou tolerância induzida em linfócitos T efetores se destaca pela conexão direta entre esse grupo de células e as células tumorais. Através da expressão e interação entre receptores e ligantes inibitórios, as células tumorais são capazes de inativar a atividade antitumoral desempenhada pelas células T efectoras. Esses receptores e seus ligantes fazem parte do mecanismo conhecido como *checkpoint* imunológico (VINAY *et al.*, 2015).

Checkpoints imunológicos são sinais inibitórios que ocorrem em células T efectoras a partir de receptores expressos nessas células após sua ativação para evitar uma resposta exacerbada. Entretanto, no câncer esses receptores são induzidos pelo microambiente tumoral antes mesmo da ativação celular (JIANG; LI; ZHU, 2015). Dentre as diversas moléculas envolvidas nos *checkpoints* inibitórios, o receptor de morte programada-1 (PD-1) se destaca pelos crescentes estudos e aplicações na imunoterapia com anticorpos anti-PD-1 e anti-PD-L1, um dos seus ligantes. A interação entre o PD-1 e PD-L1 (Figura 1) causa uma inibição direta da apoptose nas células tumorais, além de promover a exaustão das células T efectoras, assim como a sua conversão em células Tregs imunossupressoras (SWOBODA e NANDA, 2018).

2.2.1 Proteína de morte celular programada 1 (PD-1)

O receptor PD-1, também conhecido como CD279 (*cluster of differentiation 279*), pertence à superfamília CD28/B7 de moléculas coestimulatórias (KEIR *et al.*, 2008), as quais fornecem sinais críticos para estimular a ativação e inibição de células T e outras células do sistema imunológico (MCADAM; SCHWEITZER; SHARPE, 1998). O PD-1 é expresso em células T CD4⁺ e CD8⁺

ativadas, células NK, linfócitos B, monócitos ativados e algumas células dendríticas (CD) (KEIR *et al.*, 2008). Além da função de regular o sistema imunológico, promove a auto-tolerância através da supressão da atividade de células T durante o processo inflamatório exacerbado, prevenindo a ocorrência de doenças autoimunes (LATCHMAN *et al.*, 2001). Entretanto, sua atividade inibitória impede que células T citotóxicas atuem induzindo a morte celular em células tumorais (SYN *et al.* 2017).

Em um *screen* para genes envolvidos na apoptose, Ishida, Honjo e colaboradores descobriram e nomearam o PD-1 (ISHIDA *et al.*, 1992). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que os camundongos nos quais o PD-1 estava nocauteado estavam propensos a desenvolverem doença autoimune e concluíram que o PD-1 era um regulador negativo das respostas imunes (IWAI *et al.*, 2002).

O PD-1 é uma proteína de membrana de 268 aminoácidos, codificado pelo gene *PDCD1*. A estrutura da proteína inclui um domínio IgV extracelular seguido por uma região transmembrana e uma cauda intracelular. A cauda intracelular contém dois sítios de fosforilação localizados em um *motif* inibidor baseado em imunorreceptores tirosina quinases (ITIM) e um *motif* de troca baseado em imunorreceptor-tirosina (ITSM), o que sugere que o PD-1 atua regulando negativamente os sinais do receptor de célula T (TCR) (ISHIDA *et al.*, 1992).

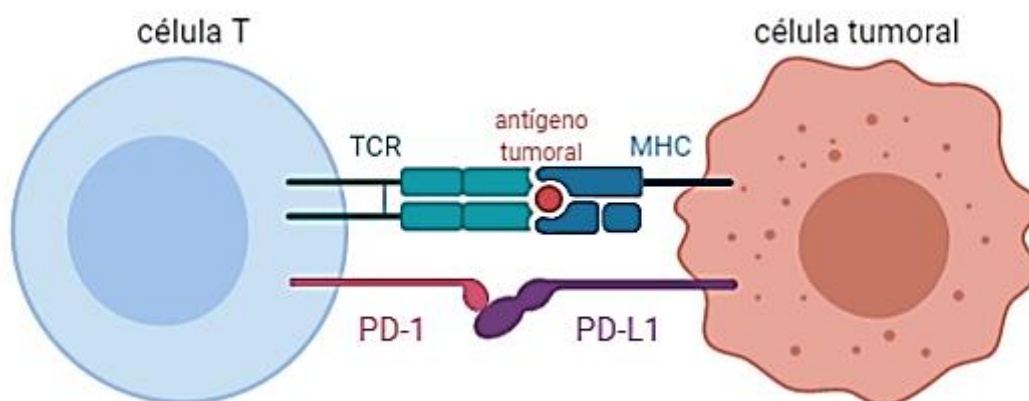


Figura 1- Interação entre o receptor PD-1 no linfócito T citotóxico com o ligante PD-L1 expresso na célula tumoral. Adaptado de BioRender.com, 2021.

O PD-1 tem dois ligantes, PD-L1 e PD-L2, que são membros da família B7 (FREEMAN *et al.*, 2000). A proteína PD-L1 é regulada positivamente em macrófagos e CD em resposta ao tratamento com LPS (lipopolissacarídeo) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), e em células T e B após a sinalização de receptores TCR e BCR (receptor de células B), respectivamente. O

PD-L1 é expresso em uma variedade de tecidos tumorais ou linhagens celulares, incluindo câncer de mama, câncer cervical, câncer de esôfago e carcinoma gástrico (OHIGASHI *et al.*, 2005; GHEBEH *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008; KARIM *et al.*, 2009) e, portanto, seu papel na evasão das células tumorais ao sistema imune está bem estabelecido (GANDINI; MASSI; MANDALÀ, 2016; SYN *et al.*, 2017).

Sabe-se que, similarmente ao PD-L1, a interação do PD-1 com PD-L2 inibe a proliferação de células T, assim como a produção de citocinas e citólise de células T (LATCHMAN *et al.*, 2001; RODIG *et al.*, 2003). A expressão de PD-L2 foi relatada como sendo mais restrita a células apresentadoras de antígeno, embora podendo ser induzida em outras células imunes e células não imunes por vários estímulos microambientais (LATCHMAN *et al.*, 2001; LESTERHUIS; STEER; LAKE, 2011). A expressão de PD-L2 em tecidos tumorais foi bem menos estudada do que a de PD-L1. O estudo de Yearley e colaboradores demonstrou que a expressão de PD-L2 estava significativamente aumentada em câncer gástrico e em câncer de mama triplo negativo. Entretanto, a expressão do PD-L2 variou bastante entre os outros tipos de câncer estudados, os quais foram carcinoma de célula renal, câncer de bexiga, melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas e carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (YEARLEY *et al.*, 2017).

Anticorpos monoclonais contra o PD-1 que estimulam o sistema imunológico estão sendo estudados e aplicados para o tratamento de diversos tipos de câncer (WEBER, 2010; SYN *et al.*, 2017). Muitas células tumorais expressam PD-L1 e a inibição do eixo PD-1/PD-L1 pode aumentar as respostas das células T e modular positivamente a atividade antitumoral.

A resposta observada à imunoterapia no câncer de mama é relativamente modesta em comparação com alguns outros tumores, como melanoma e câncer de pulmão de células não pequenas. Isso pode ser devido a mecanismos de escape imuno-tumorais bem desenvolvidos, como a expressão reduzida do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), resultando na diminuição do reconhecimento imunológico (DUSHYANTHEN *et al.*, 2015) e um microambiente tumoral imunossupressor presente na doença avançada (MIGALI *et al.*, 2016).

A combinação de quimioterapia, terapia direcionada ou radioterapia com imunoterapia pode aumentar as respostas, amplificando a imunogenicidade ou superando os mecanismos de escape imunológico (WEIN *et al.*, 2018). Existem agentes mediados, pelo menos em parte, pelo sistema imunológico (KROEMER *et al.*, 2015) e a combinação de inibidores de *checkpoint* imunológico com quimioterapia,

terapia direcionada e/ou radioterapia pode ser sinérgica (SOLIMAN, 2017).

2.2.2 Alterações do gene *PDCD1*

O gene *PDCD1* está localizado no braço longo do cromossomo 2, no *locus* 37.3. É constituído de 5 éxons codificantes e 4 íntrons. Mais de 30 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *PDCD1* (codificante para a proteína PD-1) já foram identificados em diversas regiões do gene, como PD-1.5 (rs2227981), PD-1.9 (rs2227982), PD-1 rs7421861, PD-1.3 (rs11568821) e PD-1 rs41386349 (PROKUNINA *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2006).

Os polimorfismos PD-1.3 G>A (rs11568821) e PD-1 C>T (rs41386349) (figura 2) estão localizados no íntron 4 do gene *PDCD1*, em uma região acentuada do gene, nas posições 7146 e 7209, respectivamente (PROKUNINA *et al.*, 2002). A partir deste momento, estes polimorfismos serão referenciados como 7146 G>A e 7209 C>T, para facilitar a descrição e compreensão.

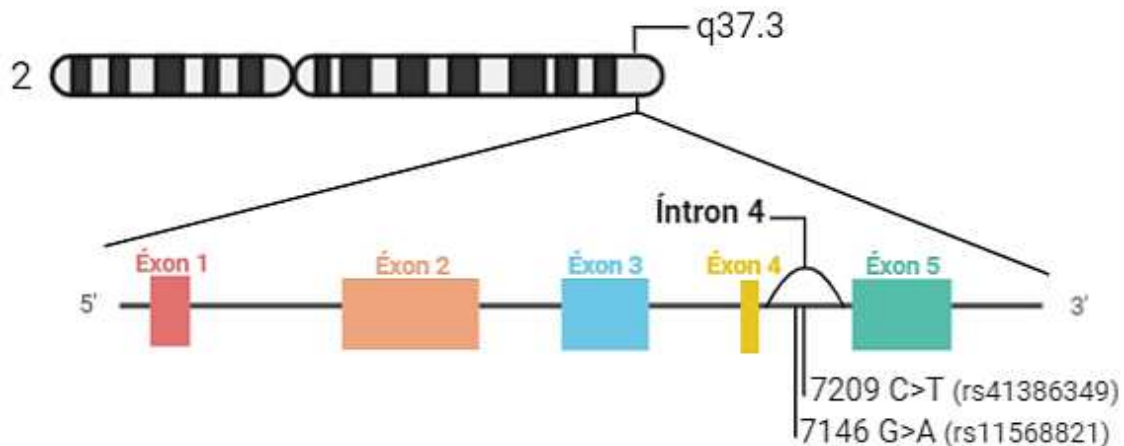


Figura 2 - Estrutura esquemática do gene *PDCD1* e localização dos polimorfismos genéticos 7146 G>A (rs11568821) e 7209 C>T (rs41386349) no íntron 4. Adaptado de BioRender.com, 2021.

