



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELA RUDGERI DEROSI

**“ANÁLISE DO POLIMORFISMO *CCR5-delta32E* DA EXPRESSÃO  
PROTEICA DE CCL5 EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM  
CARCINOMA MAMÁRIO”**

---

Londrina  
2017

DANIELA RUDGERI DEROSI

**“ANÁLISE DO POLIMORFISMO *CCR5-delta32E* DA EXPRESSÃO  
PROTEICA DE CCL5 EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM  
CARCINOMA MAMÁRIO”**

Tese apresentada ao programa de Doutorado em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus  
Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Losi  
Guembarovski

Londrina  
2017

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

Derossi, Daniela Rudgeri .

Análise do Polimorfismo CCR5-delta32 e da expressão proteica de CCL5 em amostras de pacientes com carcinoma mamário / Daniela Rudgeri Derossi. - Londrina, 2017. 67 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Coorientador: Roberta Losi Guembarovski.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de mama - Tese. 2. Polimorfismo genético - Tese. 3. CCL5 - Tese. 4. CCR5 - Tese. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos . II. Guembarovski, Roberta Losi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

DANIELA RUDGERI DEROSI

**“ANÁLISE DO POLIMORFISMO *CCR5-delta32E* DA EXPRESSÃO  
PROTEICA DE CCL5 EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM  
CARCINOMA MAMÁRIO”**

Tese apresentada ao programa de Doutorado em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Ilce Mara de Syllos Cólus  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Marla Karine Amarante  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Edna Vissoci Reiche  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 04 de julho de 2017.

Dedico este trabalho a meus pais, Luiz e Hilda, que me ensinaram o quão valioso é o saber.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ilce Mara de Syllós Cólus pelo espírito colaborativo. À minha coorientadora, Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski, pela preciosa orientação, dedicação e profissionalismo. Agradeço também pela amizade, desprendimento e generosidade, nesta etapa tão especial. Meu muito obrigada!!!

De forma especial a todos os membros do Laboratório de Polimorfismos de DNA e Imunologia, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela maneira como trabalham em equipe. Minha admiração e respeito à Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe, capaz de conduzir toda a equipe com disciplina e olhar científico distinto.

À banca avaliadora deste trabalho, Profa. Ilce Mara de Syllós Cólus, Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira, Profa. Dra. Edna Vissoci Reiche, Prof. Dra. Marla Karine Amarante e Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino, por terem aceitado participar deste momento e por suas valiosas sugestões e contribuições.

À banca avaliadora da qualificação, Profa. Dra. Marla Karine Amarante, Profa. Dra. Edna Vissoci Reiche e Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira, pelas valiosas sugestões e contribuições na primeira etapa.

À equipe do setor de Patologia do Hospital do Câncer de Londrina, pela grande colaboração na obtenção das amostras e dos dados clínicos das pacientes.

Ao Dr. Kazuhiro Ito pela ajuda no desenvolvimento das práticas rotineiras contributivas para essa tese, à Dra. Alda Losi Guembarovski e à Dra. Marina Kishima pela compreensão e colaboração nesse processo de formação.

Ao meu marido Fernando pelo apoio e incentivo para enfrentar novos desafios.

A todas as pacientes e controles que contribuíram com amostras e dados clínicos, o meu muito obrigada, com todo carinho e respeito.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, por todo o suporte durante a realização deste trabalho.

A Universidade Estadual de Londrina, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho gostaria de deixar o meu muito obrigada!!!

DEROSSI, DANIELA RUDGERI. “Análise do polimorfismo *CCR5-delta32* e da expressão proteica de *CCL5* em amostras de pacientes com carcinoma mamário”, 2017. 71p. Trabalho de Tese do Doutorado em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde. Londrina, 2017

