



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANE RICCIARDI DA SILVA

**IMPLICAÇÕES DAS VARIANTES GENÉTICAS (RS822335 E
RS4143815) DO GENE DE PD-L1 NA SUSCETIBILIDADE E
PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA**

Londrina
2025

MARIANE RICCIARDI DA SILVA

**IMPLICAÇÕES DAS VARIANTES GENÉTICAS (RS822335 E
RS4143815) DO GENE DE PD-L1 NA SUSCETIBILIDADE E
PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Karen Brajão de Oliveira.

Londrina
2025

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

Ricciardi da Silva, Mariane.

Implicações das variantes genéticas (rs822335 e rs4143815) do gene de PD-L1 na suscetibilidade e prognóstico do câncer de mama / Mariane Ricciardi da Silva. - Londrina, 2025.
72 f. : il.

Orientador: Karen Brajão de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Ligante de morte programada-1 - Tese. 2. Prognóstico - Tese. 3. Haplótipo - Tese. 4. Proteínas de checkpoint imunológico - Tese. I. Brajão de Oliveira, Karen. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 577.27

MARIANE RICCIARDI DA SILVA

**IMPLICAÇÕES DAS VARIANTES GENÉTICAS (RS822335 E
RS4143815) DO GENE DE PD-L1 NA SUSCETIBILIDADE E
PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof.^a Dr.^a Karen Brajão de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 04 de setembro de 2025.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Karen, pela orientação, paciência e compreensão ao longo destes 6 anos no laboratório. Apesar de todos os percalços que tive durante o percurso você sempre esteve disponível, e espero que isso continue pelos próximos 4 anos no doutorado.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Roberta Losi Guembarovski e Prof. Dr. Glauco A. Freire Vitiello pelo aceite em avaliar ao trabalho e por todas as contribuições para seu aperfeiçoamento.

À minha família, em especial às pessoas que sempre me apoiaram e fizeram o possível para permitir que eu chegasse até aqui e realizasse meus sonhos, que são tão meus quanto deles.

Aos meus amigos, que mesmo estando em áreas diferentes foram meu alívio nos momentos mais estressantes, por mensagem, chamada de vídeo, jantares no RU, passeios aleatórios. Sem vocês, aposto que tudo seria muito mais difícil.

Às integrantes do laboratório que me ajudaram no desenvolvimento do trabalho, aos que vieram antes de mim e realizaram as coletas das amostras utilizadas, às equipes do Hospital do Câncer de Londrina e do Hospital das Clínicas da UEL, e a todas as mulheres que aceitaram participar do projeto. Sem a colaboração destas pessoas, a realização do trabalho não seria possível.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pela formação de excelência e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional oferecidas.

SILVA, Mariane Ricciardi da. **Implicações das variantes genéticas (rs822335 e rs4143815) do gene de PD-L1 na suscetibilidade e prognóstico do câncer de mama**. 2025. 72 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

RESUMO

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres no mundo e pode ser classificado em ao menos quatro diferentes subtipos moleculares, sendo eles: luminal A (LA), luminal B (LB), HER2 superexpresso (HER2+) e triplo negativo (TN), com os subtipos LA e TN considerados de prognósticos opostos, sendo LA o CM de prognóstico mais favorável, e TN classificado entre os mais agressivos. Apesar dos mecanismos do sistema imune para a eliminação de tumores, as células tumorais possuem como característica evolutiva o desenvolvimento de mecanismos de evasão imunológica. Os principais alvos de modulação pelos tumores incluem as moléculas de *checkpoint* imunológico, como o ligante de morte programada 1 (PD-L1) e seu receptor, a proteína de morte programada 1 (PD-1). O eixo PD-L1/PD-1 é essencial para suprimir a atividade de células T, atuando na manutenção da tolerância imunológica e no controle da inflamação. A expressão e função de PD-L1 pode ser influenciada pela presença de variantes genéticas, como as variantes de nucleotídeo único (SNVs). O gene que codifica PD-L1 é chamado *CD274*, e possui cerca de 20 SNVs indexadas na literatura, incluindo rs4143815G>C e rs822335T>C. A SNV rs4143815G>C localiza-se na região 3'UTR de *CD274*, enquanto rs822335T>C se encontra na região promotora do gene. Ambas já se correlacionaram com maior expressão de PD-L1, tornando-se alvos promissores de estudo para a melhor compreensão dos mecanismos de modulação de expressão de PD-L1, e de sua possível correlação com a suscetibilidade e o prognóstico do CM. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos rs4143815G>C e rs822335T>C de *CD274*, e seus haplótipos, em pacientes com CM, e entre os subtipos moleculares de prognósticos opostos mais frequentes dentro do grupo de amostras selecionado, LA e TN. Participaram do estudo 490 mulheres, divididas em dois grandes grupos: controle (n=198) e câncer (n=292), com o grupo câncer sendo subdividido em LA (n=182) LB (n=36), HER2+ (n=16) e TN (n=58). Foram utilizadas amostras de DNA armazenadas em biorrepositório e a genotipagem das SNVs foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). Apenas o polimorfismo rs822335T>C demonstrou associações significativas com os grupos estudados, sendo seu genótipo TT associado à maior suscetibilidade ao CMLA (OR: 2.091; IC 95%: 1.086-4.023; p=0.027) e seu genótipo CT associado à proteção para o CMTN (OR: 0.439; IC 95%: 0.231-0.832; p=0.012), quando comparadas ao grupo controle. Além disso, ao avaliar os modelos genéticos, o modelo dominante indicou que a presença do alelo T confere proteção para o desenvolvimento do CMTN (OR: 0.465; IC 95%: 0.254-0.851; p=0.013), e o modelo recessivo confirma o genótipo TT como fator de suscetibilidade para CMLA (OR: 2.319; IC 95%: 1.285-4.187; p=0.005). Na análise haplotípica, os resultados foram semelhantes: a presença do haplótipo C-G demonstra-se como fator protetor para CMLA (OR: 0.592; IC 95%: 0.361-0.971; p=0.038), e aumenta a suscetibilidade ao CMTN em aproximadamente 2,2 vezes (OR: 2.170; IC 95%: 1.151-4.092; p=0.017), enquanto a presença do haplótipo T-G diminui em 2,6 vezes a suscetibilidade ao CMTN (OR: 0.379; IC 95%: 0.185-0.778; p=0.008).

Este é o primeiro trabalho a avaliar estas SNVs em conjunto no contexto do CM, e demonstra a relação entre o alelo C e o genótipo CC de rs822335T>C, correlacionados com a maior expressão de PD-L1 em células tumorais, com a suscetibilidade ao CMTN - tumores que possuem prognóstico desfavorável e são muito imunogênicos, podendo ser favorecidos pelo aumento desta molécula no microambiente tumoral. Em adição, demonstramos a associação do alelo T e do genótipo TT, com o CMLA. Estes resultados podem contribuir para o melhor entendimento do papel de PD-L1 no CM.

Palavras-chave: Neoplasias de Mama Triplo Negativas; Ligante de Morte Programada 1; Prognóstico; Haplótipo; Proteínas de Checkpoint Imunológico.

SILVA, Mariane Ricciardi da. **Implications of genetic variants (rs822335 and rs4143815) from the PD-L1 gene in the susceptibility and prognosis of breast cancer.** 2025. 72 f. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most frequent malignant neoplasm in women worldwide and can be classified into at least four different molecular subtypes, namely: luminal A (LA), luminal B (LB), HER2-enriched (HER2+), and triple-negative (TN), with the LA and TN subtypes considered to have opposite prognoses — LA being the BC subtype with the most favorable prognosis, and TN classified among the most aggressive. Despite the immune system mechanisms for tumor elimination, tumor cells have evolved mechanisms for immune evasion. The main targets modulated by tumors include immune checkpoint molecules, such as programmed death-ligand 1 (PD-L1) and its receptor, programmed cell death protein 1 (PD-1). The PD-L1/PD-1 axis is essential for suppressing T cell activity, playing a role in maintaining immune tolerance and controlling inflammation. The expression and function of PD-L1 can be influenced by the presence of genetic variants, such as single nucleotide variants (SNVs). The gene encoding PD-L1 is called *CD274*, and about 20 SNVs are indexed in the literature, including rs4143815G>C and rs822335T>C. The SNV rs4143815G>C is located in the 3'UTR region of *CD274*, while rs822335T>C is found in an enhancer region within the gene promoter. Both have been correlated with higher PD-L1 expression, making them promising targets for study to better understand the mechanisms of PD-L1 expression modulation and their possible correlation with susceptibility and prognosis of BC. Therefore, the objective of this study was to evaluate the influence of the polymorphisms rs4143815G>C and rs822335T>C of *CD274*, and their haplotypes, in patients with and without BC, and among the most frequent molecular subtypes with opposite prognoses within the selected sample group, LA and TN. The study included 490 women divided into two major groups: control (n=198) and cancer (n=292), with the cancer group subdivided into LA (n=182), LB (n=36), HER2+ (n=16), and TN (n=58). DNA samples stored in a biorepository were used, and genotyping of the SNVs was performed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Only the polymorphism rs822335T>C showed significant associations with the studied groups, with the TT genotype associated with higher susceptibility to LABC (OR: 2.091; IC 95%: 1.086-4.023; p=0.027) and the CT genotype associated with protection against TNBC (OR: 0.439; IC 95%: 0.231-0.832; p=0.012), when compared to the control group. Furthermore, evaluating genetic models, the dominant model indicated that the presence of the T allele confers protection against the development of TNBC (OR: 0.465; IC 95%: 0.254-0.851; p=0.013), and the recessive model confirms the TT genotype as a susceptibility factor for LABC (OR: 2.319; IC 95%: 1.285-4.187; p=0.005). In the haplotypic analysis, results were similar: the presence of the C-G haplotype was protective against LABC (OR: 0.592; IC 95%: 0.361-0.971; p=0.038), and increased susceptibility to TNBC by 2.2 times (OR: 2.170; IC 95%: 1.151-4.092; p=0.017), whereas the presence of the T-G haplotype decreased susceptibility to TNBC by 2.6 times (OR: 0.379; IC 95%: 0.185-0.778; p=0.008). This is the first study to evaluate these SNVs jointly in the context of BC, demonstrating the relationship between the C allele and the CC genotype of

rs822335T>C, correlated with higher PD-L1 expression in tumor cells, with susceptibility to TNBC - tumors that have a poor prognosis and are highly immunogenic, possibly favored by increased levels of this molecule in the tumor microenvironment. Additionally, we demonstrated the association of the T allele and TT genotype with the BC subtype with better prognosis. These results may contribute to a better understanding of the role of PD-L1 in BC.

Key-words: Triple Negative Breast Neoplasms; Programmed Cell Death 1 Ligand 1; Prognosis; Haplotypes; Immune Checkpoint Proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação da anatomia e histologia de uma mama saudável e lâmina histológica de adenocarcinoma mamário	12
Figura 2 –	Representação esquemática da estrutura de PD-1 e PD-L1	17
Figura 3 –	Via canônica de sinalização do eixo PD-L1/PD-1	19
Figura 4 –	Mecanismo proposto para a via de sinalização intrínseca do eixo PD-L1/PD-1	20
Figura 5 –	Mecanismo proposto para a translocação nuclear de PD-L1 e suas ações	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína Quinase B
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células Apresentadoras de Antígeno)
BRCA	Gene <i>Breast Cancer</i>
C	Citosina
CD3 ζ	Cadeia Zeta da Proteína CD3
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupamento de Diferenciação)
CEL	Células Luminais
CEM	Células Mioepiteliais
c-Jun	Fator de Transcrição Jun
CM	Câncer de Mama
CMLA	Câncer de Mama Luminal A
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
C-SH2	<i>C-terminal Src Homology 2 domain</i> (Domínio de Homologia ao Src 2 C-terminal)
DCs	<i>Dendritic Cells</i> (Células Dendríticas)
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i> (Quinase Regulada por Sinal Extracelular)
FAC	Fibroblastos Associados ao Câncer
FACI	Fibroblastos Associados ao Câncer do Subtipo Inflamatório
FACM	Fibroblastos Associados ao Câncer do Subtipo Miofibroblástico
FIL	Fibroblastos Interlobulares
FL	Fibroblastos Lobulares
G	Guanina
Gas6	<i>Growth arrest-specific 6</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> (Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2)
HER2+	Subtipo HER2 Enriquecido
IFN- γ	Interferon Gama
IgC	Domínio Constante de Imunoglobulina
IgV	Domínio Variável de Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional de Câncer

ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif</i> (Motivo Inibitório de Imunorreceptor Baseado em Tirosina)
ITSM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-base Switch Motif</i> (Motivo de Troca do Imunorreceptor Baseado em Tirosina)
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
KPNB1	<i>Karyopherin subunit beta-1</i> (Subunidade Beta-1 da Carioferina)
LA	Subtipo Luminal A
LB	Subtipo Luminal B
MEC	Matriz Extracelular
MerTK	<i>Mer Tyrosine Kinase</i> (Tirosina Quinase Mer)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (Alvo da Rapamicina em Mamíferos)
miRNA	Micro RNA
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i> (Proteína 3 Contendo o Domínio de Pirina da Família de Receptores NOD)
nPD-L1	<i>Nuclear Programmed Death Ligand-1</i> (Ligante de Morte Programada 1 Nuclear)
N-SH2	<i>N-terminal Src Homology 2 domain</i> (Domínio de Homologia ao Src 2 N-terminal)
PD-1	<i>Programmed Death-1</i> (Proteína de Morte Programada 1)
PD-L1	<i>Programmed Death Ligand-1</i> (Ligante de Morte Programada 1)
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (Fosfatidilinositol 3-quinase)
PKR	Proteína Quinase R
Procr	<i>Protein C Receptors</i> (Receptores de Proteína C)
PTP	<i>Protein Tyrosine Phosphatase domain</i> (Domínio de Proteína Tirosina Fosfatase)
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RP	Receptor de Progesterona
SHP-2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2</i> (Fosfatase-2)

	Contendo Domínio de Homologia à Região 2 de Src)
SNV	<i>Single Nucleotide Variant</i> (Variante de Nucleotídeo Único)
Sp1	<i>Specificity protein 1</i> (Proteína de Especificidade 1)
sPD-L1	<i>Soluble Programmed Death Ligand-1</i> (Ligante de Morte Programada-1 Solúvel)
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> (Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3)
T	Timina
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor de célula T)
TEM	Transição Epitelial Mesenquimal
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator de Crescimento Transformador Beta)
T _H	Subtipos de resposta de células T <i>helper</i>
TN	Subtipo Triplo Negativo
UTR	<i>Untranslated region</i> (Região Não Traduzida)
YB-1	<i>Y-box binding protein-1</i> (Proteína de Ligação à Caixa Y 1)
ZAP70	<i>Zeta-Chain-Associated protein kinase 70</i> (Proteína Quinase 70 Associada à Cadeia Zeta)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Câncer de mama.....	11
1.2	Papel do sistema imune no desenvolvimento de tumores.....	15
1.3	Via de sinalização PD-L1/PD-1 e suas implicações no desenvolvimento do câncer	17
1.4	Polimorfismos genéticos e sua relação com a diversidade de respostas imunes.....	25
1.4.1	Gene <i>CD274</i> e suas variantes	26
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	REFERÊNCIAS	30
5	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	38
6	CONCLUSÃO	68
	ANEXOS.....	69
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/UEL.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres no mundo. No Brasil, as regiões Sul e Sudeste possuem as maiores taxas de incidência para a doença, e a previsão nacional de incidência de CM para cada ano do triênio 2023-2025 é de cerca de 42 casos por 100 mil mulheres, o que corresponde a cerca de 73 mil casos/ano (INCA, 2022). Assim como os demais cânceres, o CM é uma doença multifatorial e heterogênea, com ampla diversidade de respostas terapêuticas e manifestações clínicas, bem como diferentes assinaturas genéticas.

O fator de pré-disposição mais conhecido para o desenvolvimento de CM é a presença de mutações hereditárias em genes como *BRCA1* e *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *BRIP1*, entre outros, que apesar de precisamente descritas e relativamente bem compreendidas, representam apenas cerca de 10% de todos os casos de CM (HADDAD, 2020). Sendo assim, outros fatores genéticos, hormonais e ambientais podem influenciar no aparecimento dos tumores mamários. Dentre eles, destacam-se variações relacionadas ao estrogênio, seja endógeno ou exógeno, como as terapias de reposição hormonal, o uso prolongado de contraceptivos orais, menarca precoce e menopausa tardia, com o tempo de exposição sendo diretamente proporcional à probabilidade de desenvolvimento de CM. Demais fatores como obesidade e sobrepeso, ingestão crônica de álcool e tabagismo, também favorecem o desenvolvimento do CM (GARCÍA-SANCHA; CORCHADO-COBOS; PÉREZ-LOSADA, 2025; SCALA et al., 2023).