Já foi observado que há uma variedade na predominância dos alelos e nos efeitos decorrentes destes. Algumas regiões do íntron 4 foram descritas como estruturas semelhantes a uma região potenciadora, contendo sítios de ligação para vários fatores de transcrição (PROKUNINA *et al.*, 2002).

No polimorfismo 7146 G>A ocorre uma alteração entre guanina (G) e adenina (A) (PROKUNINA *et al.*, 2002). O estudo de Kroner e colaboradores demonstrou que este polimorfismo pode afetar a ligação do fator de transcrição relacionado ao runt 1 (RUNX1) e alterar a regulação da transcrição do gene *PDCD1* e a eficiência do PD-1 (KRONER *et al.*, 2005). Tal inferência é corroborada pelos

estudos de Prokunina *et al.* e de Wang *et al.*, os quais mostraram que a mudança entre os alelos G e A leva à diminuição da transcrição de PD-1, sendo relacionado à susceptibilidade a doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (SLE) (PROKUNINA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2006).

Ademais, a pesquisa de Prokunina *et al.* indicou que a presença do alelo A resultou no comprometimento do efeito inibitório do PD-1 e um aumento na atividade dos linfócitos T (PROKUNINA *et al.*, 2002). Portanto, o alelo A pode aumentar a resposta antitumoral e reduzir a probabilidade do desenvolvimento de câncer (DONG *et al.*, 2016). Entretanto, nenhuma associação significativa foi verificada para câncer de mama e de tireóide em uma população iraniana (HAGHSHENAS *et al.*, 2011; HAGHSHENAS *et al.*, 2017) e para carcinoma hepatocelular em uma população turca (BAYRAM *et al.*, 2012).

Divergências com relação ao polimorfismo 7209 C>T também são relatadas. Este SNP está localizado em um sítio de ligação do fator de transcrição fator estimulador a montante/*upstream* (USF), além de estar próximo aos sítios de interação dos fatores de transcrição RUNX1 e NFκB (ZHENG *et al.*, 2010). A troca entre alelo C pelo T pode prejudicar a interação desses fatores, resultando em uma transcrição reduzida do gene (PROKUNINA *et al.*, 2002).

Wang e colaboradores mostraram que a ocorrência do alelo C está relacionada à diminuição da expressão de PD-1 e, assim, relacionada a doenças autoimunes (WANG *et al.*, 2006). De forma contrária, Mostowska *et al.* e Zheng *et al.* observaram que o alelo T era predominante em pacientes acometidos com SLE e infecções virais, respectivamente, sugerindo que o alelo T causa menor atividade transcricional do PD-1 em células T humanas (MOSTOWSKA *et al.*, 2008. ZHENG *et al.*, 2010).

A discrepância observada na ocorrência de diferentes alelos pode estar relacionada a variações populacionais, podendo apresentar ou não relação com doenças autoimunes, como SLE (PROKUNINA *et al.*, 2002; FERREIROS-VIDAL *et al.*, 2004) e diversos tipos de câncer (SALMANINEJAD *et al.*, 2017). Ressalta-se, assim, a importância de estudar esses SNPs em populações e sub-populações específicas, com o intuito de verificar suas relações com diversas doenças, permitindo inferir um prognóstico e tratamento personalizados de acordo com o perfil específico de uma dada população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar polimorfismos genéticos do receptor de morte programada 1 (PD-1) e suas possíveis implicações na patogênese e prognóstico do câncer de mama, englobando todos os subtipos da doença, sendo eles Luminal A, Luminal B HER2-negativo, Luminal B HER2-positivo, HER2-enriquecido e Triplo-negativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos PD-1 7146 G>A (rs11568821) e 7209 C>T (rs41386349) a partir de amostras de DNA de pacientes estratificados de acordo com subtipos de câncer de mama e em mulheres livres de neoplasia.
- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle entre polimorfismos PD-1 7146 G>A (rs11568821) e 7209 C>T (rs41386349) em um grupo controle e em câncer de mama.
- Avaliar a correlação do polimorfismo PD-1 7146 G>A (rs11568821) com parâmetros prognósticos das pacientes com câncer de mama.
- Avaliar a correlação do polimorfismo PD-1 7209 C>T (rs41386349) com parâmetros prognósticos das pacientes com câncer de mama.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

O presente estudo foi submetido e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UUEL 189/2013 – CAAE 17123113400005231) (anexo A), e todas as voluntárias, que cederam material biológico para o estudo, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Sangue periférico (5 mL) coletado com anticoagulante EDTA foi obtido de 204 pacientes com câncer de mama em acompanhamento no Hospital do Câncer de Londrina (HCL), Londrina, Paraná, Brasil. Os parâmetros clínicos foram extraídos dos prontuários dessas pacientes no mesmo hospital. Destas amostras, 96 foram diagnosticadas como Luminal A (LA), 21 como Luminal B HER2- (LB-), 20 como Luminal B HER2+ (LB+), 17 como HER2-enriquecidos (HER2+) e 35 como triplo-negativas (TN). As 15 amostras remanescentes não apresentavam subtipo diagnosticado nos prontuários.

Para o grupo controle, sangue periférico foi coletado (5 mL) de 400 mulheres sem evidência de carcinoma mamário, comprovado por exames clínico e de imagem e sem histórico pessoal e familiar de câncer.

Os dados clinicopatológicos das pacientes foram gentilmente fornecidos pelo Sistema de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do HCL. Os parâmetros clínicos incluíram: tamanho tumoral, comprometimento de linfonodos, índice de proliferação celular Ki-67, grau histológico, status de RP, RE e HER2 e estadiamento TNM (Tumor-Nódulo-Metástase), o qual foi determinado de acordo com o critério de classificação estabelecido pela União Internacional para o Controle do Câncer (UICC) (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2009). Nem todos os dados clinicopatológicos estavam disponíveis para todas as amostras de câncer de mama.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído de sangue periférico utilizando o kit comercial Biopur (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil) segundo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria em um aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A absorbância no

comprimento de onda de 260 nm foi utilizada para determinar a concentração de ácidos nucleicos e a razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm foi utilizada para determinar o grau de pureza das amostras.

4.3 GENOTIPAGEM POR PCR-RFPL

A análise dos polimorfismos genéticos foi feita por reações em cadeia da polimerase (PCR) seguidas de restrição enzimática, utilizando-se como base a técnica descrita por Wang *et al.* (2006). Um único segmento do gene *PDCD1* foi amplificado por PCR, englobando no mesmo amplicon os polimorfismos 7146 G>A (rs11568821) e 7209 C>T (rs41386349) contidos no íntron 4.

As concentrações dos reagentes utilizadas estão indicadas na tabela 2. Todos os reagentes de PCR (buffer, MgCl₂, dNTP, iniciadores, albumina e Taq DNA polimerase) foram adquiridos da Invitrogen® (Carlsbad, CA, EUA). Para amplificação da região dos polimorfismos presentes no íntron 4 as sequências dos pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram: 5'-ACGGCCTGCAGGACTCAC-3' e 5'-AGGCAGGCACATATGTG-3'. As condições de ciclagem da PCR encontram-se descritas na tabela 3. Todas as reações de PCR foram realizadas com um controle negativo (sem adição de DNA) para garantir que não houve contaminação da reação com DNA exógeno.

Tabela 2 – Concentrações de reagentes utilizados na reação de PCR.

Reagentes (concentração)	Concentração final	Volume (µL)
<i>Buffer</i> (10X)	1 X	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,0 mM	0,75
dNTP (1,25 mM)	0,1 mM	2,0
<i>Primer Sense</i> (2,5 µM)	0,2 µM	2,0
<i>Primer Antisense</i> (2,5 µM)	0,2 µM	2,0
Taq DNA Polimerase (5 U/µL)	1 U	0,25
Água ultrapura	-	14,5
Amostra	100 ng	1,0
Total	-	25,0

Fonte: Moretto, S. L., 2021.

Tabela 3 – Condições utilizadas para a amplificação da região do gene *PDCD1*.

Etapa	<i>PDCD1</i> íntron 4		Número de ciclos
	Temperatura	Tempo	
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	95 °C	45 s	40
Hibridização	63 °C	45 s	
Extensão	72 °C	1 min	
Extensão final	72 °C	7 min	1

Fonte: Moretto, S. L., 2021.

A amplificação foi verificada por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%) corados com nitrato de prata (AgNO_3). Os fragmentos gerados foram posteriormente clivados por enzimas de restrição, utilizando 1U da enzima para clivar 6 μL do produto de PCR por, no mínimo, 6h de incubação a 37°C, seguindo as recomendações dos fabricantes. Os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%) corados com AgNO_3 .

Para a região do íntron 4, foi gerado um fragmento de 225 pares de base (pb). A enzima de restrição *Pst*I (New England Biolabs®, Ipswich, MA, EUA) foi utilizada para determinar o polimorfismo 7146 G>A, uma vez que a substituição da base G para A cria um sítio de restrição adicional, além do sítio permanente, para essa enzima no fragmento amplificado. Assim, a clivagem do alelo A gera três fragmentos de 117, 98 e 10 pb respectivamente, enquanto o alelo G é clivado unicamente no sítio permanente, resultando em dois fragmentos de 215 e 10 pb, respectivamente.

Já para a análise do polimorfismo 7209 C>T, foi utilizada a enzima *Bsh*1236I (Invitrogen®), a qual reconhece o sítio de restrição no alelo C, clivando o fragmento amplificado em fragmentos de 172 e 53 pb. A substituição de C para T elimina o sítio de restrição da enzima, de forma que o fragmento do alelo T permanece inalterado após a digestão enzimática (225 pb).