## RESUMO

Diversas moléculas, dentre as quais se destacam as quimiocinas e seus receptores, vêm sendo estudadas para uma melhor compreensão da patogênese do câncer de mama. Evidências indicam que estas participam no desenvolvimento dos órgãos, na angiogênese, na mobilidade de células tronco, na recirculação dos leucócitos, na regulação e no desenvolvimento imunológico e hematopoiético, e mais recentemente, na disseminação de células tumorais no processo metastático, inclusive no câncer de mama. Relatos atuais levantam a possibilidade de que a análise do eixo quimiocina *CCL5* e receptor *CCR5* possua um valor prognóstico relevante nesta neoplasia. Neste trabalho, foi avaliado um polimorfismo genético (*rs333/delta32*) no gene *CCR5* em um estudo de associação do tipo caso-controle, bem como em relação a parâmetros prognósticos da doença. Foi ainda avaliada a expressão proteica de *CCL5*, tanto em sobrenadante tecidual quanto em cortes de tecidos tumoral e normal da mama, sendo as mesmas também correlacionadas aos parâmetros prognósticos das pacientes. Foram utilizadas 167 amostras de sangue periférico de pacientes portadoras de carcinoma de mama e 179 amostras de mulheres livres de carcinoma de mama, para extração de DNA, no estudo de associação de caso-controle. Para o método de enzima-imunoensaio foram utilizadas 49 amostras de sobrenadante de tecidos tumorais e normais a fresco. Para o estudo imunohistoquímico foram utilizados 24 blocos de parafina provenientes de cirúrgicas realizadas nas pacientes com carcinoma de mama. A análise da variante genética de *CCR5* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* específicos. A análise da expressão proteica foi realizada pelas técnicas de enzima-imuno-ensaio (ELISA) (a partir dos sobrenadantes de tecidos normais e tumorais) e imunohistoquímica (a partir de cortes de tecidos normais e tumorais embebidos em parafina). As análises estatísticas foram realizadas pelos testes de Mann-Whitney e Correlação Tau\_b de Kendall. Não foi observada associação significativa entre a variante de *CCR5* e a suscetibilidade ao câncer de mama (*CCR5-delta32*: OR=1.35; CI95%=0.63-2.91). As análises em relação aos parâmetros prognósticos indicaram uma correlação significativa entre *CCR5-delta32* e acometimento de linfonodos e/ou metástase à distância (p= 0.02). Com relação à expressão proteica de *CCL5* por imunohistoquímica, foi observada predominância de marcação citoplasmática. Não foram observadas associações significativas em relação aos parâmetros prognósticos e nem em relação aos genótipos de *CCR5-delta32*. Com relação a expressão de *CCL5* por ELISA, foi observada uma concentração maior da proteína no sobrenadante de tecido tumoral quando comparada àquele do tecido normal adjacente (p<0.0001). Adicionalmente, quando esta expressão foi comparada em diferentes estadiamentos tumorais, foi observada uma diferença significativa entre os estadiamentos I e III (p<0.02). Ainda, quando a expressão de *CCL5* foi averiguada em relação aos parâmetros prognósticos, foi observada uma maior concentração da proteína em relação ao comprometimento linfonodal (p=0.03). De um modo geral, os resultados do presente estudo indicam que o eixo *CCL5/CCR5* pode ter importantes implicações prognósticas no contexto da carcinogênese mamária.

**Palavras-chaves:** Câncer de mama. *CCL5*. *CCR5*. Polimorfismo genético. ELISA. Imunohistoquímica. Parâmetros prognósticos.



DEROSSI, DANIELA RUDGERI. “Analysis of *CCR5-delta32* polymorphism and *CCL5* protein expression in patients with breast carcinoma”, 2017.71p. Doctoral Thesis (Ciências da Saúde) – Londrina University State, Londrina, PR, 2017.

## ABSTRACT

Several molecules, such as chemokines and their receptors, have been studied for a better understanding of breast cancer (BC) pathogenesis. Evidences indicate that they participate in organ development, angiogenesis, stem cell mobility, leukocyte recirculation, immunological and hematopoietic regulation and development and more recently, in the spread of tumor cells in metastatic process, including in BC. Current reports raise the possibility that analysis of *CCL5* chemokine and *CCR5* receptor had a relevant prognostic value in this neoplasia. In the present study, a genetic polymorphism (*rs333/delta32*) in *CCR5* gene was evaluated in a case-control study, as well as in relation to disease prognostic parameters. It was also evaluated *CCL5* protein expression, both in tissue supernatant and in tumor and normal breast tissue sections, being also correlated with prognostic parameters. The peripheral blood samples (167) and tissue samples (49) were obtained from breast cancer (BC) patients, who had undergone surgery, and peripheral blood samples from 179 women free of disease, were taken as controls. Analysis of *CCR5* genetic variant was performed through polymerase chain reaction (PCR) using specific primers. Protein expression analysis was performed using enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)(from tumor and normal supernatants) and by immunohistochemistry (from normal and tumor sections embedded in paraffin). Statistical analyzes were performed using Mann–Whitney and Kendall's Tau\_b Correlation tests. No significant association was found between *CCR5* variant and BC susceptibility (*CCR5-delta32*: OR=1.35; CI95%=0.63-2.91). Analyzes regarding prognostic parameters indicated a significant correlation between *CCR5-delta32* and lymph node involvement and/or distant metastasis ( $p= 0.02$ ). Regarding *CCL5* staining by immunohistochemistry, the predominance of cytoplasmic labeling was observed. No significant associations were observed in relation to prognostic parameters or in relation to *CCR5* genotypes. Regarding *CCL5* expression by ELISA, a higher protein concentration was observed in the tumor supernatant compared to adjacent normal supernatant ( $p <0.0001$ ). In addition, when this expression was compared in different tumor stages, a significant difference was observed between stages I and III ( $p <0.02$ ). Moreover, when *CCL5* expression was investigated in relation to prognostic parameters, a higher protein concentration was observed in relation to lymph node involvement ( $p= 0.03$ ). In general, results of the present study indicate that *CCL5/CCR5* axis may have important prognostic implications in the context of mammary carcinogenesis.