O CM pode ser classificado de duas formas principais: histologicamente e molecularmente, sendo a classificação histológica baseada nas características celulares, especialmente a origem celular, no tipo de secreção e na arquitetura tecidual, bem como na invasão ou não do estroma adjacente, dividindo os tumores mamários em dois subtipos principais: ductais ou lobulares (Figura 1), com alguns subtipos especiais (NASCIMENTO; OTONI, 2020). A classificação molecular desses tumores é baseada principalmente na expressão de marcadores avaliados por imunohistoquímica (GOLDHIRSCH et al., 2011; KING; MIR; SINGH, 2017). Molecularmente, os tumores são classificados principalmente com base na presença ou ausência dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP), do

receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) e do marcador indicativo de proliferação celular Ki-67 (NASCIMENTO; OTONI, 2020). Sendo assim, existem ao menos 4 subtipos moleculares de CM: luminal A (LA), luminal B (LB), HER2 enriquecido (HER2+) e triplo negativo (TN). Os critérios utilizados para a classificação estão indicados no Quadro 1.

Figura 1. Representação da anatomia e histologia de uma mama saudável e lâmina histológica de adenocarcinoma mamário.

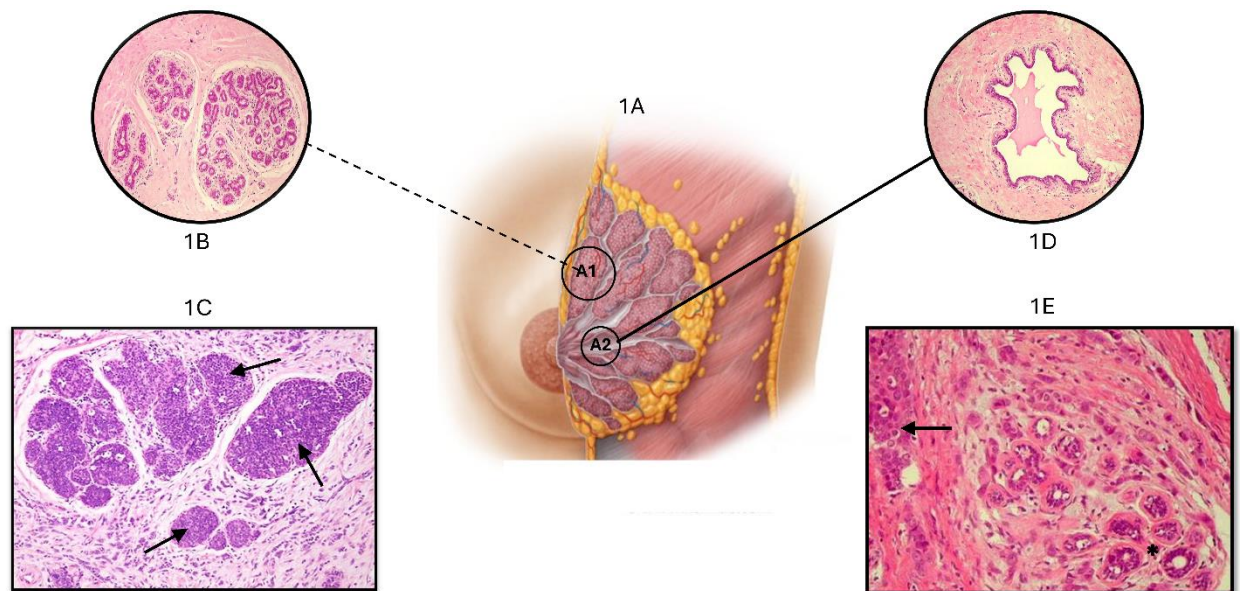


Figura 1. Representação esquemática da anatomia mamária (1A), indicando em A1, um lóbulo mamário, e em A2, um ducto lactífero. Em 1B, indica-se a histologia normal de lóbulos mamários; em 1C, lâmina histológica de carcinoma lobular em situ, com as setas indicando os lóbulos mamários preenchidos por células neoplásicas. 1D indica a histologia normal de um ducto lactífero; 1E mostra lâmina histológica de adenocarcinoma mamário, do subtipo ductal invasivo. A seta indica o ducto lactífero preenchido por células neoplásicas, enquanto * indica o lóbulo mamário mais próximo. Imagens retiradas de: <https://www.kenhub.com/pt/library/anatomia/anatomia-da-mama-feminina>; <https://anatpat.unicamp.br/lamgin21.html>, e <https://casadamama.com/images/file/tipos-e-subtipos-de-cancer-de-mama>, adaptadas pela autora no PowerPoint.

1 Quadro 1. Critérios para classificação dos subtipos moleculares de CM.

Subtipo molecular	Receptores hormonais	Superexpressão de HER2	Ki-67	Frequência
LA	RP e RE positivos	Negativo	Baixo	40-50%
LB	RP variável, RE positivo	Positivo	Variável	20-30%
	RP negativo, RE positivo	Negativo	Alto	
HER2+	Negativo	Positivo	Alto	15-20%
TN	Negativo	Negativo	Alto	10-20%

2 Adaptado de Nascimento e Otoni, 2020.

3 O tecido mamário é altamente plástico, passando por processos de
4 remodelamento de acordo com a idade, com as variações hormonais durante o ciclo
5 menstrual, com a gravidez e durante o período de lactação. Os processos que
6 envolvem o brotamento das glândulas mamárias mediante aos estímulos endócrinos
7 provenientes do estrógeno e da progesterona, bem como dos hormônios hipofisários,
8 influenciam diretamente na organização celular das mamas, compostas
9 majoritariamente por dois tipos celulares epiteliais, as células luminais (CEL) e as
10 células mioepiteliais (CEM) (HANNAN et al., 2023; SHAMS, 2022).

11 Apesar das CEL e CEM comporem a maior parte do tecido glandular
12 mamário, a presença de células com propriedades semelhantes à de células tronco,
13 e com características de ambos os tipos celulares já mencionados, em uma camada
14 conhecida como suprabasal já foi demonstrada na literatura (SØRLIE; CLARKE, 2025;
15 WUIDART et al, 2016). Estudos em modelos animais indicam que existem células
16 residentes do tecido mamário capazes de se diferenciar em CEL e CEM, fortalecendo
17 a hipótese de que as células suprabasais possuem propriedades de células tronco
18 (FU et al 2020; RIOS et al., 2014). A apresentação deste tipo celular é importante, pois
19 sugere-se que certos tipos de CM se originam destas células (SØRLIE; CLARKE,
20 2025).

21 Além do tecido glandular, as mamas possuem o estroma que o
22 circunda, rico em adipócitos, que também modifica sua composição em momentos de

1 alto estímulo endócrino, como durante a lactação. Neste período, enquanto a porção
2 glandular se expande, os adipócitos regridem, e voltam a se diferenciar assim que o
3 período lactacional se encerra (WANG et al., 2018). Ademais, as principais células
4 reguladoras do remodelamento mamário são os fibroblastos, que se dividem em duas
5 populações distintas, que atuam majoritariamente via sinalização parácrina e
6 produção de matriz extracelular (MEC) (MORSING et al., 2020; SUMBAL; BELISOVA;
7 KOLEDOVA, 2021). A primeira população celular é chamada de lobular (FL), e
8 aparenta ser a principal reguladora da morfogênese através da via do fator de
9 crescimento transformador beta (TGF- β). A segunda é conhecida como interlobular
10 (FIL), e possui características menos “maleáveis” do que os lobulares (BAGGER, et
11 al. 2024).

12 Com os avanços na investigação de tumores, os fibroblastos
13 associados ao câncer (FAC) têm se tornado um alvo importante para a compreensão
14 do desenvolvimento tumoral. O estudo de Bagger e colaboradores (2024), buscou
15 avaliar a associação de dois subtipos de FAC, inflamatório (FACI) e miofibroblástico
16 (FACM), com os fibroblastos estáveis presentes na mama, FL e FIL. Através de
17 análises transcriptômicas, o grupo verificou que os FL possuem relação com os FACM,
18 enquanto os FIL são semelhantes aos FACI. Esses fatos, em conjunto às propriedades
19 dinâmicas acentuadas nos FL e à associação dos FACM com a diminuição da taxa de
20 sobrevivência em pacientes com CM, demonstra um possível mecanismo para o
21 desenvolvimento dos tumores mamários.

22 Além do componente fibroblástico, a transição epitelial mesenquimal
23 (TEM), também possui papel essencial no desenvolvimento e avanço de neoplasias.
24 O processo de TEM ocorre de forma parcial em condições fisiológicas nas mamas,
25 visto que durante o remodelamento mamário, as células epiteliais precisam adquirir a
26 capacidade de invadir o estroma (FRANCOU; ANDERSON, 2020). Entretanto, a TEM
27 também é um mecanismo, dentre vários outros, utilizado pelas células tumorais para
28 invadir tecidos adjacentes e para o processo de escape imunológico. O favorecimento
29 de repostas do tipo T_H2, bem como a comunicação via citocinas imunossupressoras
30 ou que favoreçam o crescimento tumoral, e a superexpressão de moléculas inibitórias
31 também são acontecimentos essenciais para facilitar o desenvolvimento do tumor,
32 bem como o processo de metástase (KING; MIR; SINGH, 2017; VINAY et al., 2015).

Apesar do desenvolvimento tumoral ser um processo complexo e não totalmente compreendido, também deve-se dar a devida atenção aos mecanismos imunológicos que atuam para combater o aparecimento do câncer e para manter a homeostase do organismo. Diversas vias de sinalização, bem como a ação de tipos celulares citotóxicos, em especial das células *natural killer* (NK) e T CD8+, são de grande importância para contrabalancear os mecanismos utilizados pelas células neoplásicas para se estabelecerem no organismo, e por isso serão discutidas a seguir.

1.2 PAPEL DO SISTEMA IMUNE NO DESENVOLVIMENTO DE TUMORES

Baseado nos conceitos de imunovigilância, é possível afirmar que o sistema imune de um indivíduo saudável é capaz de identificar células transformadas e desenvolver uma resposta eficaz capaz de eliminá-las e reestabelecer a homeostase (FINN, 2018). Entretanto, sabe-se também que existe uma coevolução de células neoplásicas à medida que as respostas imunes se desenvolvem, conhecida como modelo dos três “Es”: eliminação, equilíbrio e escape (KROEMER et al., 2024).

A eliminação envolve os acontecimentos mediados pela ação de células da resposta inata, como macrófagos e NKs, e células da imunidade adaptativa, especialmente os linfócitos T CD8+, que em plena atividade reconhecem e eliminam células neoplásicas. O equilíbrio diz respeito a um controle imunológico local sobre a formação de massas neoplásicas, com a possibilidade de multiplicação contida destas células, mas sem que elas adquiram propriedades metastáticas, nem se expandam exponencialmente. O escape ocorre a partir da expansão de subclones das células neoplásicas que evoluem de modo a escapar do reconhecimento imunológico ou de enfraquecer a resposta imune local, adquirindo a capacidade de invasão de tecidos adjacentes, podendo culminar em metástases distantes (FINN, 2018; KROEMER et al., 2024; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2022).

O processo de escape imunológico pode ser avaliado através da ótica dos três “Cs”: camuflagem, coerção e citoproteção. A camuflagem consiste em evitar que o sistema imunológico identifique as células neoplásicas, ou ao menos evitar seu reconhecimento como tais. Isso se dá principalmente a partir da evasão de células apresentadoras de antígeno (APCs), através de defeitos na própria apresentação de antígenos via MHC, ou por defeitos no processo de fagocitose. A coerção envolve os mecanismos pelos quais as células tumorais impedem a ativação do sistema

1 imunológico, mesmo tendo sido localizadas e reconhecidas, através da supressão de
2 atividade das células efectoras, em especial células dendríticas (DCs), NKs, linfócitos
3 T CD8+ e linfócitos T CD4+ com polarização T_H1 . A citoproteção diz respeito às formas
4 de defesa desenvolvidas pelas células neoplásicas à ativação normal do sistema
5 imune, e inclui mecanismos compensatórios, defeitos na sinapse imunológica e
6 sinalização de morte celular prejudicada (GALASSI et al., 2024).

7 Desta forma, apesar de todos os mecanismos do sistema imunológico
8 para evitar o desenvolvimento de tumores, as células tumorais evoluem com
9 mecanismos que permitem a persistência e o crescimento tumoral. Dentre eles, se
10 destacam o desenvolvimento de tolerância imunológica, a diminuição de antígenos
11 apresentados, a secreção de citocinas imunossupressoras e a regulação de
12 expressão de moléculas de superfície do tumor, baseada nas vantagens e
13 desvantagens que estas podem trazer ao desenvolvimento tumoral (KING; MIR;
14 SINGH, 2017). O principal mecanismo pelo qual as células tumorais modulam a
15 atividade das células efectoras é a alteração de expressão de ligantes
16 imunomodulatórios, incluindo o ligante de morte programada 1 (PD-L1), a molécula
17 mais bem caracterizada até o momento neste contexto (GALASSI et al., 2024).

18 PD-L1 está diretamente envolvido no processo de coerção, e é
19 expresso em células T CD8+, NKs e algumas células mieloides, incluindo as
20 infiltrantes tumorais (YAMAGUCHI et al., 2022), porém, sua expressão pelas células
21 tumorais é a mais importante neste contexto. Fisiologicamente, PD-L1 é supra
22 regulado em resposta a citocinas como interferon gama (IFN- γ), com o objetivo de
23 limitar o dano tecidual causado pela resposta imune, e por isso torna-se muito útil para
24 a imunossupressão local no contexto dos tumores (YAMAGUCHI et al., 2022). Em
25 contrapartida, a superexpressão de PD-L1 nas células tumorais pode decorrer da
26 amplificação de *CD274*, de sinalização oncogênica aberrante e da resposta a fatores
27 inflamatórios secretados no microambiente tumoral (CHEN et al., 2019). Estudos já
28 demonstraram o aumento de expressão de PD-L1 em uma ampla gama de tumores
29 sólidos (LIN et al., 2024) e em neoplasias hematológicas (GREEN et al., 2010; LEE et
30 al., 2020). No CM, o aumento de transcrição de *CD274* e a estabilização de PD-L1 via
31 fosforilação já se correlacionaram com maior potencial de escape imunológico e
32 metástase (DARVIN; SASIDHARAN NAIR; ELKORD, 2019; HSU et al., 2018).

1.3 VIA DE SINALIZAÇÃO PD-L1/PD-1 E SUAS IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

PD-L1, também conhecido como CD274 ou B7-H1, é uma glicoproteína composta por uma região transmembrana e dois domínios extracelulares de imunoglobulinas, chamados domínio constante de imunoglobulina (IgC) e domínio variável de imunoglobulina (IgV), além de um pequeno domínio citoplasmático (Figura 2) responsável pela ativação de vias de sinalização intracelulares (DERMANI et al., 2019). PD-L1 é usualmente expressa por macrófagos, linfócitos e DCs, estando diretamente associada à regulação da função de células T, especialmente T CD8+, a partir da sua ligação à proteína de morte programada 1 (PD-1). Além disso, a fração solúvel de PD-L1 (sPD-L1) pode ser encontrada na circulação de indivíduos saudáveis, mantendo seu domínio IgV para interação com PD-1. O aumento dos níveis de sPD-L1 na circulação já se correlacionou com metástase e prognóstico desfavorável no CM (CHEN et al., 2016).

PD-1 também é uma proteína transmembrana, expressa em células T, B, NK, macrófagos e DCs. Essa proteína possui um domínio intracelular composto por dois motivos, sendo eles o motivo de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) e o motivo de troca do imunorreceptor baseado em tirosina (ITSM), além de um domínio extracelular de IgV (Figura 2) (JIANG et al., 2019; SUN; HONG, 2025). O eixo PD-L1/PD-1 é responsável pela inibição das células T, tendo seus papéis fisiológicos mais importantes na indução e manutenção da tolerância imunológica e na limitação das respostas imunes, evitando danos teciduais excessivos em resposta à agentes agressores (CHEN et al., 2023a).

Figura 2. Representação esquemática da estrutura de PD-1 e PD-L1.