A Figura 3 indica o fragmento amplificado para a análise dos polimorfismos da região intrônica 4 do *PDCD1*, destacando os sítios de anelamento dos *primers*, os sítios de restrição das enzimas utilizadas e os nucleotídeos polimórficos (que encontram-se sublinhados) (Figura 3A), e os perfis eletroforéticos apresentados para cada genótipo após a restrição enzimática (Figura 3B).

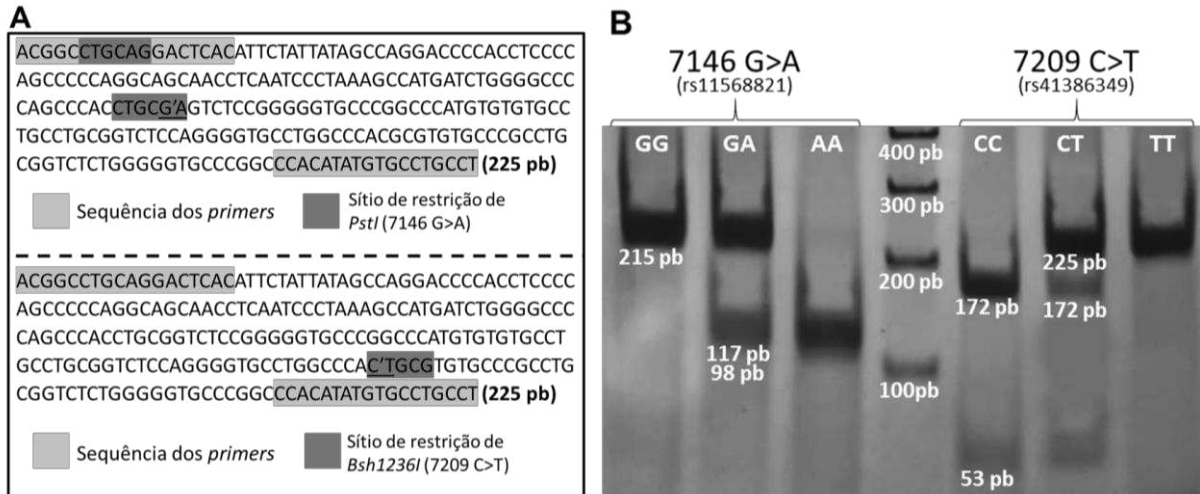


Figura 3 - Análise dos polimorfismos da região intrônica 4 do *PDCD1*. **A** – Sequência da região amplificada para genotipagem para os dois polimorfismos analisados. **B** – Fotodocumentação dos perfis eletroforéticos dos fragmentos de PCR submetidos à digestão enzimática. Fonte: Moretto, S. L., 2021.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de associação para o estudo caso–controle foram feitas pelo cálculo da Odds Ratio (OR) controlada pela idade através de regressão logística binária. Para os polimorfismos individuais foram testados os modelos genotípicos (heterozigotos ou homozigotos variantes contra homozigotos selvagens), dominante (heterozigotos e homozigotos variantes contra homozigotos selvagens) e recessivo (homozigotos variantes contra homozigotos selvagens e heterozigotos).

As análises de associação com parâmetros clínicos foram realizadas pelo teste de Qui–quadrado testando–se os modelos de associação contra os parâmetros clínicos categorizados. O cálculo do coeficiente de correlação Tau-b de Kendall foi realizado em seguida pra traçar a tendência de possíveis correlações entre as variáveis genéticas e clínicas.

Todos os testes estatísticos foram realizados nos softwares GraphPad Prism versão 8.0.0 (San Diego, California, USA), IBM® SPSS® Statistics versão 22 (IBM®, Armonk, New York, USA). Todos os testes foram bicaudais e tiveram nível de significância de 0,05.

5 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Association between PD-1 gene single nucleotide polymorphisms and breast cancer

Abstract

Tumors are heterogeneous and include, in addition to neoplastic cells and surrounding stroma, cells of the immune system. Activated T CD8⁺ lymphocytes are of great importance in the antitumor response. The programmed cell death protein 1 (PD-1), expressed mainly by T lymphocytes, is part of an important checkpoint of the immune response, and may contribute to tumorigenesis when associated with its ligand PD-L1 or PD-L2, expressed by tumor cells. It is known that genetic polymorphisms can cause structural and quantitative changes, influencing the immune response. In this context, this study aimed to analyze the allelic variants 7146 G>A (rs11568821) and 7209 C>T (rs41386349) of the *PDCD1* gene in 204 patients with breast cancer and 400 cancer-free women, and correlate them with clinical-pathological parameters. DNA extraction was performed from peripheral blood samples and after performing the polymerase chain reaction technique followed by enzymatic digestion (PCR-RFLP), DNA fragments were separated by acrylamide gel electrophoresis for genotyping and analysis. In this case-control association study, it was found that carriers of the A allele of the PD-1 7146 G>A genetic polymorphism have higher risk of developing breast cancer (OR = 2.42; CI 95% = 1.59 - 3.69; p <0.0001). This polymorphism also correlated with positive samples for estrogen (τ = 0.25; p = 0.00) and progesterone receptors (τ = 0.17; p = 0.021). However, no association was found between the 7209 C>T variation and breast cancer. These results about the PD-1 7146 G>A polymorphism may contribute as a potential susceptibility and prognosis marker for breast cancer.

Key-words: PD-1; polymorphisms; breast cancer;

Introduction

Breast cancer (BC) is the most commonly diagnosed cancer among women worldwide. For 2020, it was estimated over 2,2 million new cases of breast cancer and approximately 685,000 deaths (SUNG *et al.*, 2020).

Programmed cell death protein 1 (PD-1) is an abundant receptor related to diverse immune checkpoint responses and involved in several conditions, such as cancer and autoimmune diseases. It is found mostly on the surface of immune cells, such as cytotoxic T lymphocytes, antigen presenting cells and B lymphocytes. Its role is exerted in many fronts, recognizing self-cells through its ligands PD-L1 or PD-L2 which inactivate the immune cell, preventing self immune response. However, unbalanced activity is related to development of cancer and autoimmune diseases (PROKUNINA *et al.*, 2002; GATALICA *et al.*, 2014).

Recently, PD-1 gene, also nominated *PDCD1*, has been drawing attention worldwide for the 2018 Nobel winner Honjo, who described, along other colleagues, for the first time in 1992 the PD-1 molecule (ISHIDA *et al.*, 1992). Since then, many researches have been developed to elucidate this molecule functions and relation to the occurrence of diseases, such as cancer (GANDINI *et al.*, 2016; SYN *et al.*, 2017). It has been demonstrated in several studies that polymorphisms on *PDCD1* influence on the protein's expression and function, hence interfering on immune response of the host (PROKUNINA *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2006).

The role of PD-1 on cancer has been investigated in the past years since its discovery, and lately has been considered a major target for immunotherapy, in which an anti-PD-1 antibody blocks its recognition site for its ligand, preventing the cell from being inactivated, allowing its antitumor response to develop (WEBER, 2010; SYN *et al.*, 2017).

It is suggested that polymorphisms on *PDCD1* gene may increase antitumor response and reduce the likelihood of cancer development (DONG *et al.*, 2016). BC has a complex and heterogeneous pathogenesis, involving several features and clinical outcomes. On this matter, the influence of *PDCD1* polymorphisms on breast cancer has been studied in a few populations (HAGHSHENAS *et al.*, 2011; KARAMI *et al.*, 2020). However, as far as researched, no investigations were made regarding PD-1 polymorphisms on any breast cancer population in Brazil.

In this study, we aim to analyse the presence and influence on clinical outcomes of two PD-1 polymorphisms, 7146 G>A (rs11568821) and 7209 C>T

(rs41386349), on a BC population in South Region of Brazil. Possible correlations may indicate these polymorphisms as predictive markers of breast cancer susceptibility.

Materials and Methods

Ethics aspects and sample characterization

Human Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil approved the study (CAAE 17123113400005231). Patients and controls were informed in detail regarding the research and the consent term was obtained. In the present study were included 204 peripheral blood samples (5 mL) collected with EDTA as anticoagulant in the Cancer Hospital of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil (CHL). In total, 204 BC samples were obtained, of which 96 were diagnosed as Luminal A (LA), 21 as Luminal B HER2- (LB-), 20 as Luminal B HER2+ (LB+), 17 as HER2-enriched (HER2+) and 35 as triple-negative (TN) subtype. Subtype data was not available for the other 15 samples.

For the control group, 400 blood samples were collected from women of same geographic region, without BC, proved by clinical and imaging examination, no self-declared BC family history or personal history of any malignant disease.

Clinicopathologic parameters data and immunohistochemical subgroups of BC were kindly provided by CHL. Prognostic parameters included: tumor size, lymph nodes commitment, Ki-67 proliferation index, histological grade, clinicopathological staging (Tumor/Node/Metastasis classification), p53, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and HER-2 status, which were determined according to the Union of International Control of Cancer classification criteria (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2009). Not all clinicopathologic parameters were available for all 204 BC samples.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was obtained from peripheral blood cells using Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brazil), according to the manufacturer instructions. All samples were quantified by NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) at a wavelength of 260/280 nm and the final preparations were stored at - 20°C.

PDCD1 genotyping

Polymerase chain reaction (PCR) followed by enzymatic restriction (PCR-RLFP) was performed to genotype the SNPs rs11568821 and rs41386349, which also are named 7146 G>A and 7209 C>T, respectively, according to GenBank Accession Number NG_012110.1.

For 7146 G>A and 7209 C>T genotyping were used specific primers according to Wang *et al.* (2006). The amplicon includes both SNPs, allowing one single PCR protocol for both. The PCR was conducted using 1X of PCR Buffer (20mM of Tris-HCl pH 8.5; 50mM of KCl), 1 mM of MgCl₂, 0.1 mM of dNTP, 0.2μM of each primer, 1 U of Taq DNA polymerase, 100 ng of genomic DNA and ultra-pure H₂O (Milli-Q) to complete a final volume of 25 μL. Negative controls were used to confirm that no contamination occurred.