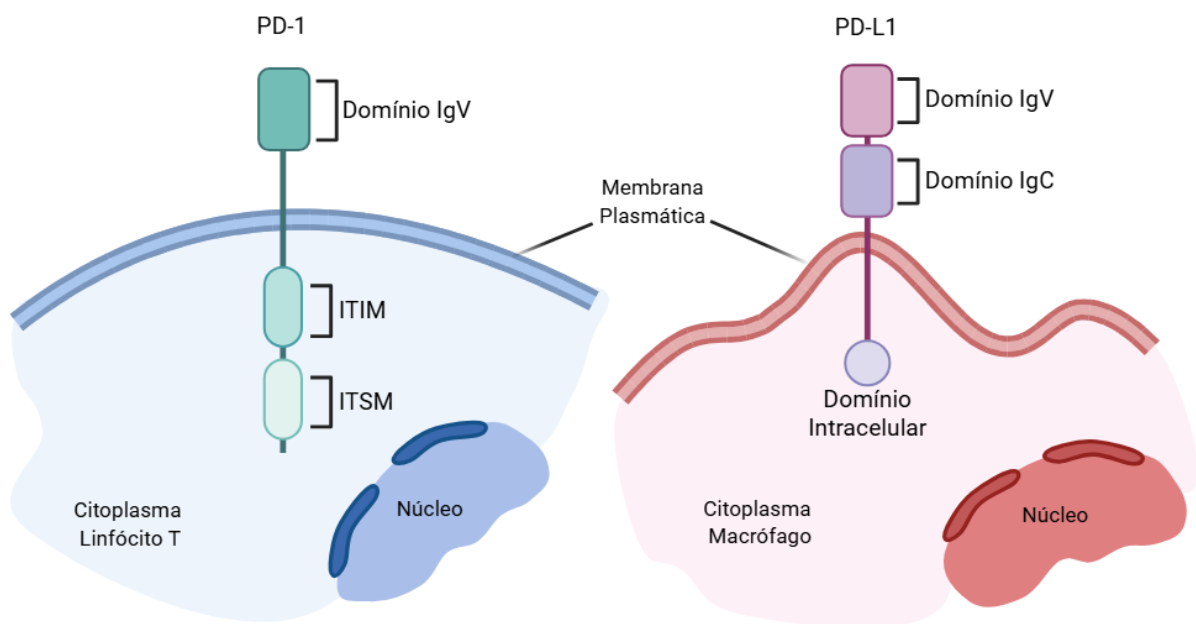


Figura 2. Representação esquemática de PD-L1 e seu receptor, PD-1. PD-1 é composto por um domínio extracelular de IgV, uma porção transmembrana e dois motivos sinalizadores: o motivo inibitório de imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) e o motivo de troca de imunorreceptor baseado em tirosina (ITSM). PD-L1 possui dois domínios de imunoglobulina, IgC e IgV, uma porção transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático para transdução de sinal. Figura produzida pela autora no Biorender.

Outra função fisiológica interessante de PD-L1 envolve a promoção do desenvolvimento e regeneração do tecido mamário. Uma subpopulação multipotente de células tronco mamárias possui alta expressão de receptores de proteína C (Procr), gene alvo da via de sinalização Wnt/ β -catenina (WANG et al., 2015). Em um estudo recente, o grupo de Wang e colaboradores (2021) identificou o aumento de expressão de PD-L1 nessas mesmas células, e confirmaram que, a subpopulação de células tronco positiva para Procr e PD-L1 pode se diferenciar em todas as linhagens de células epiteliais mamárias. Ademais, na deficiência de PD-L1, a capacidade de regeneração e desenvolvimento dessas células diminui significativamente, indicando que PD-L1 é um importante regulador desses processos.

A via de ativação do eixo PD-L1/PD-1 consiste na atividade de uma tirosina fosfatase, chamada *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2* (SHP-2). SHP-2 é composta por quatro domínios principais: N-SH2, C-SH2, PTP e uma cauda C-terminal. Em seu estado inativo, interações intramoleculares entre os domínios N-SH2 e PTP ocorrem com o objetivo de bloquear a entrada dos substratos

de SHP2 em seu sítio catalítico (SONG et al., 2021). Quando PD-L1 se liga a PD-1, os resíduos de tirosina de ITIM e ITSM são fosforilados, e ITSM recruta SHP-2 a partir de sua ligação com o domínio C-SH2. Assim que ativada, SHP-2 desfosforila a cadeia zeta (ζ) do CD3 e a proteína quinase 70 associada a cadeia zeta (ZAP70), diminuindo a ativação da sinalização dos TCRs e consequentemente atenuando a resposta de células T (Figura 3) (CASTRO-SANCHEZ et al., 2020; LIN et al., 2024). PD-L1/PD-1 também possuem vias não canônicas de ativação, especialmente em células tumorais, incluindo vias de sinalização intrínseca e sua translocação nuclear.

Figura 3. Via canônica de sinalização do eixo PD-L1/PD-1.

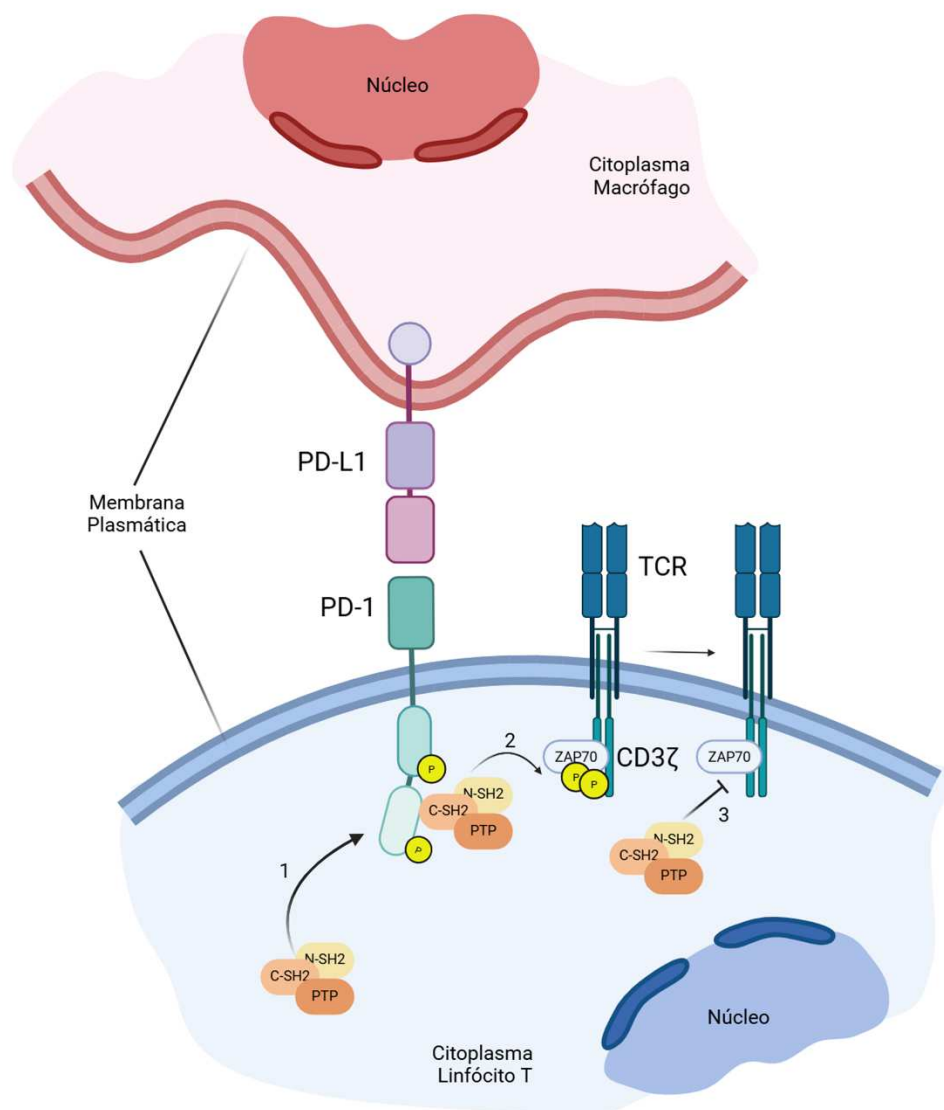
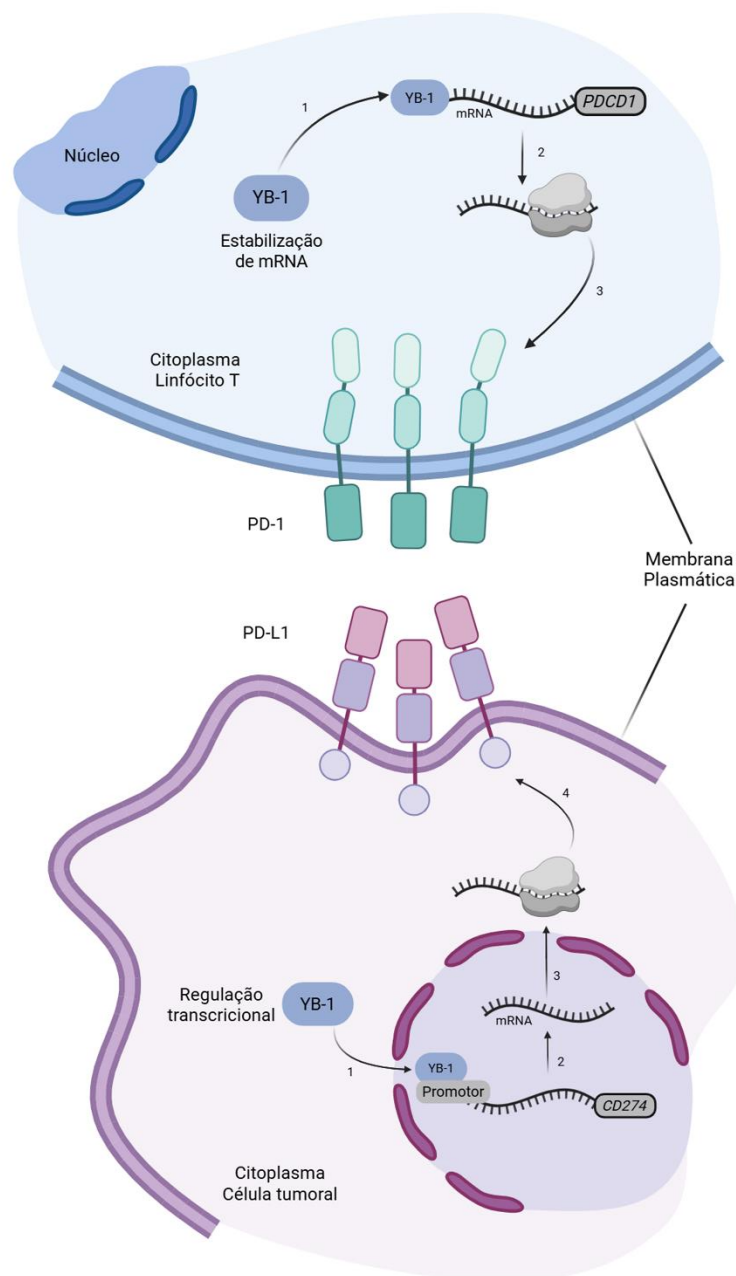


Figura 3. A partir da ligação entre PD-L1 com seu receptor, a fosfatase SHP-2, representada na figura por 3 domínios: C-SH2, N-SH2 e PTP, é recrutada pelo motivo sinalizador ITSM de PD-1, tornando-se ativada (1). SHP-2 ativada desfosforila CD3 ζ e sua proteína associada,

1 ZAP70 (2). Com a desfosforilação destes, a atividade do TCR é atenuada, diminuindo a
2 atividade das células T (3). Figura produzida pela autora no Biorender.

3 Na tumorigênese, a via de sinalização intrínseca de PD-L1/PD-1
4 é modulada a partir da proteína de ligação à caixa Y 1(YB-1), que atua diretamente
5 sobre o RNA mensageiro (mRNA) do receptor e como regulador transcricional de
6 CD274 (WU et al., 2022). YB-1 é um fator de transcrição envolvido na regulação da
7 expressão de diversos genes associados à progressão tumoral, sobrevivência e
8 proliferação celular, bem como à TEM (LASHAM et al., 2012). Especificamente no CM,
9 Wu e colaboradores (2022) demonstraram, *in vitro* e *in vivo*, a influência deste eixo de
10 sinalização no câncer de mama triplo negativo (CMTN). Através da ativação da via
11 intrínseca PD-L1/PD-1, YB-1 promove, além da proliferação celular, a metástase nos
12 tumores mamários TN. Isto foi provado através do silenciamento da expressão de YB-
13 1 seguido da expressão exógena de PD-1 e PD-L1, que mostrou o resgate dos efeitos
14 anteriormente promovidos por YB-1. Este fato indica que o eixo PD-L1/PD-1 é um
15 efector importante da metástase no CMTN.

16
17 Figura 4. Mecanismo proposto para a via de sinalização intrínseca do eixo PD-L1/PD-
18 1.



1

2 Figura 4. Um mecanismo de sinalização intrínseca de PD-L1/PD-1 foi proposto baseado na
 3 atividade do fator de transcrição YB-1. Em células normais que expressam PD-1,
 4 representadas na figura pelo linfócito T, YB-1 se liga diretamente ao mRNA de PD-1 (*PDCD1*),
 5 aumentando sua estabilidade (1). Ao permanecer viável por mais tempo, a tradução deste
 6 mRNA aumenta (2), resultando no aumento de expressão de PD-1 na superfície celular (3).
 7 Além disso, nas células tumorais, YB-1 pode atuar como regulador transcricional de PD-L1
 8 (*CD274*). YB-1 se liga ao promotor do gene *CD274*, promovendo o aumento de sua
 9 transcrição (1). Com isso, a quantidade de mRNA de *CD274* aumenta (2), levando à sua
 10 tradução no citoplasma celular (3). Este fato leva ao aumento de PD-L1 nas células tumorais

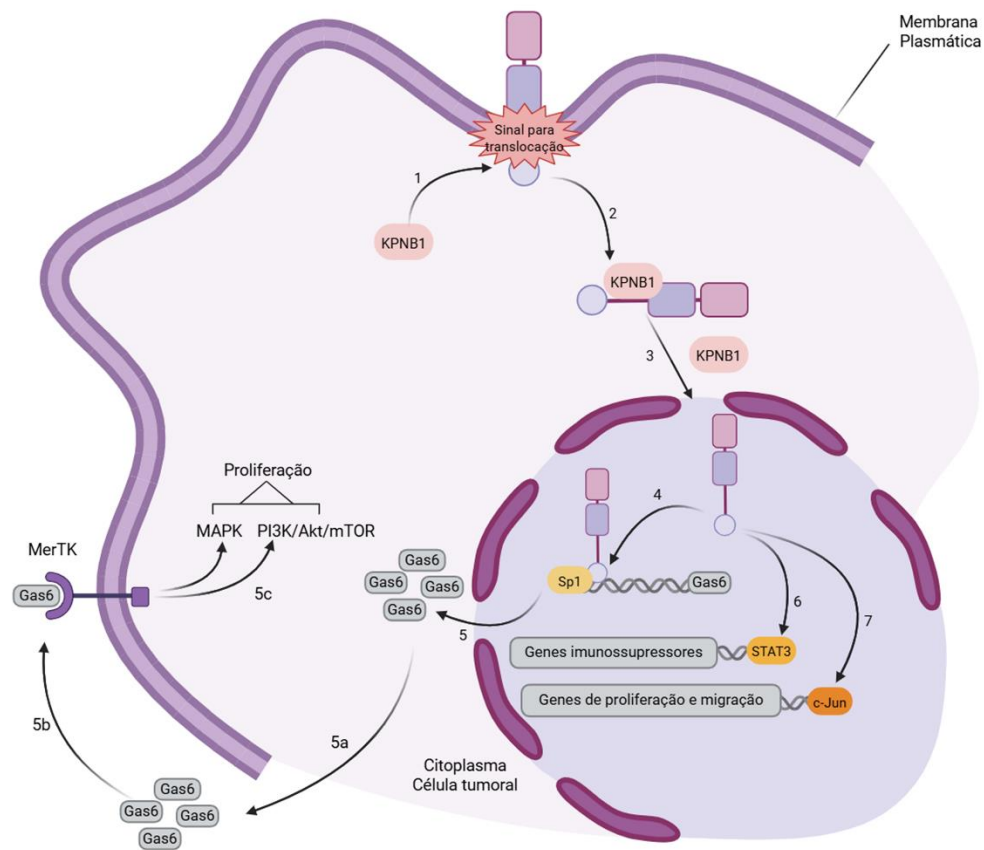
(4), e promove a ativação de outras vias que favorecem o desenvolvimento tumoral, demonstrado pela diminuição de agressividade de tumores de mama TN com a retirada de YB-1 (WU et al., 2022). Figura produzida pela autora no Biorender.

A segunda via não canônica citada de PD-L1 consiste em sua translocação nuclear, mediada principalmente pela subunidade beta-1 da carioferina (KPNB1), que participa ativamente da regulação do ciclo celular. Após a translocação, nPD-L1 pode atuar sobre diferentes vias de sinalização. A partir da interação com o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) e com o fator de transcrição Jun (c-Jun), nPD-L1 modula a resposta imune antitumoral (DU et al., 2021; GAO et al., 2020). Ao se ligar à proteína de especificidade 1 (Sp1), e à região promotora de um de seus alvos, *Growth arrest-specific 6* (Gas6), nPD-L1 pode levar à sua superexpressão, causando aumento de atividade da via Gas6/tirosina quinase Mer (MerTK) (DU et al., 2021). Em tumores sólidos, esta via possui como efetores a proteína quinase B (AKT), a quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), as quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), entre outros, todas moléculas bem caracterizadas no contexto do desenvolvimento tumoral, com a via PI3K/AKT/mTOR sendo um alvo terapêutico promissor para o CMTN (CUMMINGS et al., 2013; ZHANG et al., 2024).

Além das vias não canônicas de ativação, o domínio citoplasmático de PD-L1 parece se relacionar com eventos não convencionais de transdução de sinal. PD-L1 possui dois motivos sinalizadores conservados, chamados “RMLDVEKC” e “DTSSK”, que protegem células tumorais da ação citotóxica de interferons, possivelmente através de uma via dependente de STAT3/caspase-7 (CHAI et al., 2023; GATO-CAÑAS et al., 2017). Ademais, o domínio citoplasmático de PD-L1 parece induzir a via de ativação dependente da proteína quinase R (PKR) do inflamassoma da proteína 3 contendo o domínio de pirina da família de receptores NOD (NLRP3) (THEIVANTHIRAN et al., 2020) e pode proteger mRNAs de genes de reparo de DNA, como *BRCA1* e *NBS1* de degradação via competição com exossomos, aumentando a resistência celular a danos de DNA (CHAI et al., 2023; TU et al., 2020). Isso demonstra a complexidade da sinalização envolvendo PD-L1, e reforça a importância de seu estudo no contexto tumoral.

Figura 5. Mecanismo proposto para translocação nuclear de PD-L1 e suas ações.

1



2

Figura 5. A partir de sinais de translocação presentes em PD-L1, a subunidade beta-1 da carioferina (KPNB1) é recrutada (1). Após seu recrutamento, KPNB1 se liga à PD-L1, iniciando seu processo de translocação ao núcleo celular (2). Uma vez no núcleo, a porção citoplasmática de PD-L1 pode interagir com outras moléculas nucleares (3), como: o fator de transcrição Sp1 e um de seus genes alvo, Gas6, formando um complexo ativador (4), que culmina com o aumento de expressão da proteína Gas6 (5), que é secretada (5a) e pode atuar ativando a via de sinalização Gas6/MerTK (5b), que culmina na ativação de outras vias que resultam no aumento da proliferação celular (5c); o fator de transcrição STAT-3, que por sua vez ativa a transcrição de diversos genes imunossupressores, auxiliando a inibição de resposta imune local (6); e o fator de transcrição c-JUN (7), que atua, juntamente com outras moléculas, na transcrição de genes que favorecem a proliferação e migração celular, podendo facilitar o aumento tumoral e o processo de metástase. Figura produzida pela autora no Biorender.

1 Considerando o papel do eixo no desenvolvimento e na progressão
2 tumoral, as imunoterapias anti-PD-1 e anti-PD-L1 são frequentemente utilizadas para
3 diferentes tipos tumorais, incluindo o CM (CHENG et al., 2024; LI et al., 2025; SONG
4 et al., 2024). Apesar do CM ser normalmente considerado pouco imunogênico, as
5 descobertas mais recentes sobre os tipos celulares presentes no microambiente
6 tumoral e sua capacidade de gerar respostas imunes antitumorais favoreceu o estudo
7 de estratégias de imunoterapia como tratamento (DEBIEN et al., 2023; ZHANG;
8 WANG, 2024). Especialmente no CMTN, o uso de inibidores de PD-L1/PD-1 como
9 estratégia complementar a quimioterapia demonstrou resultados promissores
10 (ZHANG; WANG, 2024).

11 Entretanto, os indivíduos não respondem igualmente a estas terapias,
12 e a resistência ao bloqueio de PD-L1/PD-1 é um desafio (CHEN et al., 2023b). Para
13 compreender este fenômeno, são propostos três diferentes perfis imunológicos
14 tumorais, que se correlacionam diretamente com a resposta dos indivíduos à terapia
15 anti-PD-L1/PD-1. São eles o fenótipo imuno inflamatório, o fenótipo imune excluído e
16 o fenótipo imune deserto (CHEN; MELLMAN, 2017). No fenótipo imuno inflamatório,
17 o tumor encontra-se envolvido por células T CD4+ e CD8+, além das células
18 mieloides. Nestes tumores, tanto as células imunológicas infiltrantes quanto as
19 próprias células tumorais apresentam a expressão de PD-L1, e sugere-se que a
20 presença deste fenótipo está relacionada a uma resposta antitumoral que existia, mas
21 foi silenciada pelo microambiente tumoral. Este é o perfil mais responsivo às terapias
22 anti-PD-L1/PD-1 (FEHRENBACHER et al., 2016; HERBST et al., 2014).

23 O segundo fenótipo, imuno excluído, também possui como
24 característica a presença de células imunológicas, porém, estas células não são
25 capazes de infiltrar o parênquima tumoral, sendo retidas no tecido adjacente ao tumor
26 (CHEN; MELLMAN, 2017; HERBST et al., 2014). Desta forma, a terapia anti-PD-
27 L1/PD-1 promove a ativação de células T desta região, mas a falta de capacidade de
28 infiltração limita a ação das células ativadas sobre o parênquima tumoral, gerando
29 resultados insatisfatórios (CHEN; MELLMAN, 2017). Por fim, o fenótipo imune deserto
30 caracteriza tumores não inflamados, com diminuição drástica ou ausência de células
31 T CD8+. Sendo assim, a resposta destes tumores às imunoterapias anti-PD-L1/PD-1
32 é quase nula, e reflete a ausência de resposta antitumoral pré-existente (CHEN;
33 MELLMAN, 2017; HEGDE; KARANIKAS; EVERS, 2016; HERBST et al., 2014).

Considerando a diversidade de fatores que podem influenciar no desenvolvimento dos tumores, bem como no prognóstico e na resposta terapêutica dos indivíduos, e a grande importância das variações genéticas como uma forma de elucidar a variabilidade observada, mostra-se a relevância de avaliar polimorfismos genéticos em moléculas associadas ao desenvolvimento tumoral para compreender melhor sua imunopatogênese.

1.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS E SUA RELAÇÃO COM A DIVERSIDADE DE RESPOSTAS IMUNES

A genética individual exerce papel importante na modulação das respostas imunológicas frente aos tumores, interferindo diretamente na suscetibilidade ao desenvolvimento e à progressão do câncer. Os polimorfismos genéticos têm sido amplamente investigados por influenciarem tanto a suscetibilidade tumoral quanto a eficácia das terapias oncológicas (CURA et al., 2021). Polimorfismos são variações estáveis no genoma, que possuem seu alelo mais raro presente em pelo menos 1% da população, e podem ocorrer em regiões codificantes ou não codificantes. O tipo mais comum são as variações de nucleotídeo único (SNVs), que consistem na substituição de um nucleotídeo por outro em qualquer região do gene. As SNVs são os polimorfismos mais estudados, e podem estar presentes em regiões codificantes ou regulatórias de genes, podendo alterar a função ou a expressão das proteínas correspondentes. SNVs presentes em genes associados à resposta imune, como os que codificam citocinas, quimiocinas, receptores de superfície e moléculas reguladoras, têm sido relacionados a diferentes perfis de ativação imune e reconhecimento tumoral. Em especial, polimorfismos em genes de *checkpoints* imunológicos têm despertado interesse por sua associação com a variabilidade de resposta a imunoterapias (DONG et al., 2016; ZARETSKY et al., 2016).

A compreensão da influência dos polimorfismos sobre a resposta imune antitumoral é muito relevante no contexto do câncer, dado o desafio de prever a eficácia terapêutica com base em características genéticas individuais. A grande variabilidade entre indivíduos quanto à detecção de células tumorais pelo sistema imune, ao microambiente tumoral e à resposta a tratamentos, exige uma abordagem cada vez mais personalizada. Assim, a investigação dessas variações genéticas contribui para a estratificação de pacientes, o aperfeiçoamento de protocolos

1 terapêuticos e o delineamento de prognósticos mais precisos, além de possibilitar o
2 avanço na medicina de precisão (TOPALIAN et al., 2016; SHARMA et al., 2017).
3 Nesse contexto, torna-se fundamental compreender as variações genéticas do gene
4 *CD274*, responsável pela codificação da proteína PD-L1, uma das principais
5 moléculas imunorreguladoras envolvidas na evasão tumoral. A seguir, serão
6 discutidas duas de suas variantes e os mecanismos pelos quais podem modular a
7 resposta imune antitumoral.

9 1.4.1 Gene *CD274* e suas Variantes

10 O gene codificador de PD-L1 é chamado *CD274*, localiza-se no
11 cromossomo 9p24.1, é composto por 7 éxons e possui mais de 20 SNVs com estudos
12 disponíveis na literatura até o momento (DERMANI et al., 2019; NCBI, 2025). A
13 expressão de *CD274* pode ser regulada de diversas formas, incluindo mecanismos
14 transcricionais, especialmente no contexto dos tumores, onde fatores de transcrição
15 oncogênicos podem aumentar a expressão da proteína como um mecanismo de
16 escape imunológico, e pós transcricionais, através da ligação de micro RNAs
17 (miRNAs) (CASEY et al., 2016; WANG et al., 2017). Outras modificações
18 epigenéticas, como a acetilação de histonas, e alterações em genes vizinhos, também
19 podem diretamente impactar na expressão de RNA de PD-L1, como é o caso de JAK2
20 (Janus kinase 2) (HOGG et al., 2017; PRESTIPINO et al., 2018). Entre todos os fatores
21 reguladores, encontram-se os polimorfismos genéticos, especialmente as SNVs, que
22 podem influenciar a expressão e a funcionalidade das proteínas codificadas, e por
23 isso, são relevantes no contexto do câncer.

24 A SNV rs822335T>C, encontrada na região promotora do gene
25 *CD274* (posição 5448218 do cromossomo), é definida pela troca de um nucleotídeo
26 de timina (T), por uma citosina (C). Por se localizar na região promotora, especula-se
27 que essa variante seja capaz de alterar a atividade transcricional de *CD274* (GREND
28 et al., 2021). Análises *in silico* utilizando os bancos de dados RegulomeDB e 3DSNP
29 2.0 indicam que, em linhagens de células pulmonares, esta SNV está presente em
30 uma região *enhancer* do gene. Apesar disso, nenhum fator de transcrição que se ligue
31 especificamente à esta região foi encontrado até o momento (MOKSUD et al., 2023).
32 O genótipo CC desta SNV já se associou à maior porcentagem de células tumorais

expressando PD-L1, reforçando a hipótese de seu impacto regulatório (KRAWCZYK et al., 2019).

Já a SNV rs4143815G>C, localizada na posição 5468257 do cromossomo, consiste na troca de uma guanina (G) por uma C na região 3'UTR do gene. A região 3'UTR é muito relevante para a ligação de miRNAs portanto, a hipótese que cerca os efeitos desta SNV na expressão de PD-L1 indicam que a ligação do miR-570, responsável pela degradação de RNA mensageiro de *CD274*, encontra-se prejudicada na presença do alelo variante C (WANG, et al. 2013; YANG, et al. 2024). A importância funcional de miR-570 foi demonstrada por Lin e colaboradores (2018), que observaram sua atuação na inibição da tumorigenicidade e proliferação de células endoteliais no carcinoma hepatocelular, além de sua influência na angiogênese tumoral. O miR-570 também foi capaz de induzir apoptose em células tumorais e aumentar a proporção de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , sugerindo um papel protetor mediado pela sua regulação de múltiplos alvos, incluindo *CD274*. Nesse cenário, a presença do alelo C prejudica a ligação do miR-570, reduzindo a degradação do mRNA e resultando em maior expressão de PD-L1, fenômeno já relacionado ao desenvolvimento e progressão tumoral (DU et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

O CM é o tipo de câncer mais incidente em mulheres no mundo todo. A literatura disponível ressalta o papel de moléculas de checkpoint imunológico, como a PD-L1, no microambiente tumoral. A modulação do eixo de sinalização PD-L1/PD-1 constitui o principal mecanismo de evasão imunológica desenvolvido pelas células tumorais, e por isso, é também o principal alvo de imunoterapias. Sabe-se que polimorfismos genéticos podem alterar tanto a expressão gênica quanto a função das proteínas por eles codificadas. Desta forma, considerando a influência já conhecida dos polimorfismos genéticos no desenvolvimento de diferentes doenças, incluindo o CM, e da interação de diferentes polimorfismos através da formação de haplótipos, torna-se importante avaliar as variantes genéticas de *CD274* a fim de contribuir para uma maior compreensão acerca do papel de PD-L1 no desenvolvimento do CM, bem como contribuir para um maior entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação da expressão gênica e da função desta molécula neste contexto, fatores que podem exercer influência na suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer, em seu prognóstico e na eficácia das terapias oncológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os polimorfismos genéticos rs4143815 e rs822335 de *CD274* e seus haplótipos e verificar sua possível influência na suscetibilidade e no prognóstico do câncer de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência dos alelos, genótipos e haplótipos dos polimorfismos rs4143815 e rs822335 de *CD274* em amostras de pacientes com e sem câncer de mama, bem como entre seus subtipos moleculares;
- Associar parâmetros sociodemográficos e clinicopatológicos com o desenvolvimento do câncer de mama, bem como entre seus subtipos moleculares;
- Associar os alelos, genótipos e haplótipos com parâmetros clinicopatológicos das pacientes, bem como com seus prognósticos e com os subtipos moleculares da doença.

4. REFERÊNCIAS

BAGGER, Mikkel Morsing *et al.* Evidence of steady-state fibroblast subtypes in the normal human breast as cells-of-origin for perturbed-state fibroblasts in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 26, n. 1, 2024.

CASEY, Stephanie C. *et al.* MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. **Science**, v. 352, n. 6282, 2016.

CASTRO-SANCHEZ, Patricia *et al.* Modulation of TCR Signaling by Tyrosine Phosphatases: From Autoimmunity to Immunotherapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2020.

CHAI, Fangni *et al.* Targeting the PD-L1 cytoplasmic domain and its regulatory pathways to enhance cancer immunotherapy. **Journal of Molecular Cell Biology**, 2023.

CHEN, Daniel S.; MELLMAN, Ira. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. **Nature**, 2017.

CHEN, J. *et al.* Regulation of PD-L1: A novel role of pro-survival signalling in cancer. **Annals of Oncology**, 2016.

CHEN, Ru Yue *et al.* The role of PD-1 signaling in health and immune-related diseases. **Frontiers in Immunology**, 2023a.

CHEN, Shuming *et al.* Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, 2019.

CHEN, Xingyu *et al.* Mechanisms and Strategies to Overcome PD-1/PD-L1 Blockade Resistance in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancers**, 2023b.

CHENG, Weishi *et al.* Dual blockade immunotherapy targeting PD-1/PD-L1 and CTLA-4 in lung cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 17, n. 1, p. 54, 27 jul. 2024.

CUMMINGS, Christopher T. *et al.* Molecular Pathways: MERTK Signaling in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5275–5280, 1 out. 2013.

CURA, Yasmin *et al.* Genetic polymorphisms on the effectiveness or safety of breast cancer treatment: Clinical relevance and future perspectives. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, 2021.

DARVIN, Pramod; SASIDHARAN NAIR, Varun; ELKORD, Eyad. PD-L1 Expression in Human Breast Cancer Stem Cells Is Epigenetically Regulated through Posttranslational Histone Modifications. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.

DEBIEN, Véronique *et al.* Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives. **npj Breast Cancer**, 2023.

DERMANI, Fatemeh K. *et al.* PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, 2019.

DONG, Zhong-Yi *et al.* Potential biomarker for checkpoint blockade immunotherapy and treatment strategy. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4251–4261, 16 abr. 2016.

DU, Wenwen *et al.* Variant SNPs at the microRNA complementary site in the B7-H1 3'-untranslated region increase the risk of non-small cell lung cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 3, 2017.

DU, Wenwen *et al.* KPNB1-mediated nuclear translocation of PD-L1 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation via the Gas6/MerTK signaling pathway. **Cell Death and Differentiation**, v. 28, n. 4, 2021.

FEHRENBACHER, Louis *et al.* Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): A multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 387, n. 10030, 2016.

FINN, Olivera J. A Believer's Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 2, 2018.

FRANCOU, Alexandre; ANDERSON, Kathryn V. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Development and Cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 4, n. 1, p. 197–220, 9 mar. 2020.

FU, Nai Yang *et al.* Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 2, 2020.

GALASSI, Claudia *et al.* The hallmarks of cancer immune evasion. **Cancer Cell**, v. 42, n. 11, p. 1825–1863, 11 nov. 2024.

GAO, Yang *et al.* Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy. **Nature Cell Biology**, v. 22, n. 9, 2020.

GARCÍA-SANCHA, Natalia; CORCHADO-COBOS, Roberto; PÉREZ-LOSADA, Jesús. Understanding Susceptibility to Breast Cancer: From Risk Factors to Prevention Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025.

GATO-CAÑAS, Maria *et al.* PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Reports*, v. 20, n. 8, 2017.

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. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, 2011.

GREEN, Michael R. *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood**, v. 116, n. 17, 2010.

GREND, Anna *et al.* Impact of copy number variant and single nucleotide polymorphism of the programmed death-ligand 1 gene, programmed death-ligand 1 protein expression and therapy regimens on overall survival in a large group of Caucasian patients with non-small cell lung carcinoma. **Oncology Letters**, v. 21, n. 6, 2021.

HADDAD, Cássio Furtini. Hereditary breast cancer: review and current approach. **Mastology**, v. 30, 2020.

HANNAN, Fadil M. *et al.* Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. **Nature Reviews Endocrinology**, 2023.

HEGDE, Priti S.; KARANIKAS, Vaio; EVERS, Stefan. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 8, 2016.

HERBST, Roy S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. **Nature**, v. 515, n. 7528, 2014.