The cycling protocol was a denaturation at 95°C for 5 min, 40 cycles of 45 sec at 95°C, 45 sec at 63°C, 1 min at 72°C, and 10 min of final elongation at 72°C. PCR products (6 μl) of 7146 G>A and 7209 C>T were digested for at least 6 hours at 37°C with 1 unit/reaction of *Pst*I (New England Biolabs®, Ipswich, MA, EUA) and *Bsh*1236I (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) restriction enzymes, respectively. All PCR and digested products were analyzed on polyacrylamide gel (10%) and stained with silver nitrate.

Statistical analysis

Binary logistic regression analyses were conducted to investigate associations between polymorphisms or haplotype structures and BC, controlled by age. Associations were tested considering genotypic models (heterozygotes versus wild homozygotes; heterozygotes and variant homozygotes versus wild homozygotes). Correlation between polymorphisms and clinical parameters were assessed by Kendall-s tau-b rank correlation coefficient. All the statistical analyzes were performed in the softwares GraphPad Prism version 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA) and SPSS 22.0 version (SPSS Inc., Chicago, USA), were two-tailed and with 5% significance level.

Results

In this study, the age of BC patients ranged from 25 to 99, and the mean age was 54 ($\pm 12,8$) years. For the control group, the age ranged from 18 to 87, and the mean age was 54 (± 14) years. Approximately 95.6% of tumors were characterized as ductal carcinomas and 2% were lobular carcinomas. The mean tumor size was 2.9 ($\pm 2,4$) cm. Genotype distribution and allele frequencies for 7146 G>A and 7209 C>T polymorphisms are shown in Table 1. The case-control association study indicated that allele A carriers of the 7146 G>A *PDCD1* gene polymorphism have a higher risk of developing breast cancer (OR=2,42; CI 95%=1,59-3,69; $p < 0,0001$) (Table 2).

Table 1. Allelic and genotypic frequencies of PD-1 polymorphisms 7146 G>A (rs11568821) and 7209 C>T (rs41386349) in control and BC groups.

	Genotype	Controls n=400 (%)	Total BC n=204 (%)	LA n=96 (%)	LB- n=21 (%)	LB+ n=20 (%)	HER2+ n=17 (%)	TN n=35 (%)
7146 G>A	GG	347 (86.7)	149 (73)	62 (64.6)	16 (76,2)	14 (70)	16 (94.1)	31 (88.6)
	GA	48 (12)	55 (27)	34 (35.4)	5 (23,8)	6 (30)	1 (5.9)	4 (11.4)
	AA	5 (1.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Allele G	92.75%	86.5%	82.3%	88.1%	85%	97%	94.3%
	Allele A	7.25%	13.5%	17.7%	11.9%	15%	3%	5.7%
7209 C>T	CC	326 (81,5)	169 (82.8)	81 (84.4)	16 (76,2)	16 (80)	14 (82.4)	29 (82.9)
	CT	67 (16,7)	34 (16,7)	15 (15.6)	5 (23,8)	4 (20)	2 (11.7)	6 (17.1)
	TT	7 (1,8)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.9)	0 (0)
	Allele C	89.9%	91.2%	92.2%	88.1%	90%	88.3%	91.4%
	Allele T	10.1%	8.8%	7.8%	11.9%	10%	11.7%	8.6%

BC: Breast cancer; LA: Luminal A; LB-: Luminal B HER2-; LB+: Luminal B HER2+; HER2+: HER2-enriched; TN= triple negative.

Table 2. Case-control association study between PD-1 polymorphisms 7146 G>A (rs11568821) and 7209 C>T (rs41386349) genetic polymorphisms and total BC group.

	Genotype	Controls n=400 (%)	BC n=204 (%)	OR	CI 95%	p value
7146 G>A	GG	347 (86.7)	149 (73)	1	---	---
	GA	48 (12)	55 (27)	2.67	1.74 – 4.06	<0.0001*
	GA+AA	53 (13.25)	55 (27)	2.42	1.59 – 3.69	<0.0001*
7209 C>T	CC	326 (81.5)	169 (82.8)	1	---	---
	CT	67 (16.7)	34 (16.7)	0.98	0.62 – 1.55	>0.9999
	CT+TT	74 (18.5)	35 (17.2)	0.91	0.59 – 1.42	0.7378

*Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. BC: Breast cancer; OR: Odds Ratio; CI: confidence interval. Fisher's Exact Test.

The prognostic parameters in general BC patients and in different subtypes are shown in Tables 3 and 4, along the correlation between 7146 G>A and

7209 C>T polymorphisms, respectively. Some characteristics were not available for all patients. This polymorphism also correlated with the clinicopathological parameters estrogen ($\tau= 0,25$; $p= 0,01$) and progesterone ($\tau=0,17$; $p=0,021$) receptors positivity (Table 3). However, no association between the variation 7209 C>T and breast cancer was found (Table 4).

Table 3. Correlation analysis of *PDCD1* 7146 G>A (rs11568821) polymorphism with prognostic parameters in total BC sample.

Clinical outcomes		Total n= (%)	Genotypes	
			GG n= (%)	GA n= (%)
Tumor size (n=200)	< 1.5 cm	26 (13)	23 (11.5)	3 (1.5)
	1.5 – 3 cm	115 (57.5)	80 (40)	35 (17.5)
	> 3cm	59 (29.5)	44 (22)	15 (7.5)
$p= 0.46$; $\tau= 0.47$				
TNM Staging (n=153)	0	9 (5.9)	7 (4.6)	2 (1.3)
	I	30 (19.6)	21 (13.7)	9 (5.9)
	II	61 (39.8)	43 (28.1)	18 (11.7)
	III	46 (30.1)	33 (21.6)	13 (8.5)
	IV	7 (4.6)	7 (4.6)	0 (0)
$p= 0.861$; $\tau= -0.011$				
Histological grade (n=193)	I	20 (10.4)	17 (8.8)	3 (1.6)
	II	73 (37.8)	46 (23.8)	27 (14)
	III	100 (51.8)	78 (40.4)	22 (11.4)
$p= 0.331$; $\tau= -0.062$				
Ki-67 index (n=163)	Low	37 (22.8)	26 (16)	11 (6.7)
	Moderate	68 (41.7)	43 (26.4)	25 (15.3)
	High	58 (35.5)	46 (28.2)	12 (7.4)
$p= 0.183$; $\tau= -0.094$				
ER status* (n=194)	Negative	55 (28.4)	50 (25.8)	5 (2.6)
	Positive	139 (71.6)	92 (47.4)	47 (24.2)
$p= 0.01$; $\tau= 0.25^*$				
PR status* (n=194)	Negative	101 (52)	81 (41.8)	20 (10.3)
	Positive	93 (48)	61 (31.4)	32 (16.5)
$p= 0.021$; $\tau= 0.17^*$				
HER-2 status (n=188)	Negative	151 (80.3)	108 (57.4)	43 (22.9)
	Enriched	37 (19.7)	30 (16)	7 (3.7)
$p= 0.202$; $\tau= -0.09$				
p53 (n=176)	Wild	107 (60.8)	76 (43.2)	31 (17.6)
	Mutated	69 (39.2)	52 (29.5)	17 (9.7)
$p= 0.524$; $\tau= -0.048$				
LP commitment (n=193)	Negative	94 (48.7)	69 (35.8)	25 (12.9)
	Positive	99 (51.3)	71 (36.8)	28 (14.5)
$p= 0.793$; $\tau= 0.019$				

Kendall's Tau test (τ); *Value of $p<0.05$ was considered statistically significant. BC: breast cancer; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; LP: lymph node.

Table 4. Correlation analysis of *PDCD1* 7209 C>T (rs41386349) polymorphism with prognostic parameters in total BC sample.

Clinical outcomes		Total n= (%)	Genotypes		
			CC n= (%)	CT n= (%)	TT n= (%)
Tumor size (n=200)	< 1.5 cm	26 (13)	22 (11)	4 (2)	0 (0)
	1.5 – 3 cm	115 (57.5)	95 (47.5)	19 (9.5)	1 (0.5)
	> 3cm	59 (29.5)	49 (24.5)	10 (5)	0 (0)
$p= 0.928$; $\tau= 0.006$					
TNM Staging (n=153)	0	9 (5.9)	7 (4.6)	2 (1.3)	0 (0)
	I	30 (19.6)	28 (18.3)	2 (1.3)	0 (0)
	II	61 (39.8)	48 (31.4)	12 (7.8)	1 (0.7)
	III	46 (30.1)	38 (24.8)	8 (5.2)	0 (0)
	IV	7 (4.6)	6 (3.9)	1 (0.7)	0 (0)
$p= 0.79$; $\tau= 0.017$					
Histological grade (n=193)	I	20 (10.4)	15 (7.8)	5 (2.6)	0 (0)
	II	73 (37.8)	58 (30.1)	14 (7.3)	1 (0.5)
	III	100 (51.8)	87 (45)	13 (6.7)	0 (0)
$p= 0.127$; $\tau= -0.101$					
Ki-67 index (n=163)	Low	37 (22.8)	30 (18.4)	7 (4.3)	0 (0)
	Moderate	68 (41.7)	57 (35)	10 (6.1)	1 (0.6)
	High	58 (35.5)	48 (29.5)	10 (6.1)	0 (0)
$p= 0.877$; $\tau= -0.012$					
ER status (n=194)	Negative	55 (28.4)	46 (23.7)	8 (4.1)	1 (0.5)
	Positive	139 (71.6)	115 (59.3)	24 (12.4)	0 (0)
$p= 0.922$; $\tau= 0.007$					
PR status (n=194)	Negative	101 (52)	84 (43.4)	16 (8.2)	1 (0.5)
	Positive	93 (48)	77 (39.7)	16 (8.2)	0 (0)
$p= 0.97$; $\tau= 0.003$					
HER-2 status (n=188)	Negative	151 (80.3)	125 (66.5)	26 (13.8)	0 (0)
	Enriched	37 (19.7)	30 (16)	6 (3.2)	1 (0.5)
$p= 0.765$; $\tau= 0.023$					
p53 (n=176)	Wild	107 (60.8)	88 (50)	19 (10.8)	0 (0)
	Mutated	69 (39.2)	59 (33.5)	9 (5.1)	1 (0.6)
$p= 0.595$; $\tau= -0.039$					
LN commitment (n=193)	Negative	94 (48.7)	78 (40.4)	15 (7.8)	1 (0.5)
	Positive	99 (51.3)	82 (42.5)	17 (8.8)	0 (0)
$p= 0.995$; $\tau= 0.000$					

Kendall's Tau test (τ); *Value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. BC: breast cancer; ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; LP: lymph node.