HOGG, Simon J. *et al.* BET-Bromodomain Inhibitors Engage the Host Immune System and Regulate Expression of the Immune Checkpoint Ligand PD-L1. **Cell Reports**, v. 18, n. 9, 2017.

HSU, Jung Mao *et al.* STT3-dependent PD-L1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

INCA. **Controle do câncer de mama: dados e números**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controle-do-cancer-de-mama/dados-e-numeros/>> Acesso em: 20 mai. 2025.

JIANG, Yongshuai *et al.* PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, 2019.

KING, Jeronay; MIR, Hina; SINGH, Shailesh. Association of Cytokines and Chemokines in Pathogenesis of Breast Cancer. **In: Progress in Molecular Biology and Translational Science**. v. 151.

KRAWCZYK, Paweł *et al.* PD-L1 gene copy number and promoter polymorphisms regulate PD-L1 expression in tumor cells of non-small cell lung cancer patients. **Cancer Genetics**, v. 237, 2019.

KROEMER, Guido *et al.* Immunosurveillance in clinical cancer management. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 2, 2024.

LASHAM, Annette *et al.* YB-1, the E2F pathway, and regulation of tumor cell growth. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 2, 2012.

LEE, Min Young *et al.* Differences in PD-1 expression on CD8+ T-cells in chronic myeloid leukemia patients according to disease phase and TKI medication. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 11, 2020.

LI, Hongshu *et al.* Progress of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in the treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 25, n. 1, p. 139, 10 abr. 2025.

LIN, Xin *et al.* Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers. **Molecular Cancer**, v. 23, n. 1, p. 108, 18 maio 2024.

LIN, Yongxin *et al.* MiR-570 Inhibits Proliferation, Angiogenesis, and Immune Escape of Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 33, n. 6, 2018.

MOKSUD, Nafeesa *et al.* Common inherited variants of PDCD1, CD274 and HAVCR2 genes differentially modulate the risk and prognosis of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, n. 9, 2023.

MORSING, Mikkel *et al.* Fibroblasts direct differentiation of human breast epithelial progenitors. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 102, 29 dez. 2020.

NASCIMENTO, Renan Gomes do; OTONI, Kaléu Mormino. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). *dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database*. Bethesda: National Library of Medicine, [s.d.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Acesso em: 20 mai. 2025.

PANTEL, Klaus; ALIX-PANABIÈRES, Catherine. Crucial roles of circulating tumor cells in the metastatic cascade and tumor immune escape: biology and clinical translation. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, 2022.

PRESTIPINO, Alessandro *et al.* Oncogenic JAK2 V617F causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 429, 2018.

RIOS, Anne C. *et al.* In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. **Nature**, v. 506, n. 7488, 2014.

SCALA, Marco *et al.* Dose-response Relationships Between Cigarette Smoking and Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Epidemiology*, v. 33, n. 12, 2023.

SHAMS, Anwar. Re-evaluation of the myoepithelial cells roles in the breast cancer progression. **Cancer Cell International**, 2022.

SHARMA, Padmanee *et al.* Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. **Cell**, 2017.

SONG, Dandan *et al.* Efficacy and safety of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 immune checkpoint inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 1 nov. 2024.

SONG, Zhendong *et al.* Tyrosine phosphatase SHP2 inhibitors in tumor-targeted therapies. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2021.

SØRLIE, Therese; CLARKE, Robert B. (ORGS.). **A Guide to Breast Cancer Research**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. v. 1464

SUMBAL, Jakub; BELISOVA, Denisa; KOLEDOVA, Zuzana. Fibroblasts: The grey eminence of mammary gland development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 114, 2021.

SUN, Qiyue; HONG, Senlian. Glycoscience in Advancing PD-1/PD-L1-Axis-Targeted Tumor Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 3, p. 1238, 31 jan. 2025.

THEIVANTHIRAN, Balamayoor *et al.* A tumor-intrinsic PD-L1/NLRP3 inflammasome signaling pathway drives resistance to anti-PD-1 immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 5, 2020.

TOPALIAN, Suzanne L. *et al.* Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 2016.

TU, Xinyi *et al.* PD-L1 (B7-H1) Competes with the RNA Exosome to Regulate the DNA Damage Response and Can Be Targeted to Sensitize to Radiation or Chemotherapy. *Molecular Cell*, v. 74, n. 6, 2019.

VINAY, Dass S. *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, 2015.

WANG, Daisong *et al.* Identification of multipotent mammary stemcells by protein C receptor expression. **Nature**, v. 517, n. 7532, 2015.

WANG, Qingshui *et al.* The roles of microRNAs in regulating the expression of PD-1/PD-L1 immune checkpoint. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.

WANG, Qiong A. *et al.* Reversible De-differentiation of Mature White Adipocytes into Preadipocyte-like Precursors during Lactation. **Cell Metabolism**, v. 28, n. 2, 2018.

WANG, Ruirui *et al.* Programmed Cell Death Ligand 1 Is Enriched in Mammary Stem Cells and Promotes Mammary Development and Regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2021.

WANG, Weipeng *et al.* A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. **Human Genetics**, v. 132, n. 6, 2013.

WU, Qian *et al.* YB-1 promotes cell proliferation and metastasis by targeting cell-intrinsic PD-1/PD-L1 pathway in breast cancer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 153, 2022.

WUIDART, Aline *et al.* Quantitative lineage tracing strategies to resolve multipotency in tissue-specific stem cells. **Genes and Development**, v. 30, n. 11, 2016.

YAMAGUCHI, Hirohito *et al.* Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 2022.

YANG, Jing *et al.* Elevated programmed cell death-1 protein/ligand (PD-1/PD-L1) and variants are associated with susceptibility to multiple myeloma: a case-control study in the Chinese cohort. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 43, n. 3, 2024.

ZARETSKY, Jesse M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 9, 2016.

ZHANG, Fan; WANG, Shu-Sen. Narrative review on advancing breast cancer treatment: harnessing the power of PD-1/PD-L1 inhibitors for improved patient outcomes. **Translational Breast Cancer Research**, v. 5, 2024.

ZHANG, Huan-ping *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: an important driver and therapeutic target in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer**, v. 31, n. 4, p. 539–551, 17 jul. 2024.

5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

THE PD-L1 GENETIC VARIANT RS822335T>C IS ASSOCIATED WITH LUMINAL A AND TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY.

Abstract

The *CD274* gene, which encodes the immune checkpoint molecule PD-L1, plays an essential role in tumor immune escape and response to immunotherapy. This study aimed to investigate the influence of two single nucleotide variants (SNVs), rs4143815G>C and rs822335T>C, in breast cancer (BC) susceptibility and prognosis within a Brazilian population. We genotyped BC patients (n=292) and cancer-free controls (n=198), comparing genotypic and allelic frequencies, as well as haplotype distributions between groups. Prognostic associations were mainly evaluated by comparing luminal A breast cancer (LABC) samples, who present more favorable clinical outcomes, with triple-negative breast cancer (TNBC) samples, the most frequent subtype with poor prognosis in our cohort. The SNV rs822335T>C demonstrated significant associations, with the C allele and CC genotype being more frequent in TNBC patients, while the T allele and TT genotype were associated with LABC. Haplotype analysis confirmed these results, highlighting the C-G haplotype as a susceptibility factor for TNBC and the T-G haplotype as a protective factor for TNBC. This is the first study to evaluate rs822335T>C in BC, as well as the first to analyze these two SNVs in combination within this context. Our results contribute to the understanding of how genetic variants may modulate BC susceptibility and prognosis, especially in highly admixed populations such as the Brazilian one, and suggest that rs822335T>C may influence BC susceptibility and prognosis.

Keywords: Triple Negative Breast Neoplasms; Programmed Cell Death Ligand 1; Prognosis; Haplotypes; Immune Checkpoint Proteins.

Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer among women worldwide, with over 2 million new cases registered in 2022 (WHO, 2022). BC is a multifactorial disease, with a range of genetic signatures, which directly impact the

1 variety of therapeutic responses and clinical manifestations of patients. Apart from
2 genetics, hormonal and environmental factors also play an important role in tumor
3 development (SUN et al., 2017). BC is molecularly classified into at least four different
4 subtypes: luminal A (LA), luminal B (LB), HER2 enriched (HER2+) and triple negative
5 (TN) (NASCIMENTO; OTONI, 2020).

6 The tumor development process is complex, and it can be analyzed
7 through two main perspectives, known as the three “Es” model, which explains the
8 events leading to the immune evasion, and the three “Cs” model, which explains
9 immune evasion itself. The three “Es” model, comprehends elimination, equilibrium
10 and escape (KROEMER et al., 2023). Elimination happens when the immune system
11 detects and eliminates neoplastic cells through. Equilibrium is defined as a state where
12 local immune control is established, allowing the transforming cells to replicate
13 controllably, but impeding the acquisition of metastatic properties. And finally, escape
14 happens when subpopulations of neoplastic cells evolve to avoid immune recognition
15 or weaken the local surveillance, acquiring the capacity to invade and metastasize
16 (FINN, 2018; KROEMER et al., 2023; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2022). The
17 immune escape can be divided into camouflage, cytoprotection and coercion.
18 Camouflage consists in avoiding detection, cytoprotection consists in defense
19 mechanisms to survive immune activation and coercion includes mechanisms to avoid
20 immune activation, such as suppression of effector cells (GALASSI et al., 2024).

21 The programmed death ligand-1 (PD-L1) is directly involved in the
22 coercion process, since it is a T cell activity inhibitor. Physiologically, PD-L1 is essential
23 to avoid autoimmunity and to control the exacerbation of immune responses, but in the
24 cancer context, it is directly associated with higher immune escape potential, as well
25 as the metastasis process (DARVIN; SASIDHARAN NAIR; ELKORD, 2019;
26 YAMAGUCHI et al., 2022). PD-L1 is a glycoprotein composed of two extracellular Ig-
27 like domains (IgC and IgV), a transmembrane portion and a small cytoplasmatic
28 domain, responsible for the activation of intracellular signaling pathways (DERMANI et
29 al., 2019). It is usually expressed by macrophages, lymphocytes and dendritic cells
30 (DCs), as well as by tumor cells, and is directly associated with T cell function
31 regulation through its ligation with its receptor, programmed death protein-1 (PD-1).

32 Genetics play a key role in modulating immune responses, and genetic
33 polymorphisms are broadly evaluated in the context of cancer, considering their

influence in tumor predisposition and therapy efficiency (CURA et al., 2021). *CD274* is located in the 9p24.1 locus and has more than 20 single nucleotide variants (SNVs) cited in the literature to this date (NCBI, 2025). For this study, we chose to evaluate two SNVs in different gene regions, rs822335T>C and rs4143815G>C, to check if they could influence BC development and prognosis. The SNV rs822335T>C is located within the promoter region of *CD274*, in a region considered by *in silico* analysis as a gene enhancer (MOKSUD et al., 2023). Its CC genotype has been previously associated with higher PD-L1 expression in tumor cells (KRAWCZYK et al., 2019). On the other hand, rs4143815G>C is in the 3'UTR region, relevant to micro RNAs ligation. Specifically, miR-570 ligation has been shown to be prejudicated in the presence of its C allele, reducing the degradation of *CD274* mRNA, culminating in higher PD-L1 expression (YANG et al., 2024).

All that considered, evaluating these polymorphisms in the context of BC is relevant to better comprehend the tumor development process, therefore, the aim of the present study was to investigate the influence of *CD274* SNVs, rs822335T>C and rs4143815G>C genotypes and haplotypes in the susceptibility and prognostic of BC, comparing their distribution between cancer patients and controls, as well as among two BC subtypes with contrasting prognoses, LA and TN.

Materials and methods

Ethics aspects and sample characterization

The current study has been approved by the Human Ethics Committee of the State University of Londrina (UEL) (CAAE: 84352124.7.0000.5231). All participants signed a consent form and received detailed explanation regarding the conducted study. Genomic DNA samples stored in the Laboratory of Studies and Analysis of DNA Polymorphisms biorepository were used to conduct this study. In total, 490 samples were utilized, being divided into two main groups: control, which included 198 women, who were routine patients in the Outpatients Clinic from UEL (HC-UEL), with updated mammography's at the time of sample collection, and no family history of BC; and cancer, including 292 women attended by the oncology service from Londrina's Cancer Hospital (HCL), with clinical and laboratorial BC diagnoses. It is important to notice that all participants, cancer patients and controls, are from the same

geographic region. The cancer group was then subdivided according to their tumor molecular subtypes, between LA (n=182), LB (n=36), HER2+ (n=16) and TN (n=58). All data obtained from patients and utilized for the study were provided by HCL and HC-UEL medical records. No questionnaires were applied to the patients. Some medical records lacked information, primarily due to incomplete documentation by the attending physician during patient triage.

CD274 genotyping

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed with validated Taqman probes according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) to genotype the rs4143815G>C (C__31941235_10) and rs822335T>C (C__7590674_10) SNVs. The assays were performed with 1,1ng/μL of genomic DNA on a StepOne thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All assays had negative controls to confirm the absence of contamination. The genotypes were assigned automatically to each sample through the allele specific fluorescence in StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems).

Statistical analysis, haplotype inference and linkage disequilibrium

All parameters (clinical data, age, genotypes and haplotypes) were initially analyzed through the Chi square test or Fisher's exact test when necessary. The parameters with significant association with the cancer group, as well as age, were then used as confounding variables in multivariable regression analysis. Through the logistic regression, odds ratio (OR) and the 95% confidence interval (95% CI) were established. All analyses were performed with SPSS Statistics 22.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), considering $p < 0.05$ as statistically significant. Linkage disequilibrium analysis was performed with Haploview, with PHASE being used for haplotype inference.

Results:

The participants' age ranged from 19 to 88 years old, with a mean age of 52.2 (± 13.3). The control group range was 19 to 80 years old, and the mean age was 49.3 (± 14.4). The cancer group had a range from 22 to 88 years old, and the mean age was 54.1 (± 12.2), with LA ranging from 31 to 88 years old, with a mean of 55.4

1 (± 12.1), LB from 22 to 74 years old, with a mean of 49.5 (± 10.6), HER2+ from 39 to 79
2 years old, with a mean of 52 (± 9.9) and TN ranging from 25 to 83 years old, with a
3 mean age of 53 (± 13.4). The ages differed significantly between the control group and
4 the cancer group ($p < 0.001$), and no significant differences were found between the
5 ages of the cancer subtypes groups ($p = 0.077$). The association between all clinical
6 parameters available and age are shown in Table 1. The clinical parameters stage
7 ($p = 0.005$), Ki67 ($p < 0.001$) and p53 ($p < 0.001$) all showed significant statistical
8 differences among different BC subtypes. Tumor size ($p = 0.055$) and lymphnode
9 metastasis ($p = 0.999$) presented no significant differences between subtypes.

1 Table 1. Distribution of Clinical Parameters and Age Stratification Among Breast Cancer Patients and Their Molecular Subtypes

<i>BC sample characteristics</i>		Cancer n=292 n (%)	LA n=182 n (%)	LB n=36 n (%)	HER2+ n=16 n (%)	TN n=58 n (%)	p-value
Age	≤24 y.o.	1 (0.3)	0 (0.0)	1 (2.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.077
	25 to 34 y.o.	10 (3.5)	4 (2.2)	1 (2.8)	0 (0.0)	5 (8.6)	
	35 to 44 y.o.	56 (19.2)	34 (18.7)	7 (19.4)	3 (18.8)	12 (20.8)	
	45 to 54 y.o.	93 (31.8)	54 (29.7)	16 (44.5)	9 (56.3)	14 (24.1)	
	55 to 64 y.o.	70 (24.0)	47 (25.8)	7 (19.4)	2 (12.5)	14 (24.1)	
	≥ 65 y.o.	61 (20.9)	42 (23.0)	4 (11.1)	2 (12.5)	13 (22.4)	
	Missed	1 (0.3)	1 (0.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Stage	I	33 (11.3)	22 (12.1)	4 (11.1)	4 (25.0)	3 (5.2)	0.005
	II	101 (34.6)	81 (44.5)	9 (25.0)	3 (18.8)	8 (13.8)	
	III	77 (26.4)	38 (20.9)	13 (36.1)	8 (50.0)	18 (31.0)	
	IV	7 (2.4)	3 (1.6)	2 (5.6)	1 (6.2)	1 (1.7)	
	Missed	74 (25.3)	38 (20.9)	8 (22.2)	0 (0.0)	28 (48.3)	
Ki67	Low	50 (17.1)	42 (23.1)	4 (11.1)	0 (0.0)	4 (6.9)	<0.001
	Moderate	78 (26.8)	60 (33.0)	8 (22.2)	2 (12.4)	8 (13.8)	
	High	71 (24.3)	19 (10.4)	10 (27.8)	7 (43.8)	35 (60.3)	
	Missed	93 (31.8)	61 (33.5)	14 (38.9)	7 (43.8)	11 (19.0)	
p53	Positive	78 (26.7)	29 (15.9)	12 (33.3)	7 (41.2)	31 (53.4)	<0.001
	Negative	130 (44.5)	97 (53.3)	9 (25.0)	5 (29.4)	19 (32.8)	
	Missed	84 (28.8)	56 (30.8)	15 (41.7)	5 (29.4)	8 (13.8)	
Tumor size	≤2cm	153 (52.4)	107 (58.8)	11 (30.5)	8 (50.0)	27 (46.6)	0.055
	2.1 to 5cm	113 (38.7)	62 (34.1)	21 (58.3)	6 (37.6)	24 (41.4)	
	≥5.1cm	21 (7.2)	11 (6.0)	2 (5.6)	1 (6.2)	7 (12.0)	
	Missed	5 (1.7)	2 (1.1)	2 (5.6)	1 (6.2)	0 (0.0)	
Lymphnode metastasis	No	140 (48.0)	90 (49.5)	17 (47.2)	8 (50.0)	25 (43.1)	0.999
	Yes	137 (46.9)	88 (48.3)	16 (44.5)	8 (50.0)	25 (43.1)	
	Missed	15 (5.1)	4 (2.2)	3 (8.3)	0 (0.0)	8 (13.8)	

Histological subtype	IDC	242 (82.9)	165 (90.6)	33 (91.7)	14 (87.4)	30 (51.7)	-
	ILC	9 (3.1)	8 (4.4)	0 (0.0)	1 (6.3)	0 (0.0)	
	Others	12 (4.1)	7 (3.9)	3 (8.3)	1 (6.3)	1 (1.7)	
	Missed	29 (9.9)	2 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	27 (46.6)	

1

Sample characteristics for the studied population. Analysis performed through the chi-square test (χ^2), using SPSS Statistics and adopting $p < 0.05$ as the significance level. The number of patients in each group (cancer, LA, LB, HER2+ and TN) indicates the total number of samples analyzed in the study. Not all patients had available data in their medical charts, and the number of patients missing in each analysis is showed by the “missed” number. Bold values indicate statistical significance. “-” indicates that the analysis was not performed for said parameter. LA: Luminal A breast cancer patients. LB: Luminal B breast cancer patients. HER2+: HER2 enriched breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients. IDC: Invasive Ductal Carcinoma. ILC: Invasive Lobular Carcinoma.

From both polymorphisms studied, only rs822335 showed statistically significant results. When comparing the rs822335 genotypes between the cancer subtypes with the control group, only LA and TN showed significant associations ($p = 0.007$; $p = 0.028$, respectively). The allelic distribution between subtypes and controls showed no significant differences (Table 2). When looking at the genetic models, the rs822335T>C dominant model associated with TNBC ($p = 0.009$), while its recessive model associated to LABC ($p = 0.002$) (Table 2). Regarding the comparison between genotypes and clinical parameters, no significant differences were observed (Supplementary tables 1 and 2).

Once the preliminary analyses were performed, we proceeded with logistic regression analyses to determine the variables most strongly associated with the observed differences between groups. Collinearity diagnostics (maximum condition index = 25.0) indicated moderate correlation between Ki-67 and nodal status and a near-dependency involving tumor size. Thus, primary models were adjusted only for age, while tumor features were not included to avoid overadjustment. When analyzing the genotypes for each polymorphism between cancer and control groups, rs822335T>C CT genotype showed a significant distribution difference on the TN subtype (OR: 0.439; CI 95%: 0.231-0.832; $p = 0.012$). On the other hand, the TT genotype was positively associated with the LA subtype (OR: 2.091; CI 95%: 1.086-4.023; $p = 0.027$). Other genotypes and cancer subtypes showed no associations (Table 3).

Considering that LA and TN presented significant differences and can be considered subtypes with opposite prognoses, we conducted another logistic regression adjusted by age to compare them, where both CT and TT rs822335T>C genotypes were associated with TNBC, indicating that the presence of the T allele decreases susceptibility to this specific BC subtype in an additive manner, meaning CT corresponds to a 2-fold decrease in susceptibility (OR: 0.493; CI 95%: 0.254-0.956;

- 1 p=0.036), and TT corresponds to a 3.6-fold decrease (OR: 0.277; CI 95%: 0.104-0.736;
- 2 p=0.010) (Table 4).

1 Table 2. Genotypic, Allelic, and Genetic Model Distribution of CD274 SNVs (rs822335T>C and rs4143815G>C) Among Breast Cancer
2 Subtypes and Controls

<i>rs822335T>C</i>		Controls n (%)	LA n (%)	p-value	LB n (%)	p-value	HER2+ n (%)	p-value	TN n (%)	p-value
Genotypic	CC	65 (32.8)	59 (32.4)	0.008	11 (30.6)	0.181	7 (43.8)	0.102	30 (51.7)	0.028
	CT	111 (56.1)	82 (45.0)		17 (47.2)		5 (31.3)		22 (37.9)	
	TT	22 (11.1)	41 (22.6)		8 (22.2)		4 (25.0)		6 (10.4)	
Allelic	C	241 (60.9)	200 (54.9)	0.098	39 (54.2)	0.286	19 (59.4)	0.868	82 (70.7)	0.053
	T	155 (39.1)	164 (45.1)		33 (45.8)		13 (40.6)		34 (29.3)	
Dominant	CC vs CT+TT	65 (32.8) 133 (67.2)	59 (32.4) 123 (67.6)	0.932	11 (30.6) 25 (69.4)	0.789	7 (43.8) 9 (56.2)	0.374	30 (51.7) 28 (48.3)	0.009
	CC+CT vs TT	176 (88.9) 22 (11.1)	141 (77.5) 41 (22.5)		28 (77.8) 8 (22.2)		12 (75.0) 4 (25.0)		52 (89.7) 6 (10.3)	
<i>rs4143815G>C</i>		Controls n (%)	LA n (%)	p-value	LB n (%)	p-value	HER2+ n (%)	p-value	TN n (%)	p-value
Genotypic	CC	17 (8.6)	18 (9.9)	0.658	4 (11.1)	0.755	2 (12.4)	0.720	6 (10.3)	0.910
	CG	75 (37.9)	75 (41.2)		15 (41.7)		7 (43.8)		21 (36.2)	
	GG	106 (53.5)	89 (48.9)		17 (47.2)		7 (43.8)		31 (53.5)	
Allelic	C	109 (27.5)	111 (30.5)	0.367	23 (31.9)	0.443	11 (34.4)	0.406	33 (28.4)	0.845
	G	287 (72.5)	253 (69.5)		49 (68.1)		21 (65.6)		83 (71.6)	
Dominant	GG vs CG+CC	106 (53.5) 92 (46.5)	89 (48.9) 93 (51.1)	0.367	17 (47.2) 19 (52.8)	0.485	7 (43.8) 9 (56.2)	0.451	31 (53.4) 27 (46.6)	0.991
	CC+CG vs GG	181 (91.4) 17 (8.6)	164 (90.1) 18 (9.9)		32 (88.9) 4 (11.1)		14 (87.5) 2 (12.5)		52 (89.7) 6 (10.3)	

3 Genotypic, allelic and genetic models (dominant and recessive) distribution among each evaluated group, analyzed through the chi-square test
4 (χ^2), using SPSS Statistics and adopting p<0.05 as the significance level. Bold values indicate statistical significance. LA: Luminal A breast cancer
5 patients. LB: Luminal B breast cancer patients. HER2+: HER2 enriched breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients.

1 Table 3. Adjusted logistic regression analysis of genotype distribution differences for *CD274* SNVs (rs822335T>C and rs4143815G>C)
2 between controls and breast cancer subtypes.

<i>rs822335</i> T>C	Controls n (%)	LA n (%)	OR (CI 95%)	p-value	LB n (%)	OR (CI 95%)	p-value	HER2+ n (%)	OR (CI 95%)	p-value	TN n (%)	OR (CI 95%)	p-value
CC	65 (32.8)	59 (32.4)	-	-	11 (30.6)	-	-	7 (43.8)	-	-	30 (51.7)	-	-
CT	111 (56.1)	82 (45.0)	0.841 (0.523-1.350)	0.473	17 (47.2)	0.967 (0.421-2.222)	0.938	5 (31.3)	0.465 (0.139-1.553)	0.213	22 (37.9)	0.439 (0.231-0.832)	0.012
TT	22 (11.1)	41 (22.6)	2.091 (1.086-4.023)	0.027	8 (22.2)	2.255 (0.789-6.443)	0.129	4 (25.0)	1.812 (0.470-6.980)	0.388	6 (10.4)	0.593 (0.216-1.632)	0.312
<i>rs4143815</i> G>C	Controls n (%)	LA n (%)	OR (CI 95%)	p-value	LB n (%)	OR (CI 95%)	p-value	HER2+ n (%)	OR (CI 95%)	p-value	TN n (%)	OR (CI 95%)	p-value
GG	106 (53.5)	89 (48.9)	-	-	17 (47.2)	-	-	7 (43.8)	-	-	31 (53.5)	-	-
CG	75 (38.0)	75 (41.2)	1.427 (0.907-2.243)	0.124	15 (41.7)	1.408 (0.650-3.049)	0.385	7 (43.8)	1.632 (0.538-4.949)	0.387	21 (36.2)	1.081 (0.567-2.062)	0.813
CC	17 (8.5)	18 (9.9)	1.214 (0.563-2.620)	0.621	4 (11.1)	1.636 (0.478-5.595)	0.433	2 (12.4)	2.064 (0.380-11.207)	0.401	6 (10.3)	1.169 (0.415-3.290)	0.768

3 Genotypic distribution among each evaluated group, analyzed through logistic regression adjusted by age, using SPSS Statistics and adopting
4 p<0.05 as the significance level. Bold values indicate statistical significance. LA: Luminal A breast cancer patients. LB: Luminal B breast cancer
5 patients. HER2+: HER2 enriched breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients. OR: odds ratio. CI: confidence interval.
6 Parameters represented by – indicate the reference category.

Table 4. Adjusted logistic regression analysis of genotype distribution differences between Luminal-A and Triple-Negative breast cancer patients.

<i>rs822335T>C</i>	LA n (%)	TN n (%)	OR (CI 95%)	p-value
CC	59 (32.4)	30 (51.7)	-	-
CT	82 (45.1)	22 (37.9)	0.493 (0.254-0.956)	0.036
TT	41 (22.5)	6 (10.4)	0.277 (0.104-0.736)	0.010
<i>rs4143815G>C</i>	LA n (%)	TN n (%)	OR (CI 95%)	p-value
GG	89 (48.9)	31 (53.4)	-	-
CG	75 (41.2)	21 (36.2)	0.770 (0.403-1.470)	0.427
CC	18 (9.9)	6 (10.4)	0.951 (0.338-2.678)	0.925

Genotypic distribution among most frequent cohort breast cancer subtypes (LA and TN), analyzed through logistic regression adjusted by age, using SPSS Statistics and adopting $p < 0.05$ as the significance level. Bold values indicate statistical significance. LA: Luminal A breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients. OR: odds ratio. CI: confidence interval. Parameters represented by – indicate the reference category.

The logistic regression for the genetic models showed that, in the dominant model, the presence of the variant T allele (CT+TT) of rs822335T>C was associated with a reduced susceptibility for TNBC in comparison to the CC genotype ($p=0.013$; OR: 0.465; CI 95%: 0.254-0.851), corresponding to a 2.1-fold decrease in susceptibility. Consequently, rs822335T>C TT showed a 2.3-fold-greater chance of developing LABC in comparison to CC+CT ($p=0.005$; OR: 2.319; CI 95%: 1.285-4.187) (Table 5). We proceeded with the regression comparison between LA and TN samples and observed that both dominant and recessive models represented protection for TNBC development when using LA samples as the reference ($p=0.006$; OR: 0.421; CI 95%: 0.227-0.781; $p=0.049$; OR: 0.396; CI 95%: 0.157-0.997, respectively) (Table 6).

1 Table 5. Adjusted logistic regression analysis of dominant and recessive genetic models between controls and breast cancer
2 subtypes.

<i>rs822335T>C</i>		Controls n (%)	LA n (%)	OR (CI95%)	p-value	LB n (%)	OR (CI95%)	p-value	HER2+ n (%)	OR (CI95%)	p-value	TN n (%)	OR (CI95%)	p-value
Dominant	CC vs CT+TT	65 (32.8) 133 (67.2)	59 (32.4) 123 (67.6)	1.053 (0.673-1.649)	0.820	11 (30.6) 25 (69.4)	1.185 (0.542-2.591)	0.670	7 (43.8) 9 (56.2)	0.695 (0.244-1.984)	0.497	30 (51.7) 28 (48.3)	0.465 (0.254-0.851)	0.013
Recessive	CC+CT vs TT	176 (88.9) 22 (11.1)	141 (77.5) 41 (22.5)	2.319 (1.285-4.187)	0.005	28 (77.8) 8 (22.2)	2.306 (0.919-5.783)	0.075	12 (75.0) 4 (25.0)	2.687 (0.777-9.297)	0.119	52 (89.7) 6 (10.3)	0.913 (0.348-2.395)	0.854
<i>rs4143815G>C</i>		Controls n (%)	LA n (%)	OR (CI95%)	p-value	LB n (%)	OR (CI95%)	p-value	HER2+ n (%)	OR (CI95%)	p-value	TN n (%)	OR (CI95%)	p-value
Dominant	GG vs CG+CC	106 (53.5) 92 (46.5)	89 (48.9) 93 (51.1)	1.382 (0.903-2.117)	0.136	17 (47.2) 19 (52.8)	1.451 (0.702-3.000)	0.315	7 (43.8) 9 (56.2)	1.712 (0.603-4.861)	0.312	31 (53.4) 27 (46.6)	1.101 (0.603-2.010)	0.755
Recessive	CC+CG vs GG	181 (91.4) 17 (8.6)	164 (90.1) 18 (9.9)	1.048 (0.498-2.205)	0.902	32 (88.9) 4 (11.1)	1.416 (0.435-4.603)	0.563	15 (88.2) 2 (11.8)	1.671 (0.335-8.329)	0.531	52 (89.7) 6 (10.3)	1.130 (0.415-3.078)	0.811

3 Distribution of the dominant and recessive genetic models among each evaluated group, analyzed through logistic regression adjusted by age,
4 using SPSS Statistics and adopting p<0.05 as the significance level. Bold values indicate statistical significance. LA: Luminal A breast cancer
5 patients. LB: Luminal B breast cancer patients. HER2+: HER2 enriched breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients. OR:
6 odds ratio. CI: confidence interval.

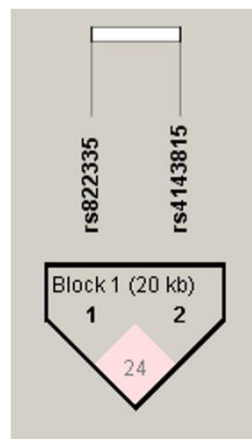
1 Table 6. Adjusted logistic regression analysis of dominant and recessive genetic
2 models differences between Luminal-A and Triple-Negative breast cancer samples.

<i>rs822335T>C</i>		LA n (%)	TN n (%)	OR (CI 95%)	p-value
Dominant	CC vs CT+TT	59 (32.4) 123 (67.6)	30 (51.7) 28 (48.3)	0.421 (0.227-0.781)	0.006
Recessive	CC+CT vs TT	141 (77.5) 41 (22.5)	52 (89.7) 6 (10.3)	0.396 (0.157-0.997)	0.049
<i>rs4143815G>C</i>		LA n (%)	TN n (%)	OR (CI 95%)	p-value
Dominant	GG vs CG+CC	89 (48.9) 93 (51.1)	31 (53.4) 27 (46.6)	0.804 (0.440-1.471)	0.479
Recessive	CC+CG vs GG	164 (90.1) 18 (9.9)	52 (89.7) 6 (10.3)	1.062 (0.391-2.889)	0.906

3 Distribution of the dominant and recessive genetic models among the most frequent cohort
4 breast cancer subtypes (LA and TN), analyzed through logistic regression adjusted by age,
5 using SPSS Statistics and adopting $p < 0.05$ as the significance level. Bold values indicate
6 statistical significance. LA: Luminal A breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer
7 patients. OR: odds ratio. CI: confidence interval.

Linkage disequilibrium analysis showed a high LOD-score (3.56), but weak correlation ($r^2=0.036$) and D' (0.245) (Figure 1). Haplotype inference confirmed all 4 possible haplotypes, C-G, C-C, T-C and T-G, all of them presenting a population frequency above 5%, allowing their inclusion in statistical analysis (Table 7). SNVs alleles in haplotype structure follow the order rs822335T>C, rs4143815G>C. The distribution among groups can also be visualized through the Sankey plot in Figure 2. For haplotype analysis, each of them was categorized as homozygote, heterozygote or others, aiming to evaluate if the presence or absence of each specific haplotype could present significant differences between controls and cancer subtypes. When comparing each cancer subtype group against the controls, the haplotypes C-G and T-G correlated with TNBC ($p=0.034$; $p=0.023$, respectively) and were marginally insignificant in the LA group ($p=0.067$; $p=0.064$, respectively). (Table 8). Since C-G and T-G were significantly relevant in the preliminary analysis, we proceeded to a multivariable logistic regression analysis to evaluate the groups in detail.

Figure 1. Linkage disequilibrium plot and associated data.