Discussion

In this study, we observed an association of GA and AA genotypes (PD-1 7146 G>A) with BC susceptibility, suggesting that individuals who inherited at least one copy of the variant allele A are more susceptible for BC than individuals with GG genotype.

The PD-1 7146 G>A polymorphism is a single nucleotide polymorphism (SNP) at nucleotide 7146 in the PD-1 intron 4, in which a guanine (G) changes to an adenine (A). A region of PD-1 intron 4 was described as an enhancer-like structure containing binding sites for several transcription factors (PROKUNINA *et al.*, 2002). Some studies have shown that this SNP in this region disrupts the binding site of the runt-related transcription factor 1 (RUNX1) and may alter the transcriptional regulation and the expression of PD-1 gene (PROKUNINA *et al.*, 2002; KRONER *et al.*, 2005). This alteration of expression is suggested to influence on PD-1 signaling efficiency, causing an impairment on PD-1 inhibitory effect over T cells, thus, resulting in augmented lymphocyte activity on A allele carriers (PROKUNINA *et al.*, 2002).

Some studies have investigated the occurrence and correlation of this polymorphism on cancer, including BC (HAGHSHENAS *et al.*, 2011; KARAMI *et al.*, 2020), thyroid cancer (TC) (HAGHSHENAS *et al.*, 2017) and colorectal cancer (CRC) (YOUSEFI *et al.*, 2013), all on Iranian patients hepatocellular cancer (HCC) on Turkish population (BAYRAM *et al.*, 2012), chronic lymphocytic leukemia (CLL) on Polish population (GRZYWNOWICZ *et al.*, 2015) and non-small cell lung cancer (NSCLC) on Han Chinese patients (MA *et al.*, 2015) and on Iranian population (PIRDELKHOSH *et al.*, 2018). Furthermore, other studies have also investigated other diseases, such as rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) on Egyptian patients (IBRAHIM and ABDELGHANI, 2018), SLE on Spanish population (FERREIROS-VIDAL *et al.*, 2004) and on Taiwanese population (WANG *et al.*, 2006) and multiple sclerosis (MS) on Polish patients (PAWLAK-ADAMSKA *et al.*, 2017), among other studies.

However, no significant association was found for BC, TC, HCC and NSCLC on the studies mentioned above. In contrast, it was observed a significant association of PD-1 7146 AA genotype in CRC, indicating a higher risk of developing CRC on carriers of A allele (YOUSEFI *et al.*, 2013). Regarding the auto-immune and inflammatory immune-mediated diseases, a significant correlation between A allele carriers and RA and SLE were observed, indicating this SNP as influential on

autoimmune diseases development risk (IBRAHIM and ABDELGHANI, 2018).

During a first contact between cytotoxic T cells and tumor cells, the interaction between TCR and MHC-I results in a strong cytotoxic response, characterized by the production of cytotoxic cytokines, such as IL-15, IFN γ and TNF, by the T cell, followed by tumor cell lysis. However, after T cell activation and strong antitumor response, exhaustion due to increase PD-1/PD-L1 binding occurs. In addition to the impairment of TCR/MHC-I signal cascade by PD-1/PD-L1 binding, the production of IFN γ by the T cell during antitumor response induces an increase of PD-L1 expression on the tumor cell, contributing to the tumor cell mechanism of protection against cytotoxicity response (DRIESSENS; KLINE; GAJEWSKI, 2009; BERTUCCI *et al.*, 2015; HU; HUANG; FAN, 2017).

The influence of the 7146 G/A SNP on PD-1 expression and the precise mechanisms impaired by it have not been clarified yet. However, there is a possible explanation for the increased risk of breast cancer. Hence, it could conceivably be hypothesised that allele A carriers may have a stronger cytotoxic response at the beginning of antitumor immune activity due to impaired PD-1 expression, which turns out to have the opposite effect latter on the disease, favouring PD-L1 expression on tumor cells, thus, tumor evasion of immune response (Figure 1).

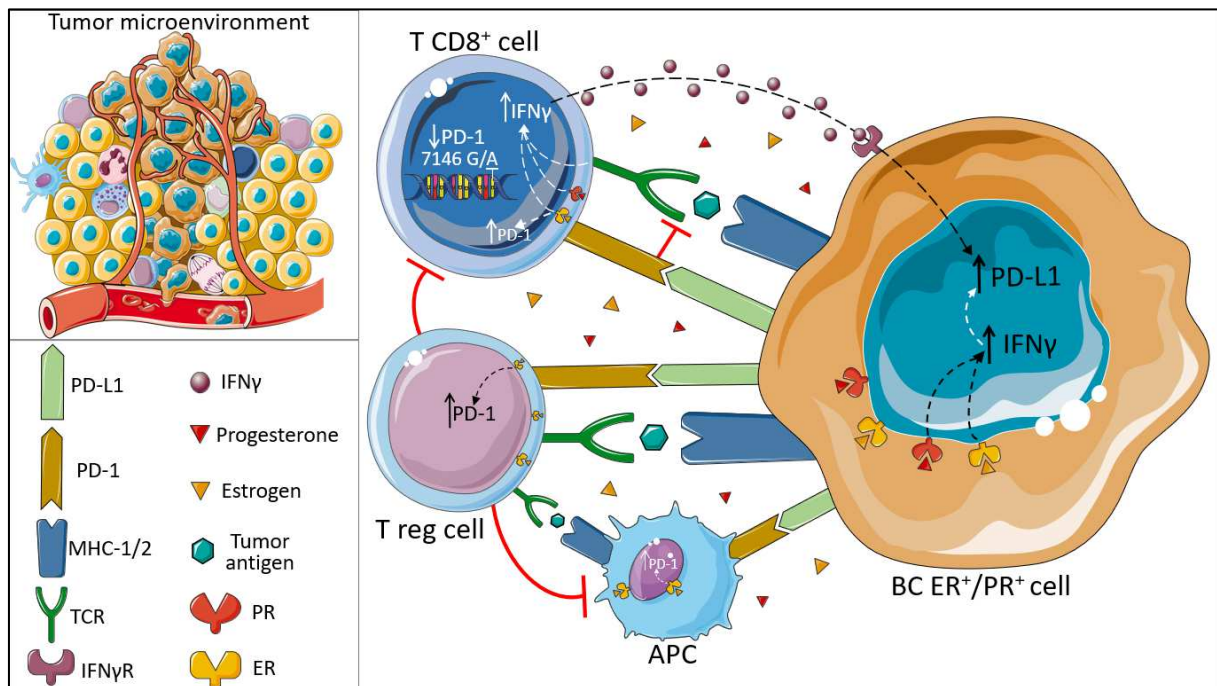


Figure 1. Possible mechanisms involving PD-1 on BC tumor microenvironment. PD-1 7146 A allele may downregulate PD-1 expression on T CD8⁺ cells and APCs in the beginning of cytotoxic response. Estrogen possibly upregulates PD-1 expression through ER α transcription factor activity on *PDCD1* gene. Estrogen also upregulates IFN γ expression and secretion, leading to increased PD-L1 expression. Progesterone upregulates IFN γ expression and secretion, indirectly upregulating PD-L1 expression. Figure designed by the authors.

Despite the absence of correlation between the PD-1 7209 C>T SNP and breast cancer in our study, other studies investigating other diseases have been done: Kawasaki disease (KD) on South Korean population (CHUN *et al.*, 2010), Acute Anterior Uveitis (AAU) on Han Chinese patients (LI *et al.*, 2019), multiple myeloma (MM) on Japanese population (KASAMATSU *et al.*, 2020), Chronic hepatitis B virus (HBV) infection (CH-HBV) (ZHENG *et al.*, 2010) and RA (TSENG *et al.*, 2019), both on Han Chinese population, cutaneous melanoma (CM) on Brazilian patients (GOMEZ *et al.*, 2018), CLL on Polish population (GRZYWNOWICZ *et al.*, 2015) and LES on a Taiwanese patients (WANG *et al.*, 2006).

The PD-1 7209 C>T SNP is also located in intron 4, near NFκB and RUNX1 binding sites. It is suggested that the change of C to T affects the binding affinity of these transcription factors, leading to lower expression of PD-1 (PROKUNINA *et al.*, 2002; TSENG *et al.*, 2019). In our study, no association between 7209 C>T and BC was observed. Wang *et al.* observed higher frequencies of CC genotype and C allele on the SLE population studied (WANG *et al.*, 2006). In contrast, Chun *et al.* had higher T allele frequency on the KD group studied (CHUN *et al.*, 2010). Gomez *et al.* also observed that T allele carriers is associated with higher risk for CM (GOMEZ *et al.*, 2018).

This result may be explained by the fact that the contribution and influence of SNPs to risk of diseases depend on the population studied and the pathogenesis and etiology of the disease (BAYRAM *et al.*, 2012). Therefore, we consider necessary more studies regarding different diseases on different populations to validate the possible role of 7209 C>T as a disease biomarker, particularly on BC.

According to our knowledge, this is the first study that found correlation between PD-1 7146 G>A SNP and hormonal status on breast cancer. The studies of Haghshenas *et al.* and Karami *et al.* found no correlation between PD-1 7146 G>A polymorphism and ER nor PR status on BC (HAGHSHENAS *et al.*, 2011; KARAMI *et al.*, 2020). Karami *et al.* observed only a correlation between this polymorphism and tumor grade and stage (KARAMI *et al.*, 2020).