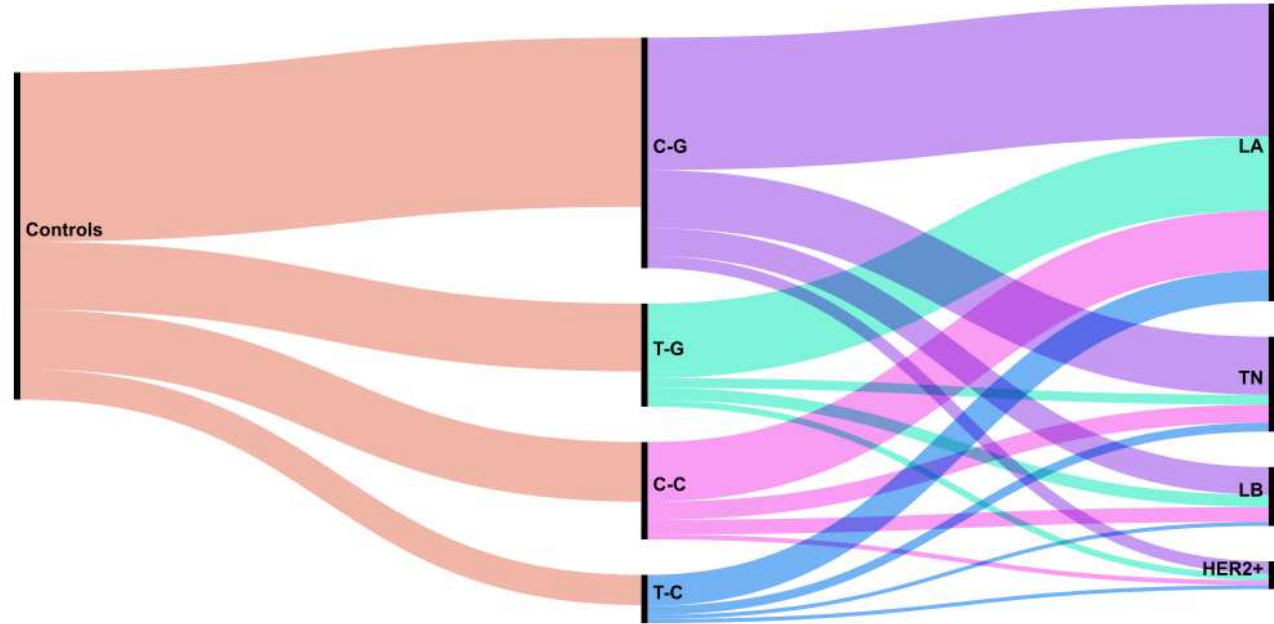
Haploview linkage disequilibrium analysis, showing the LD plot. LD plot shows weak correlation between the evaluated *CD274* SNVs, confirmed by the low coefficient of determination value ($r^2=0.036$) as well as the low strength of association measured through D' ($D'=0.245$). The logarithm of the odds value indicates the reliability of the data observed (LOD=3.56).

1 Table 7. Distribution of *CD274* Haplotypes in the studied population.

	Total n (%)	Controls n (%)	LA n (%)	LB n (%)	HER2+ n (%)	TN n (%)
C-G	485 (49.5)	204 (51.5)	162 (44.5)	34 (47.2)	14 (43.8)	71 (61.2)
T-G	208 (21.2)	83 (21.0)	91 (25.0)	15 (20.8)	7 (21.9)	12 (10.3)
C-C	96 (9.8)	37 (9.3)	38 (10.4)	5 (7.0)	5 (15.6)	11 (9.5)
T-C	191 (19.5)	72 (18.2)	73 (20.1)	18 (25.0)	6 (18.7)	22 (19.0)

2 Haplotype frequencies in the studied cohort, showing the total of haplotypes present in the
3 sample, and their distribution among each evaluated group. SNVs alleles in haplotype
4 structures follow the order rs822335T>C, rs4143815G>C. LA: Luminal A breast cancer
5 patients. LB: Luminal B breast cancer patients. HER2+: HER2 enriched breast cancer patients.
6 TN: Triple Negative breast cancer patients.

7 Figure 2. Sankey plot of haplotype distribution among the evaluated groups.



8 The Sankey plot depicts haplotype distribution across the groups. Nodes on the center
9 represent the haplotypes, the node on the left corresponds to the control group, and nodes on
10 the right correspond to the cancer subtype groups. Width from the links indicates the relative
11 frequency of each haplotype within the groups. SNVs alleles in haplotype structures follow the
12 order rs822335T>C, rs4143815G>C. Figure created with RAWGraphs 2.0. LA: Luminal A
13 breast cancer patients. LB: Luminal B breast cancer patients. HER2+: HER2 enriched breast
14 cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients.

1 Table 8. Influence of Sample Haplotypes on Breast Cancer Susceptibility and Tumor Subtypes

<i>Haplotypes</i>		Controls n (%)	LA n (%)	p-value	LB n (%)	p-value	HER2+ n (%)	p-value	TN n (%)	p-value
C-G	C-G/C-G	42 (21.2)	31 (17.0)	0.067	8 (22.2)	0.364	4 (25.0)	0.119	22 (37.9)	0.034
	C-G/Others	120 (60.6)	100 (55.0)		18 (50.0)		6 (37.5)		27 (46.6)	
	Others/Others	36 (18.2)	51 (28.0)		10 (27.8)		6 (37.5)		9 (15.5)	
T-G	T-G/T-G	7 (3.5)	17 (9.3)	0.064	2 (5.6)	0.774	1 (6.3)	0.840	1 (1.7)	0.023
	T-G/Others	69 (34.8)	57 (31.3)		11 (30.6)		5 (31.3)		10 (17.2)	
	Others/Others	122 (61.7)	108 (59.3)		23 (63.9)		10 (62.4)		47 (81.0)	
C-C	C-C/C-C	5 (2.5)	4 (2.2)	0.730	0 (0.0)	0.628	1 (6.2)	0.563	1 (1.7)	0.886
	C-C/Others	27 (13.6)	30 (16.5)		5 (13.9)		3 (18.8)		9 (15.5)	
	Others/Others	166 (83.9)	148 (81.3)		31 (86.1)		12 (75.0)		48 (82.8)	
T-C	T-C/T-C	3 (1.5)	8 (4.4)	0.241	2 (5.6)	0.218	0 (0.0)	0.846	3 (5.2)	0.217
	T-C/Others	66 (33.3)	57 (31.3)		14 (38.9)		6 (37.5)		16 (27.6)	
	Others/Others	129 (65.2)	117 (64.3)		20 (55.6)		10 (62.5)		39 (67.2)	

2 Comparison between haplotype distribution among each evaluated group performed through the chi-square test (χ^2), or Fisher's exact test when
3 necessary, using SPSS Statistics and adopting $p < 0.05$ as the significance level. Bold values indicate statistical significance. SNVs alleles in
4 haplotype structures follow the order rs822335T>C, rs4143815G>C. LA: Luminal A breast cancer patients. LB: Luminal B breast cancer patients.
5 HER2+: HER2 enriched breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients.

For the regression analysis, we applied the same approach used for the genetic models, dividing each haplotype into dominant and recessive models. For the C-G dominant model, compared to controls, the presence of C-G haplotype was associated with an almost 1.7-fold decreased susceptibility to LABC in comparison to its absence (OR: 0.592; CI 95%: 0.361-0.971; p=0.038). Conversely, in the C-G recessive model, we observed that C-G in homozygosis increased susceptibility to TNBC by almost 2.2 times (OR: 2.170; CI 95%: 1.151-4.092; p=0.017). Regarding the T-G haplotype, the results were opposite: in the dominant model, its presence was associated with a 2.6-fold decreased susceptibility TNBC (OR: 0.379; CI 95%: 0.185-0.778; p=0.008), and no associations were found in its recessive model. These results are summarized in Table 9.

1 Table 9. Influence of *CD274* C-G and T-G haplotypes on breast cancer subtypes compared to controls.

C-G Haplotype		Controls n (%)	LA n (%)	OR (CI95%)	p-value	LB n (%)	OR (CI95%)	p-value	HER2+ n (%)	OR (CI95%)	p-value	TN n (%)	OR (CI95%)	p-value
Dominant	Others/Others vs C-G/Others +C-G/C-G	36 (18.2) 162 (81.8)	51 (28.0) 131 (72.0)	0.592 (0.361-0.971)	0.038	10 (27.8) 26 (72.2)	0.580 (0.257-1.309)	0.190	6 (37.5) 10 (62.5)	0.373 (0.127-1.093)	0.072	9 (15.5) 49 (84.5)	1.223 (0.550-2.722)	0.621
Recessive	Others/Others +C-G/Others vs C-G/C-G	156 (78.8) 42 (21.2)	151 (83.0) 31 (17.0)	0.717 (0.425-1.211)	0.214	28 (77.8) 8 (22.2)	1.042 (0.441-2.459)	0.926	12 (75.0) 4 (25.0)	1.199 (0.366-3.923)	0.764	36 (62.1) 22 (37.9)	2.170 (1.151-4.092)	0.017
T-G Haplotype		Controls n (%)	LA n (%)	OR (CI95%)	p-value	LB n (%)	OR (CI95%)	p-value	HER2+ n (%)	OR (CI95%)	p-value	TN n (%)	OR (CI95%)	p-value
Dominant	Others/Others vs T-G/Others +T-G/T-G	122 (61.6) 76 (38.4)	108 (59.3) 74 (40.7)	1.131 (0.743-1.722)	0.565	23 (63.9) 13 (36.1)	0.910 (0.435-1.904)	0.802	10 (62.5) 6 (37.5)	0.969 (0.338-2.776)	0.953	47 (81.0) 11 (19.0)	0.379 (0.185-0.778)	0.008
Recessive	Others/Others +T-G/Others vs T-G/T-G	191 (96.5) 7 (3.5)	165 (90.7) 17 (9.3)	2.405 (0.961-6.017)	0.061	34 (94.4) 2 (5.6)	1.543 (0.305-7.799)	0.600	15 (98.3) 1 (1.7)	1.692 (0.193-14.828)	0.635	57 (98.3) 1 (1.7)	0.426 (0.051-3.550)	0.430

2 Haplotypic distribution of the dominant and recessive genetic models among each evaluated group, analyzed through logistic regression adjusted
3 by age, using SPSS Statistics and adopting p<0.05 as the significance level. Bold values indicate statistical significance. LA: Luminal A breast
4 cancer patients. LB: Luminal B breast cancer patients. HER2+: HER2 enriched breast cancer patients. TN: Triple Negative breast cancer patients.
5 OR: odds ratio. CI: confidence interval.

Discussion

In the current study, we investigated the influence of two SNVs from the *CD274* gene, rs4143815C>G and rs822335T>C, on BC susceptibility by comparing a group of samples of women without cancer to a group of BC patients. In addition, we explored whether these variants were associated with clinical characteristics of the disease by comparing two distinct subtypes of BC, LA, which is generally associated with more favorable clinical features and TN, which typically presents more aggressive behavior and least favorable prognosis. We also confirmed the association of prognostic markers, such as Ki67 and p53, as well as more advanced disease staging, with TNBC. To our knowledge, this is the first study to date to evaluate the rs822335T>C polymorphism in the context of BC, as well as the first to investigate the combined effect of both polymorphisms in this setting.

The *CD274* rs822335T>C SNV presented statistically significant results in our cohort. This SNV is relatively less studied in comparison to rs4143815C>G, with few published analyses regarding its influence on gene expression or protein function. The stronger hypothesis surrounding its effects consists in its evaluation through *in silico* analysis, which shows that the location of rs822335T>C in the promoter region of *CD274* is considered a gene enhancer (MOKSUD et al., 2023), with the CC genotype being associated to an increased PD-L1 expression in tumor cells from non-small lung cancer patients (NSCLC) (KRAWCZYK et al., 2019).

The responses we found were congruent. When analyzing genotypic and allelic distribution among groups, rs822335T>C C allele and CC genotype were more frequent in the TNBC patients when compared to controls as well as to LABC patients. Additionally, the T allele and TT genotype were more frequent among LABC patients, conferring a 2-fold greater chance of developing this specific BC subtype in comparison to controls. Reasonably, the TT genotype was considered protective for TNBC when compared to LABC. The heterozygotes for this SNV also showed significant protection for TNBC development, suggesting that the strength of the association is driven primarily by the alleles. Regarding the rs4143815C>G SNV, we hypothesized that the C allele could be associated with unfavorable clinical features in BC, based on previous reports indicating reduced degradation of *CD274* mRNA (YANG et al., 2024). This effect is related to the interference this SNV might cause to the

ligation of miR-570, a microRNA responsible for the degradation of mRNA via its binding to the 3'UTR region of *CD274* (WANG et al., 2013; YANG et al., 2024). However, in our studied Brazilian cohort, we did not observe the expected association.

Based on the results, it is possible to hypothesize that the C allele is strongly associated with TNBC development, while the T allele shows a weaker association with LABC. That can be said through the observation of the protection generated for TNBC when the C allele is lost, with the heterozygotes CT presenting 2-fold lower chance of its development, while the TT homozygotes present almost double the protection, 3.6-fold lower chance for its development in comparison to LABC. For haplotype analysis, the results were consistent. The C-G haplotype carriers had a 2.1-fold increase in TNBC susceptibility, while presenting an almost 1.7-fold decrease in LABC susceptibility. On the other hand, the T-G haplotype carriers showed a 2.6 times lower chance of developing TNBC in comparison to other haplotypes combinations, from which the ones containing C-G are the most frequent, confirming the consistency from the allele association obtained for rs822335T>C. These results suggest that, even though the analyses of rs4143815G>C showed no significant results, the presence of its variant C allele in the haplotype structure appears to abrogate the influence of the rs822335T>C alleles. Thus, the differences are primarily driven by rs822335T>C alleles, with C being strongly associated with TNBC, while T shows association with LABC, with the effects repeating themselves in haplotype structure only in the presence of rs4143815G>C G allele.

The association from rs822335T>C CC genotype with TNBC can also be explained by the evolutionary advantage provided by PD-L1 overexpression, considering its strong association with the coercion process, facilitating immune evasion (GALASSI et al., 2024). TN tumors are highly immunogenic, carrying a high mutational load, and consequently, higher expressions of immunosuppressive genes, such as *PDCD1* and *CD274*, facts that can even influence the prognosis of TNBC patients in comparison to one another (LOIZIDES; CONSTANTINIDOU, 2023; MARTÍNEZ-CANALES et al., 2017). Considering these cells could be very different from the normal mammary tissue, the presence of a genetic variant which can help boost even more the coercion process through PD-L1 overexpression could be relevant to help explain mechanisms behind TNBC development. In contrast, the TT

1 genotype, which supposedly doesn't influence PD-L1 expression, is correlated with
2 LABC, the mammary tumor with the best prognosis.

3 In BC, the predictive value of PD-L1 as a prognostic marker is
4 contradictory. When considering immunotherapy responses, higher PD-L1
5 expressions can be seen as a benefit, since the PD-L1/PD-1 axis is highly targeted
6 (CHENG et al., 2024; LI et al., 2025; SONG et al., 2024). This is strengthened by the
7 fact that NSCLC patients with higher PD-L1 expression in tumor cells due to the
8 presence of the rs822335T>C CC genotype, have lower risk of progression and death
9 when treated with pembrolizumab or nivolumab (GREENDA et al., 2021). On the other
10 hand, when looking at the tumor's development itself, including in BC, increased PD-
11 L1 expressions is usually linked to an increased potential of immune evasion, and
12 further correlate with larger tumor size (BAPTISTA et al., 2016; SANAD et al., 2024),
13 and an elevated potential of lymphnode metastasis, being associated with poorer
14 clinicopathological features (BAPTISTA et al., 2016).

15 The PD-L1/PD-1 axis main function is the attenuation of T cell
16 activation, leading to the T cell exhaustion process (YONG et al., 2025).
17 Physiologically, PD-L1 is upregulated in the presence of anti-inflammatory cytokines,
18 aiming to limit tissue damage caused by the inflammation process (YAMAGUCHI et
19 al., 2022). In tumor development, cytotoxic T cells are key cells in the recognition and
20 elimination of potential tumor cells before they start to multiply. Considering the role of
21 the PD-L1/PD-1 axis as a suppressor of T cell activity, the expression of PD-L1 in the
22 tumor microenvironment can be used as a mechanism of immune evasion by tumor
23 cells, a process known as coercion (GALASSI et al., 2024; YAMAGUCHI et al., 2022).
24 The coercion process consists in a blockade of immune activation, especially through
25 the overexpression of immunomodulatory ligands. Hence, higher expression of PD-L1
26 by tumor cells is usually related to poorer prognostic and overall survival (WU et al.,
27 2015).

28 Although the influence of individual polymorphisms in cancer
29 development might be seen as very small, comprehending the role of each of them is
30 essential for understanding the variables which can influence the appearance and the
31 outcomes of various malignancies. Apart from that, the genome-wide association
32 studies (GWASs), are emerging as the future of cancer risk prediction and prevention
33 (WANG et al., 2021). Through GWASs, various SNVs have already been categorized

as markers for cancer risk, and their effects across all genes are combined to generate a polygenic risk score (PRSs), which facilitates the evaluation of cancer risk arising from susceptibility SNVs (KHERA et al., 2018; WANG et al., 2021).

In BC, mutations in susceptibility genes, such as *BRCA1* and *BRCA2* among others, are highly associated with tumor development, but only account for a small percentage of all BCs developed (MAVADDAT et al., 2019). In contrast, GWASs have identified over 150 susceptibility loci related to BC, and their combined effect is estimated to explain up to 40% of the disease's heritability, specially that attributable to common low penetrance variants (MAVADDAT et al., 2019; MICHAILIDOU et al., 2017). Thus, the evaluation of the effect from SNVs in cancer is highly relevant, even when considering the small individual risk originating from them, to contribute for the optimization of PRSs prediction of risk and prognostic, as well as to better understand the general influence of SNVs in gene expression and protein function. Here, we provide evidence of association between a *CD274* SNV, rs822335, with BC susceptibility and prognosis.

It is important to acknowledge some limitations of the present study, such as the relatively small sample size, particularly for the LB and HER2+ subgroups, and the limited availability of clinical data in some patients' medical records. Despite these limitations, this is the first study to analyze these polymorphisms in combination within the context of breast cancer. The haplotype analysis, along with the robust statistical evaluation of polymorphisms and clinical features, provides reliable and meaningful insights into the studied cohort. Additionally, the inclusion of a highly admixed Brazilian population — a group typically underrepresented in genetic association studies, which are predominantly conducted in Asian or European populations — enhances the significance and applicability of our findings.

Conclusions

Our findings indicate that although the rs4143815G>C variant does not influence the development and prognosis of BC, the rs822335T>C shows a relevant association with BC susceptibility in a subtype specific manner, with the C allele being more frequent in TNBC cases, and the T allele being more prevalent in LABC cases.

Acknowledgments

The authors thank the Londrina Cancer Hospital, the Clinics Hospital of the State University of Londrina, the Experimental Pathology Postgraduate Program; CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; and CNPq—Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Funding Statement

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

1 Supplementary table 1. Comparison between rs822335 genotypes and available clinical parameters.

CD274 rs822335T>C		CC genotype n (%)	CT Genotype n (%)	TT Genotype n (%)	p-value
Stage (n=218)	I	10 (13.3)	15 (15.0)	8 (18.6)	0.437
	II	38 (50.7)	44 (44.0)	19 (44.2)	
	III	27 (36.0)	37 (37.0)	13 (30.2)	
	IV	0 (0.0)	4 (4.0)	3 (7.0)	
Ki67 (n=200)	Low	18 (26.1)	17 (18.9)	15 (36.6)	0.268
	Moderate	25 (36.2)	40 (44.4)	14 (34.1)	
	High	26 (37.7)	33 (36.7)	12 (29.3)	
p53 (n=209)	Positive	27 (37.5)	40 (42.1)	12 (28.6)	0.321
	Negative	45 (62.5)	55 (57.9)	30 (71.4)	
Tumor size (n=288)	≤2cm	58 (54.2)	63 (51.2)	33 (56.9)	0.886
	2.1 to 5cm	41 (38.3)	52 (42.3)	20 (34.5)	
	≥5.1cm	8 (7.5)	8 (6.5)	5 (8.6)	
Lymphnode metastasis (n=278)	No	55 (53.9)	60 (50.0)	26 (46.4)	0.652
	Yes	47 (46.1)	60 (50.0)	30 (53.6)	

2 Comparison between genotypes from the rs822335 SNV and available clinical parameters, analyzed through the chi-square test (χ^2), using SPSS
3 Statistics and adopting $p < 0.05$ as the significance level. Not all patients had available data in their medical charts, and the number of patients
4 showed in each parameter (stage, Ki67, p53, tumor size and lymphnode metastasis) indicates the number of samples used for each analysis.

1 Supplementary table 2. Comparison between rs4143815 genotypes and available clinical parameters.

CD274 rs4143815G>C		CC genotype n (%)	CG Genotype n (%)	GG Genotype n (%)	p-value
Stage (n=218)	I	6 (31.6)	14 (14.7)	13 (12.5)	0.394
	II	7 (36.8)	44 (46.3)	50 (48.1)	
	III	6 (31.6)	35 (36.8)	36 (34.6)	
	IV	0 (0.0)	2 (2.1)	5 (4.8)	
Ki67 (n=200)	Low	3 (16.7)	26 (30.6)	21 (21.6)	0.428
	Moderate	6 (33.3)	32 (37.6)	41 (42.3)	
	High	9 (50.0)	27 (31.3)	35 (36.1)	
p53 (n=209)	Positive	10 (43.5)	25 (29.8)	44 (43.1)	0.145
	Negative	13 (56.5)	59 (70.2)	58 (56.9)	
Tumor size (n=288)	≤2cm	14 (46.7)	58 (50.0)	82 (57.7)	0.644
	2.1 to 5cm	13 (43.3)	50 (43.1)	50 (35.2)	
	≥5.1cm	3 (10.0)	8 (6.9)	10 (7.0)	
Lymphnode metastasis (n=278)	No	14 (50.0)	61 (52.6)	66 (49.3)	0.868
	Yes	14 (50.0)	55 (47.4)	68 (50.7)	

2 Comparison between genotypes from the rs4143815 SNV and available clinical parameters, analyzed through the chi-square test (χ^2), using
3 SPSS Statistics and adopting p<0.05 as the significance level. Not all patients had available data in their medical charts, and the number of
4 patients showed in each parameter (stage, Ki67, p53, tumor size and lymphnode metastasis) indicates the number of samples used for each
5 analysis.

References

BAPTISTA, Mauricio Z. et al. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. **Human Pathology**, v. 47, n. 1, 2016.

CHENG, Weishi et al. Dual blockade immunotherapy targeting PD-1/PD-L1 and CTLA-4 in lung cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 17, n. 1, p. 54, 27 jul. 2024.

CURA, Yasmin et al. Genetic polymorphisms on the effectiveness or safety of breast cancer treatment: Clinical relevance and future perspectives. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, 2021.

DARVIN, Pramod; SASIDHARAN NAIR, Varun; ELKORD, Eyad. PD-L1 Expression in Human Breast Cancer Stem Cells Is Epigenetically Regulated through Posttranslational Histone Modifications. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.

DERMANI, Fatemeh K. et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, 2019.

FINN, Olivera J. A Believer's Overview of Cancer Immunosurveillance and Immunotherapy. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 2, 2018.

GALASSI, Claudia et al. The hallmarks of cancer immune evasion. **Cancer Cell**, v. 42, n. 11, p. 1825–1863, 11 nov. 2024.

GRENDAL, Anna et al. Tissue MicroRNA Expression as a Predictor of Response to Immunotherapy in NSCLC Patients. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 8 fev. 2021.

KHERA, Amit V. et al. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. **Nature Genetics**, 2018.

KRAWCZYK, Paweł et al. PD-L1 gene copy number and promoter polymorphisms regulate PD-L1 expression in tumor cells of non-small cell lung cancer patients. **Cancer Genetics**, v. 237, 2019.

KROEMER, Guido et al. Immunosurveillance in clinical cancer management. CA: A **Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 2, 2024.

LI, Hongshu et al. Progress of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in the treatment of triple-negative breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 25, n. 1, p. 139, 10 abr. 2025.

LOIZIDES, Sotiris; CONSTANTINIDOU, Anastasia. Triple negative breast cancer: Immunogenicity, tumor microenvironment, and immunotherapy. **Frontiers in Genetics**, 2023.

MARTÍNEZ-CANALES, Sandra et al. Transcriptomic immunologic signature associated with favorable clinical outcome in basal-like breast tumors. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 2017.

MAVADDAT, Nasim et al. Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. **American Journal of Human Genetics**, v. 104, n. 1, 2019.

MICHAILIDOU, Kyriaki et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. **Nature**, v. 551, n. 7678, 2017.

MOKSUD, Nafeesa et al. Common inherited variants of PDCD1, CD274 and HAVCR2 genes differentially modulate the risk and prognosis of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, n. 9, 2023.

NASCIMENTO, Renan Gomes do; OTONI, Kaléu Mormino. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, 2020.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism Database. Bethesda: National Library of Medicine, [s.d.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Acesso em: 20 mai. 2025.

PANTEL, Klaus; ALIX-PANABIÈRES, Catherine. Crucial roles of circulating tumor cells in the metastatic cascade and tumor immune escape: biology and clinical translation. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, 2022.

SANAD, Amal Mostafa et al. Is Programmed Death Ligand 1 of Prognostic Significance in Triple Negative Female Mammary Carcinoma? **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 12, n. 1, 2024.

SONG, Dandan et al. Efficacy and safety of PD-1/PD-L1 and CTLA-4 immune checkpoint inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 1 nov. 2024.

SUN, Yi Sheng et al. Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, 2017.

WANG, Weipeng et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. **Human Genetics**, v. 132, n. 6, 2013.

WANG, Yuzhuo et al. Polygenic risk scores: The future of cancer risk prediction, screening, and precision prevention. **Medical Review**, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Breast Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>. Acesso em: 01 jun 2025.

WU, Pin et al. PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

YAMAGUCHI, Hirohito et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics. **Nature Reviews Clinical Oncology**, 2022.

YANG, Jing et al. Elevated programmed cell death-1 protein/ligand (PD-1/PD-L1) and variants are associated with susceptibility to multiple myeloma: a case-control study in the Chinese cohort. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 43, n. 3, 2024.

YONG, Xin et al. Regulation of the CD8+ T cell and PDL1/PD1 axis in gastric cancer: Unraveling the molecular landscape. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 212, p. 104750, ago. 2025.

6 CONCLUSÃO

- O polimorfismo rs822335T>C de *CD274* apresentou associações significativas com o desenvolvimento dos tumores TN e LA, enquanto rs4143815G>C não demonstrou associações estatisticamente relevantes;
- A frequência do alelo C e do genótipo CC de rs822335T>C foi significativamente maior no grupo amostral TN, tanto em comparação com controles quanto em comparação com as amostras de paciente com prognóstico teoricamente mais favorável, do grupo LA. Em contrapartida, o alelo T e o genótipo TT foram mais frequentes no grupo amostral LA, e se associaram com maiores chances de desenvolvimento deste subtipo tumoral;
- Com relação aos haplótipos, T-G foi considerado protetor para o desenvolvimento do CMTN, sugerindo chances cerca de 2,6 vezes menor em comparação com as outras combinações possíveis. Em contrapartida, C-G foi considerado fator de suscetibilidade para o CMTN, e protetor para CMLA;
- Não foram encontradas associações entre genótipos e haplótipos e parâmetros clinicopatológicos ou idade das mulheres com amostras avaliadas.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos/Uel

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de marcadores imunológicos da resposta reguladora em pacientes com câncer de mama

Pesquisador: Karen Brajão de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 84352124.7.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de PG em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 7.234.208

Apresentação do Projeto:

"O câncer de mama é uma das neoplasias mais prevalentes em mulheres, apresenta grande heterogeneidade molecular, assim como uma grande diversidade de respostas imunológicas no microambiente tumoral. Evidências sugerem que a interação entre o sistema imunológico e o tumor pode influenciar a progressão da doença e a resposta terapêutica. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo geral avaliar polimorfismos genéticos e a expressão de quimiocinas, citocinas e seus receptores, envolvidos na resposta imune regulatória, para verificar suas implicações no microambiente tumoral do câncer de mama. Para isso, será conduzido um estudo de associação caso-controle, envolvendo pacientes com câncer de mama de diferentes subtipos moleculares e doadoras livres de neoplasia. O estudo envolverá 100 pacientes com câncer de mama de diferentes subtipos moleculares e 200 mulheres saudáveis para compor o grupo controle. Além disso, serão utilizadas 300 amostras já armazenadas em um biorrepositório, formadas no contexto de um projeto prévio aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (parecer nº 2.111.839, CAAE: 68201417.0.0000.5231). A coleta de novas amostras será realizada durante o atendimento clínico no Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e no Hospital das Clínicas da UEL (HC-UEL). Serão avaliados os polimorfismos genéticos e a expressão de genes relacionados à resposta imune regulatória, utilizando amostras de DNA e RNA, respectivamente, obtidas de tecidos tumorais e normais adjacentes, enquanto a expressão proteica de marcadores imunológicos será analisada por imunohistoquímica em

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

amostras de tecidos incluídos em parafina, assim como serão avaliadas por ELISA em amostras de soro. O estudo investigará ainda a expressão de moléculas envolvidas na resposta imune regulatória e sua relação com infiltrados leucocitários e células tumorais, correlacionando esses dados com parâmetros clínicos e histopatológicos. A partir dessas análises, buscase identificar potenciais biomarcadores específicos para cada subtipo molecular de câncer de mama, contribuindo para um maior entendimento da patogênese da doença e abrindo caminho para a inclusão de novos marcadores na prática clínica. O projeto visa, assim, não apenas ampliar o conhecimento sobre os mecanismos imunológicos no câncer de mama, mas também identificar possíveis marcadores prognósticos e preditivos, auxiliando no desenvolvimento de terapias mais personalizadas e eficazes.

Hipótese: A hipótese deste estudo é que polimorfismos genéticos e a expressão de quimiocinas, citocinas e seus receptores, envolvidos na resposta imune regulatória, influenciam o microambiente tumoral no câncer de mama, variando de acordo com os diferentes subtipos moleculares da doença. Podendo estar associados à progressão do câncer, e assim ao comportamento tumoral e prognóstico das pacientes, podendo assim servir como potenciais biomarcadores para a identificação de subtipos tumorais específicos e contribuir para o desenvolvimento de terapias mais direcionadas e eficazes."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

". Avaliar polimorfismos genéticos e expressão de quimiocinas, citocinas e seus receptores, envolvidos na resposta imune regulatória, e verificar suas implicações no microambiente tumoral no câncer de mama.

Objetivo Secundário:

- . Avaliar os polimorfismos genéticos e expressão de genes relacionados a resposta imune regulatória e à patogênese do câncer de mama em pacientes com câncer mamário de diferentes subtipos moleculares e em doadoras livres de neoplasia, num estudo de associação do tipo casocontrole;
- . Avaliar a expressão de RNAm por qPCR de moléculas relacionadas a resposta imune regulatória e à patogênese do câncer de mama, em materiais incluídos em parafina de tecidos tumorais e normais adjacentes mamários de diferentes subtipos moleculares;
- . Comparar por imuno-histoquímica a expressão de marcadores imunológicos envolvidos na resposta imune regulatória relevantes na presença de infiltrados leucocitários e células tumorais, com parâmetros clínicos e histopatológicos das pacientes, principalmente os

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

Continuação do Parecer: 7.234.208

parâmetros TNM, em busca de marcadores específicos para cada subtipo molecular;
. Avaliar de modo geral os marcadores propostos no projeto, com o intuito de identificar os que se destaquem, principalmente dentro dos subtipos moleculares, visando aumentar o conhecimento e contribuir com a possível inclusão de biomarcadores adicionais à rotina clínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

"A coleta de amostras de sangue pode gerar desconforto ou eventos adversos mínimos, como hematomas ou leve dor no local da punção. Entretanto, esses riscos são baixos e gerenciáveis, já que os procedimentos serão realizados por profissionais capacitados. Em relação à obtenção do tecido tumoral, não há riscos adicionais decorrentes da participação na pesquisa, uma vez que o tecido tumoral será removido para diagnóstico, e/ou estadiamento e/ou tratamento. Em relação aos riscos relacionados à privacidade das participantes, informamos que as amostras e dados serão codificados para proteger a identidade dos participantes, minimizando esses riscos. Os pesquisadores comprometem-se a acolher as participantes de pesquisa, caso ocorra qualquer desconforto.

Benefícios:

Este estudo não trará benefícios diretos às participantes de pesquisa, contudo contribuirá para a ampliação do conhecimento sobre o papel de polimorfismos genéticos e da resposta imune regulatória no microambiente tumoral do câncer de mama, o que poderá auxiliar na identificação de novos biomarcadores e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais precisas e personalizadas."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto
. Devidamente preenchida e assinada pela coordenação do Programa de Pós Graduação em Patologia experimental.
2. Cronograma
. Início do estudo previsto para 13/01/2025.
3. Orçamento
. Detalhado. financiamento próprio.
4. Riscos e Benefícios

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

Continuação do Parecer: 7.234.208

. Adequadamente descritos nas Informações básicas e nos TCLEs, incluindo os cuidados que serão tomadas para minimizá-los.

5. TCLE

. Apresentado os documentos do estudo anterior e dois novos TCLEs (controle e pacientes)

. Apresentam todas as recomendações normativas.

6. Termo de Sigilo e Confidencialidade.

. Declara uso de fontes secundárias e apresentou termo de sigilo e confidencialidade assinado.

7. Apresentou termo de anuência da Instituição coparticipante assinada pela Direção superintendente do Hospital Universitário. O Hospital de Câncer autorizou o estudo anterior cujo Parecer consubstanciado foi anexado.

8. Declara retenção de amostras para armazenamento em banco

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

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.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;
- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

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

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br