Uhercik *et al.* evaluated PD-1 transcript expression levels in a clinical cohort of BC patients. Transcript expression levels of PD-1 were found to be significantly higher in tumor tissue in comparison to normal adjacent tissue (UHERICIK *et al.*, 2017). In addition, mRNA expressions of PD-1 and its ligand PD-L1 were observed to be up-regulated in breast cancer tissues (GATALICA *et al.*, 2014). However, these findings did not correlate with the ER or PR status.

It is well known that estrogen and ER signaling promote cancer on ER+ BC. However, the expression and signaling of ER correlate with better prognosis and survival rate, due to available drugs used to target and block ERs, such as tamoxifen. Estrogen effects are tissue-specific and dependent on which type of ER it binds to (WANG *et al.*, 2011; NAVARRO, *et al.*, 2018).

There are two canonic estrogen receptors, ER α and ER β , and both have very different signaling pathways (RICH *et al.*, 2002; DAI *et al.*, 2009). ER α upregulates cell cycle progression and antiapoptotic genes. On the other hand, ER β induces cell cycle arrest, contradicting ER α signaling. It is suggested that high estrogen levels on tumor microenvironment regulates antitumor immunity by the enhancement of PD-1 expression on many types of APCs, T cells and B cells (POLANCZYK *et al.*, 2006; DIECI *et al.*, 2016). Estrogen can modulate PD-1 expression by binding to its receptor ER α , which acts as a transcriptional factor, upregulating PD-1 expression (Figure 1).

Also, estrogen signaling modulates IFN γ expression and secretion in both human and mouse T cells (NAKAJIMA *et al.*, 2001; IKEDA, OLD, SCHREIBER, 2002) by enhancing IFN γ gene expression in CD8+ T cells (FOX; BOND; PARSLOW, 1991). IFN γ is known for its enhancement effect over PD-L1 gene, upregulating it.

According to these data, we can suggest that the correlation observed between PD-1 SNP 7146 G>A and ER status may rely on the antagonistic mechanisms described above. Despite the downregulation A allele possibly has over PD-1 gene, estrogen signaling may overlay it, regulating directly the upregulation of PD-1 on T cells and APCs – through ER α transcription factor functionality - and also by enhancing IFN γ secretion, adding to the IFN γ T cell secretion during antitumor response, favouring tumor evasion. The possible mechanism involving PD-1 on BC tumor microenvironment is shown in Figure 1.

Regarding the PR status, no other studies have observed a correlation between PD-1 7146 G>A polymorphism and PR positive breast cancer samples. However, this result has not previously been described. Fang *et al.* observed that PR-positive breast cancer patients had elevated levels of PD-1 expression than PR-negative patients (FANG *et al.*, 2018).

The relationship between progesterone/PR and PD-1 is not as well described and comprehended as it is for estrogen/ER. However, studies regarding

progesterone effects over immune cells have been done, mainly on pregnancy murine models (ZOUMPOULIDOU *et al.*, 2004; KERSH *et al.*, 2006) and pregnant women (YAO *et al.*, 2017). Zoumpoulidou *et al.* observed that, indirectly, elevated progesterone levels lead to an increase of IFN γ expression and secretion (ZOUMPOULIDOU *et al.*, 2004). Also, it is known that IFN γ gene suffers rapidly demethylation upon antigen recognition via TCR on memory T CD8 $^{+}$ cells (KERSH *et al.*, 2006).

As mentioned before, IFN γ stimulates PD-L1 expression by tumor cells, leading to and antitumor activity resistance. Thus, we propose a possible relationship between progesterone and impaired cytotoxic antitumor response due to indirect signaling mechanisms involving IFN γ (Figure 1). Undoubtedly, further studies are essential to elucidate these possible connections on breast cancer and how they impact on disease risk and prognosis.

These findings, while preliminary, suggest that PD-1 7146 G>A may be considered as a potential marker of susceptibility and prognostic for ER $^{+}$ /PR $^{+}$ BC.

Conflict of Interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Londrina State University Coordination for Post-Graduation (PROPPG-UEL). The authors wish to express their gratitude to Fundação Araucária do Paraná and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

BAYRAM, S. *et al.*. Lack of an association of programmed cell death-1 PD1.3 polymorphism with risk of hepatocellular carcinoma susceptibility in Turkish population: a case-control study. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 308-13, 2012.

BERTUCCI, F. *et al.*. The PD1/PDL1 axis, a promising therapeutic target in aggressive breast cancers. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 3, p. e1085148, 2015.

- CHUN, J. K. *et al.*. Programmed death-1 (PD-1) gene polymorphisms lodged in the genetic predispositions of Kawasaki Disease. **Eur J Pediatr**, v. 169, n. 2, p. 181-5, 2010.
- DAI, S. Y. *et al.*. Unique ligand binding patterns between estrogen receptor alpha and beta revealed by hydrogen-deuterium exchange. **Biochemistry**, v. 48, n. 40, p. 9668-76, 2009.
- DIECI M. V. *et al.*. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? **Cancer Treat Rev**, v. 46, p. :9-19, 2016.
- DONG, W. *et al.*. Programmed Cell Death-1 Polymorphisms Decrease the Cancer Risk: A Meta-Analysis Involving Twelve Case-Control Studies. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152448, 2016.
- DRIESSENS, G., KLINE, J., GAJEWSKI, T. F. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. **Immunol Ver**, v. 229, n. 1, p. 126-44, 2009.
- FANG, J. *et al.*. Diagnostic value of PD-1 mRNA expression combined with breast ultrasound in breast cancer patients. **Ther Clin Risk Manag**, v. 14, p. 1527-1535, 2018.
- FERREIROS-VIDAL, I., GOMEZ-REINO, J. J., BARROS, F., *et al.*. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, 50(8), 2590–2597, 2004.
- FOX, H. S., BOND, B. L., PARSLow, T. G. Estrogen regulates the IFN γ promoter. **J Immunol**, v. 146, n. 12, p. 4362-67, 1991.
- GANDINI, S.; MASSI, D.; MANDALÀ, M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 100, pp. 88-98, 2016.
- GATALICA, Z. *et al.*. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 23, n. 12, p. 2965-70, 2014.
- GOMEZ, G. V. B. *et al.*. PDCD1 gene polymorphisms as regulators of T-lymphocyte activity in cutaneous melanoma risk and prognosis. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 31, n. 2, p. 308-17, 2018.
- GRZYWNOWICZ, M. *et al.*. The function of a novel immunophenotype candidate molecule PD-1 in chronic lymphocytic leukemia. **Leuk Lymphoma**, v. 56, n. 10, p. 2908-13, 2015.
- HAGHSHENAS, M.R. *et al.*. Program death 1 (PD1) haplotyping in patients with breast carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 6, p. 4205-10, 2011.

- HAGHSHENAS, M. R. *et al.*. Association of PDCD1 gene markers with susceptibility to thyroid cancer. **J Endocrinol Invest**, v. 40, n. 5, p. 481-86, 2017.
- HU, X., HUANG, W., FAN, M. Emerging therapies for breast cancer. **J Hematol Oncol**, v. 10, n. 98, 2017.
- IBRAHIM, W. S. e ABDELGHANI, S. E. Programmed cell death 1 gene polymorphism association with activity and severity of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in Egyptian patients. **Tanta Medical Journal**, v. 46, n. 3, p. 225–31, 2018.
- ISHIDA, Y. *et al.*. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO J**, v. 11, p. 3887–95, 1992.
- KARAMI, S. *et al.*. Evaluating the Possible Association between PD-1 (Rs11568821, Rs2227981, Rs2227982) and PD-L1 (Rs4143815, Rs2890658) Polymorphisms and Susceptibility to Breast Cancer in a Sample of Southeast Iranian Women. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 21, n. 10, p. 3115-23, 2020.
- KASAMATSU, T. *et al.*. PDCD1 and PDCD1LG1 polymorphisms affect the susceptibility to multiple myeloma. **Clin Exp Med**, v. 20, n. 1, p. 51-62, 2020.
- KERSH, E. N. *et al.*. Rapid demethylation of the IFN-gamma gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. **J Immunol**, v.176, n. 7, p. 4083-93, 2006.
- KRONER, A. *et al.*. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 58, p. 50–7, 2005.
- LEE, S. H. *et al.*. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. **Arthritis Res Ther**, v. 8, p. R163, 2006.
- LI, Y. *et al.*. PD-1 Polymorphisms Are Associated with Susceptibility of Acute Anterior Uveitis in Chinese Population. **DNA and Cell Biology**, v. 38, n. 2, p. 1-8, 2019.
- MA, Y. *et al.*. Polymorphisms of co-inhibitory molecules (CTLA-4/PD-1/PD-L1) and the risk of non-small cell lung cancer in a Chinese population. **Int J Clin Exp Med**, v. 8, n. 9, p.16585-91, 2015.
- NAKAJIMA, C. *et al.*. A role of interferongamma (IFN-gamma) in tumor immunity: T cells with the capacity to reject tumor cells are generated but fail to migrate to tumor sites in IFN-gamma-deficient mice. **Cancer Res**, v. 61, n. 8, p. 3399-3405, 2001.
- PAWLAK-ADAMSKA, E. *et al.*. PD-1 gene polymorphic variation is linked with first symptom of disease and severity of relapsing-remitting form of MS. **J Neuroimmunol**, v. 305, p. 115-27, 2017.

- PIRDELKHOSH, Z. *et al.*. Investigation of Programmed Cell Death-1 (PD-1) Gene Variations at Positions PD1.3 and PD1.5 in Iranian Patients with Non-small Cell Lung Cancer. **Middle East Journal of Cancer**, v. 9, n. 1, p. 13-7, 2018.
- POLANCZYK, M. J. *et al.*. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. **J Neurosci Res**, v. 84, p. 370-8, 2006.
- PROKUNINA, L. *et al.*. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. **Nature Genetics**, v. 32, n. 4, p. 666-9, 2002.
- RICH, R. L. *et al.*. Kinetic analysis of estrogen receptor/ligand interactions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 13, p. 8562-67, 2002.
- IKEDA, H., OLD, L. J., SCHREIBER, R. D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 13, n. 2, p. 95-109, 2002.
- SOBIN, L. H., GOSPODAROWICZ, M. K., WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**, 7 ed., 2009.
- SUNG, H. *et al.*. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 2020.
- SYN, N. L., *et al.*. "De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting". **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 12, p. e731–41, 2017.
- TSENG, C. C. *et al.*. Genetic and epigenetic alteration of the programmed cell death 1 in rheumatoid arthritis. **Eur J Clin Invest**, v. 49, n. 10, p. e13094, 2019.
- UHERCIK, M. *et al.*. Clinical Significance of PD1 and PDL1 in Human Breast Cancer. **Anticancer Res**, v. 37, n. 8, p. 4249-54, 2017.
- WANG, S. C., CHEN, Y. J., OU, T. T., *et al.*. Programmed Death-1 Gene Polymorphisms in Patients With Systemic Lupus Erythematosus in Taiwan. **Journal of Clinical Immunology**, v. 26, n. 6, p. 506–11, 2006.
- WANG, C. *et al.*. Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. **Mol Endocrinol**, v. 25, n. 9, p.1527-38, 2011.
- WEBER, J. Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer -- preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. **Semin Oncol**, v. 37, p. 430-39, 2010.

- YAO, Y. *et al.* Progesterone impairs antigen-non-specific immune protection by CD8 T memory cells via interferon- γ gene hypermethylation. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 11, p. e1006736, 2017.
- YOUSEFI, A. R. *et al.* PD-1 Gene Polymorphisms in Iranian Patients With Colorectal Cancer. **Laboratory Medicine**, v.44, n. 3, p. 241–4, 2013.
- ZHENG, L. *et al.* Association Between Hepatitis B Viral Burden in Chronic Infection and a Functional Single Nucleotide Polymorphism of the PDCD1 Gene. **J Clin Immunol**, v. 30, p. 855-60, 2010.
- ZOUMPOULIDOU, G. *et al.* Convergence of interferon-gamma and progesterone signaling pathways in human endometrium: role of PIASy (protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription-y). **Mol Endocrinol**, v. 18, n. 8, p.1988-99, 2004.

6 CONCLUSÃO

- ✓ Foi encontrada uma associação significativa do alelo A do polimorfismo 7146 G>A com risco do câncer de mama.
- ✓ O alelo A do polimorfismo 7146 G>A mostrou correlação positiva com receptores de estrógeno ($\tau = 0,25$; $p = 0,00$) e progesterona ($\tau = 0,17$; $p = 0,021$) nas amostras de câncer de mama.
- ✓ O polimorfismo PD-1 7209 C>T não foi correlacionado com risco do câncer de mama bem como os parâmetros prognósticos das pacientes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S. *et al.*. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triplenegative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. **J Clin Oncol**, v. 32, p. 2959–66, 2014.
- ALI, H. R. *et al.*. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12439 patients. **Annals of Oncology**, v. 25, p. 1536–43, 2014.
- BAYRAM, S. *et al.*. Lack of an association of programmed cell death-1 PD1.3 polymorphism with risk of hepatocellular carcinoma susceptibility in Turkish population: a case-control study. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 308-13, 2012.
- BRAY, F. *et al.*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.
- BOYLE, F.; FORBES, J. Breast cancer survivors. **Aust Fam Physician**, v. 37, n. 10, p. 791, 2008.
- CAROTENUTO, P. *et al.*. Triple negative breast cancer: from molecular portrait to therapeutic intervention. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 20, n. 1, p. 17-34, 2010.
- CHOY, J. O.; GIULIANO, A. E. **Câncer de Mama**. 15. Rio de Janeiro: 2014. 40.
- CIRQUEIRA, M. B. *et al.*. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, n. 10, p. 499-503, 2011.
- DANIEL, C. W.; SILBERSTEIN, G. B.; STRICKLAND, P. Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. **Cancer Res**, v. 47, n. 22, p. 6052-57, 1987.
- DAWSON, S. J.; PROVENZANO, E.; CALDAS, C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. **Eur J Cancer**, v. 45 Suppl 1, p. 27-40, 2009.
- DONG, W. *et al.*. Programmed Cell Death-1 Polymorphisms Decrease the Cancer Risk: A Meta-Analysis Involving Twelve Case-Control Studies. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152448, 2016.
- DUSHYANTHEN, S. *et al.*. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **BMC Med**. v. 13, p. 202, 2015.
- FERLAY, J. *et al.*. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.
- FERLAY, J. *et al.*. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-53, 2019.
- FERREIROS-VIDAL, I., GOMEZ-REINO, J. J., BARROS, F., *et al.*. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, 50(8), 2590–97, 2004.

FREEMAN, G. J. *et al.*. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med**, 192:1027–34, 2000.

FRIDMAN, W. H. *et al.*. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298-306, 2012.

FRIDMAN, W. H. *et al.*. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 344, p. 1-24, 2011.

GANDINI, S.; MASSI, D.; MANDALÀ, M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. **Crit Rev Oncol Hematol**, 100, pp. 88-98, 2016.

GHEBEH, H. *et al.*. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 190-8, 2006.

GOLDHIRSCH, A. *et al.*. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, v. 22, n. 8, p. 1736-47, 2011.

GOLUBICIC, I.; BOROJEVIC, N.; PAVLOVIC, T. Risk factors for breast cancer: is ionizing radiation among them? **J BUON**, v. 13, n. 4, p. 487-94, 2008.

HAGHSHENAS, M.R. *et al.*. Program death 1 (PD1) haplotyping in patients with breast carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 6, p. 4205-10, 2011.

HAGHSHENAS, M. R. *et al.*. Association of PDCD1 gene markers with susceptibility to thyroid cancer. **J Endocrinol Invest**, v. 40, n. 5, p. 481-86, 2017.

HARVEY, J. M. *et al.*. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 5, p. 1474-81, 1999.

HASLAM, S. Z. The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones. **Endocrinology**, v. 125, n. 5, p. 2766-72, 1989.

HASLAM, S. Z. e SHYAMALA, G. Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal mammary gland. **Endocrinology**, v. 108, n. 3, p. 825-30, 1981.

HENDERSON, I. C. e PATEK, A. J. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 52, n. 1-3, p. 261-88, 1998.

HUANG, Y. *et al.*. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17462-78, 2015.

IARC, I. a. F. R. O. C. **Monographs of Carcinogenic Risks to Humans and Handbooks of Cancer Prevention**. 2015.

IARC, I. a. F. R. O. C. **List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans**. 2016.

INCA, I. N. D. C. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: 171 p. 2015

INCA, I. N. D. C. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 122 p. 2019.

INCA, I. N. D. C. **Estatísticas de câncer 2020**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>> Acesso em 15 jan. 2021.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública** - Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 1259-70, 2011.

ISHIDA, Y. *et al.*. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO J**, v. 11, p. 3887–95, 1992.

IWAI, Y. *et al.*. "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12293–7, 2002.

JANSSEN, E. M. *et al.*. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. **Nature**, v. 421, n. 6925, p. 852-6, 2003.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T–cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1792. 2015

KARIM, R. *et al.*. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1+ T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 20, p. 6341-7, 2009.

KEIR, M. E. *et al.*. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 677–704, 2008.

KROEMER, G. *et al.*. Natural and therapy induced immunosurveillance in breast cancer. **Nat Med**, v. 21, p. 1128–38, 2015.

KRONER, A. *et al.*. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. **Ann Neurol**, v. 58, p. 50–7, 2005.

KUREBAYASHI, J. Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. **Breast Cancer**, v. 16, n. 4, p. 275-80, 2009.

LATCHMAN, Y. *et al.*. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat Immunol**, v. 2, n. 3, p. 261-8, 2001.

LEE, S. H. *et al.*. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. **Arthritis Res Ther**, v. 8, p. R163, 2006.

LESTERHUIS, W. J., STEER, H., LAKE, R. A. PD-L2 is predominantly expressed by Th2 cells. **Mol Immunol**, v. 49, p. 1–3, 2011.

- LIU, S. M. *et al.*. Expression and significance of B7-H1 and its receptor PD-1 in human gastric carcinoma. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 30, n. 3, p.192–5, 2008.
- LOI, S. *et al.*. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicinbased chemotherapy: BIG 02-98. **J Clin Oncol**, v. 31, p. 860–67, 2013.
- LOI, S. *et al.*. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple-negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. **Ann Oncol**, v. 25, p. 1544–50, 2014.
- LUEN, S. *et al.*. The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. **Breast**, v. 29, p. 241–50, 2016.
- LUEN, S. J. *et al.*. Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. **Lancet Oncol**, v. 18, p. 52–62, 2017.
- MAEGAWA, R. O. e TANG, S. C. Triple-negative breast cancer: unique biology and its management. **Cancer Invest**, v. 28, n. 8, p. 878-83, 2010.
- MAUGHAN, K.L., LUTTERBIE, M.A. e HAM, P.S. Treatment of Breast Cancer. **American Family Physician**, v. 81, n. 11, p. 1339-46, 2010.
- MAHMOUD, S. M. *et al.*. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Res Treat**, v. 132, p. 545–553, 2012.
- MCADAM, A. J., SCHWEITZER, A. N. & SHARPE, A. H. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. **Immunol. Rev**, v. 165, p. 231–47, 1998.
- MIGALI, C. *et al.*. Strategies to modulate the immune system in breast cancer: checkpoint inhibitors and beyond. **Ther Adv Med Oncol**, v. 8, p. 360–74, 2016.
- MOSTOWSKA, M. *et al.*. The programmed cell death 1 gene 7209 C>T polymorphism is associated with the risk of systemic lupus erythematosus in the Polish population. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 26, p. 457-60, 2008.
- OHIGASHI, Y. *et al.*. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 8, p. 2947-53, 2005.
- PARKER, J. S. *et al.*. Supervised risk predictor of breast cancer based on Intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**, v. 27, p. 1160–7, 2009.
- PICCART-GEBHART, M. J. New developments in hormone receptor-positive disease. **Oncologist**, v. 15 Suppl 5, p. 18-28, 2010.
- PROKUNINA, L. *et al.*. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. **Nature Genetics**, v. 32, n. 4, p. 666–9, 2002.

- PRUNERI, G. *et al.*. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a powerful prognostic marker in patients with triple-negative breast cancer enrolled in the IBCSG phase III randomized clinical trial 22-00. **Breast Cancer Res Treat**, v. 158, p. 323–31, 2016.
- RODIG, N. *et al.*. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8 β T cell activation and cytotoxicity. **Eur J Immunol**, v. 33, p. 3117–26, 2003.
- SAKAGUCHI, S. *et al.*. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 490-500, 2010.
- SALMANINEJAD, A., KHORAMSHAHI, V., AZANI, A., *et al.*. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. **Immunogenetics**, v. 70, n. 2, p. 73–86, 2017.
- SAVAS, P. *et al.*. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 13, n. 4, p. 228–41, 2016.
- SCHMID, P. *et al.*: Atezolizumab in metastatic TNBC: Long-term clinical outcomes and biomarker analysis. **2017 AACR Annual Meeting**. Abstract 2986. 2017.
- SOBIN, L. H., GOSPODAROWICZ, M. K., WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. 7 ed., 2009.
- SOLIMAN, H. nab-Paclitaxel as a potential partner with checkpoint inhibitors in solid tumors. **Onco Targets Ther**, v. 10, p. 101–12, 2017.
- SORLIE, T. *et al.*. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, 2001.
- SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-75, 2004.
- SPELLMAN, A. e TANG, S. C. Immunotherapy for breast cancer: past, present, and future. **Cancer Metastasis Rev**, v. 35, p. 525–46, 2016.
- STIVAL, R. S. M.; PRESTES, A. L. D. O.; MANSANI, F. P. Câncer de mama em mulheres jovens: uma análise do estadiamento clínico inicial e dos subtipos moleculares dos tumores. **Rev Bras Mastologia - Ponta Grossa**, v. 24, n. 1, p. 17-22, 2014.
- SWOBODA, A. e NANDA, R. Immune Checkpoint Blockade for Breast Cancer. **Cancer Treat Res**, v. 173, p. 155-65, 2018.
- SYN, N. L., *et al.*. "De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting". **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 12, p. e731–41, 2017.
- TRICHOPOULOS, D. *et al.*. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int J Cancer**, v. 122, n. 3, p. 481-5, 2008.
- VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659-72, 2007.

VINAY, D. S. *et al.*. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Semin Cancer Biol**, 2015.

WANG, S. C., CHEN, Y. J., OU, T. T., *et al.*. Programmed Death-1 Gene Polymorphisms in Patients With Systemic Lupus Erythematosus in Taiwan. **Journal of Clinical Immunology**, v. 26, n. 6, p. 506–11, 2006.

WEBER, J. Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer -- preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. **Semin Oncol**, v. 37, p. 430-39, 2010.

WEIN, L. *et al.*. Checkpoint blockade in the treatment of breast cancer: current status and future directions. **Br J Cancer**, v. 119, p. 4–11, 2018.

WHO, W. H. O. **Breast cancer: prevention and control**. 2015.

WITTLIFF, J. L. Steroid-hormone receptors in breast cancer. **Cancer**, v. 53, n. 3 Suppl, p. 630-43, 1984.

YAQUB, S. e AANDAHL, E. M. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. **Crit Rev Oncog**, v. 15, n. 1-2, p. 43-63, 2009.

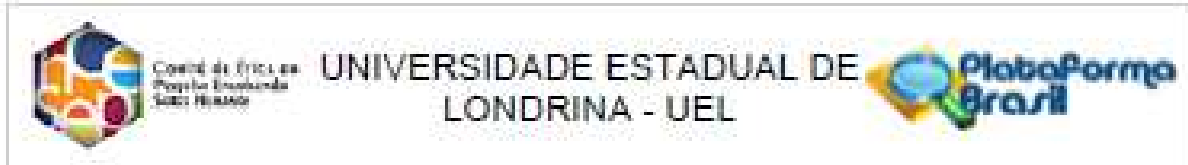
Yearley, J. H. *et al.*. PD-L2 Expression in Human Tumors: Relevance to Anti-PD-1 Therapy in Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 23, n. 12, p. 3158-67, 2017.

ZHENG, L., Li, D., WANG, F., *et al.*. Association Between Hepatitis B Viral Burden in Chronic Infection and a Functional Single Nucleotide Polymorphism of the PDCD1 Gene. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 6, p. 855–60, 2010.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da
Universidade Estadual de Londrina



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos no Câncer

Pesquisador: Maria Angelica Ehara Watanabe

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 8

CAAE: 73657317.0.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.535.917

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo vinculado ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental/UEL. Segundo a pesquisadora o câncer ocorre decorrente da proliferação descontrolada das células devido a vários fatores, sejam eles ambientais ou genéticos, que podem culminar com invasão tecidual próxima ao tumor primário ou até mesmo o desenvolvimento de metástases. Trata-se de uma doença complexa, heterogênea, e sua evolução é dependente da interação tumor-hospedeiro. O conhecimento sobre os diferentes tipos de tumores tem sido muito explorado mas o grande desafio da oncologia tem sido o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem estes tumores malignos. Dentro deste contexto, os aspectos imunológicos, moleculares e epigenéticos, das citocinas e dos receptores de quimiocinas e receptores de citocinas, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização foram os temas escolhidos para serem abordados neste projeto, uma vez que todos estes parâmetros podem ter relevância clínica e também constituem alvos promissores que no futuro podem ser valiosos na avaliação do prognóstico e no delineamento terapêutico. A pesquisa será realizada no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da UEL. Serão selecionadas um total de 1150 amostras provenientes do Hospital de Câncer de Londrina: - 300 Amostras de tecido normal e tumoral de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep088@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Científica
Júlio Riberton

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 3.535.917

laringe, câncer colorretal, meduloblastoma, neuroblastoma e tumor adrenocortical. A realização do ensaio de Imuno-histoquímica. No grupo caso serão incluídas todos os pacientes que tiverem diagnóstico para câncer de mama, câncer laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos. E no grupo controle serão incluídos indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e infecções. Serão excluídos pacientes com doenças infecciosas ou autoimunes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a presença dos polimorfismos genéticos, expressão gênica e expressão proteica do fator de transcrição FOXP3, das citocinas TGF β 1, IL10, IL12A, IL35 IL1 β , TNF α e INF γ , das quimiocinas CXCL12 e CCL5, das proteínas SMAD, IGF1, CTLA4, dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQO1, GSTT1 e GSTM1, no tecido tumoral e normal, e no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama, laringe e colorretal e nos tumores pediátricos.

Objetivos Secundários:

- Detectar a presença dos polimorfismos genéticos do FOXP3, TGF, IL10, IL12A, IL35 IL1 β , TNF α e INF gama, das quimiocinas CXCL12 e CCL5 dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQO1, GSTT1 e GSTM1 nos DNAs extraídos do câncer de mama, câncer

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora o risco que os participantes da pesquisa podem ter neste projeto é quanto ao desconforto na hora da coleta de sangue periférico, porém a coleta será efetuada por profissional habilitado seguindo-se todas as normas de biossegurança, e caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos coletores responsáveis. O estudo não trará benefícios diretos aos participantes, mas pretende-se obter marcadores que possam fornecer subsídios adicionais de auxílio prognóstico e delineamento terapêutico de pacientes com câncer de mama, câncer laringe e cancercolorretal e tumores pediátricos. Espera-se também obter uma integração maior entre as instituições colaboradoras, Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina. O envolvimento de pesquisadores colaboradores permitirá a formação de profissionais qualificados para atuarem nas áreas de Imunologia e Genética do câncer, disseminando o conhecimento. Pretende-se contribuir com um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos com a patogênese das doenças acima referidas e futuramente com a melhoria na qualidade de vida dos pacientes, através da inclusão de

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-670

E-mail: cep200@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisas Envolvendo
Serem Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 3.535.917

marcadores que, de alguma forma, possam ser aplicados futuramente na prática clínica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de oitava emenda de projeto aprovado. Cronograma de término do estudo é de **31/10/2023**.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Justificativa da Emenda:

O complexo sistema PD-L1 e PD-1 envolve receptores e ligantes que participam do controle da ativação de células T. PD-L1 é normalmente expresso em células T, células B, células dendríticas, macrófagos, célulastronco mesenquimais, mastócitos e outras células não-hematopoiéticas. A expressão de PD-L1 também ocorre em neoplasias humanas, auxiliando as mesmas em mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro. Sabe-se que vários polimorfismos nesta via estão associados a neoplasias, e é de grande valia a análise destes nestas amostras. As amostras utilizadas (DNA), para as análises desta emenda serão as mesmas do projeto intitulado "Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos no Câncer".

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresentá-lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1410306_É6.pdf	07/08/2019 16:06:11		Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 88.057-070

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisa Científica
3330, Itaipava

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 3.535.917

Outros	Adendo_PDL1.docx	07/08/2019 15:57:52	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	Adendo_KRAS_EGFR.pdf	23/01/2019 15:22:12	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_controles_saudaveis_crianças.pdf	25/04/2018 10:45:26	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_TCLE_crianças.pdf	25/04/2018 10:44:43	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_pacientes_adultos.pdf	25/04/2018 10:43:35	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	25/04/2018 10:42:37	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_anamnese.doc	09/04/2018 14:04:18	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	anamnese.doc	09/04/2018 14:00:50	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	adendo_APOBEC.pdf	08/03/2018 22:07:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	Emenda.docx	29/11/2017 16:03:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	24/07/2017 16:01:36	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Cronograma	9_cronograma.pdf	18/07/2017 15:57:53	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8_Projeto_Cancer_2017.pdf	18/07/2017 15:30:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	6_Declaracao_HCL.pdf	18/07/2017 15:29:55	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	7_Termo_responsabilidade_coleta.pdf	18/07/2017 15:24:58	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	5_Termo_de_Confidencialidade_e_Sigilo.pdf	18/07/2017 15:22:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: LABECC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455

CEP: 89.057-070

E-mail: cep208@uel.br



Centro de Estudos em
Pesquisa Embrionária
2020 - 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Contribuição do Parecer: 3.035,917

Não

LONDRINA, 27 de Agosto de 2019

Assinado por:
Osvaldo Coelho Pereira Neto
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-070

E-mail: cep255@uel.br