**Keywords:** Breast cancer. *CCL5*. *CCR5*. Genetic polymorphism. ELISA. Immunohistochemistry. Prognostic parameters.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Perfis dos subtipos moleculares de câncer de mama .....	20
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama.....	16
-------------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% Porcentagem

< Menor

μmol Micromolar

°C Graus Celsius

*BRCA1* gene do câncer de mama 1, início precoce

*BRCA2* gene do câncer de mama 2, início precoce

CCL Ligante da família de quimiocina CC

CCR Receptor de quimiocina da família CC

CXCR Receptor da família de quimiocinas CXC

DNA Ácido Desoxirribonucleico

ELISA Ensaio de imunoabsorção enzimática

HCL Hospital do c

HER2 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano tipo 2

HIV Vírus da imunodeficiência humana

IARC Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBICT Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia

IFN- $\gamma$	Interferon gama
IHQ	Imunohistoquímica
IC95%	Intervalo de Confiança a 95%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kda	Kilodalton
Ki67	Antígeno Ki67
IL	Interleucina
MCF-7	Linhagem de células do carcinoma mamário
Min	Minuto
MIP	Proteína inflamatória macrofágica
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de bases
NK	Linfócitos <i>Natural Killer</i>
OR	Razão de Chance ( <i>Odds Ratio</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomolar

RH	Receptor hormonal
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
TNM	Tumor-Nódulo-Metástase
TP53	Gene Supressor Tumoral p53 (humano)
TN	Triplo-negativo
UBS	Unidade Básica de Saúde
UICC	União Internacional de Controle ao Câncer
WHO	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	CARCINOMA DE MAMA.....	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA .....	15
1.3	DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO .....	17
1.4	SUBTIPOS DO CARCINOMA DE MAMA.....	19
1.5	QUIMIOCINAS .....	21
1.6	QUIMIOCINA CCL5 (RANTES) NO CÂNCER .....	22
1.7	RECEPTORES DE QUIMIOCINAS .....	25
1.8	RECEPTOR CCR5 NO CÂNCER .....	26
1.9	POLIMORFISMO GENÉTICO NO RECEPTOR CCR5 .....	28
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
2.1	OBJETIVO GERAL: .....	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	30
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1	SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	31
3.2	ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA SEGUNDO UICC .....	31
3.3	OBTENÇÃO DO DNA DE SANGUE PERIFÉRICO E DE TECIDO MAMÁRIO .....	32
3.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O POLIMORFISMO CCR5- DELTA32 .....	32
3.5	ANÁLISE DE IMUNOHISTOQUÍMICA .....	33
3.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE CCL5 POR ELISA .....	33
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4.</b>	<b>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	35
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	64

<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>73</b>
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa Envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina .....	75
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	76
	ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	77



## INTRODUÇÃO

### 1.1 CARCINOMA DE MAMA

A importância mundial do câncer é inquestionável, uma vez que é a segunda maior causa de mortes no mundo, seguida apenas das doenças cardiovasculares. A incidência de diferentes tipos de câncer tem aumentado tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento como resultado da crescente exposição a fatores de risco e do aumento da expectativa de vida. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo e o que tem a maior incidência e a maior mortalidade na população feminina. No Brasil, com exceção dos tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas regiões Sul (74,30/100.000), Sudeste (68,08/100.000), Centro-Oeste (55,87/100.000) e Nordeste (38,74/100.000) (INCA, 2016).

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

O estadiamento do tumor e o grau de diferenciação histológica são classificações utilizadas na clínica, importantes na orientação do tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), o qual se baseia na extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases. A avaliação desses parâmetros permite a determinação do estadiamento que varia dos estadios I ao IV (Wittekind *et al.*, 2002).

### 1.2 EPIDEMIOLOGIA

O carcinoma de mama é uma doença heterogênea, com comportamentos biológicos distintos. A heterogeneidade destes tumores pode ser observada pelas variadas manifestações clínicas e morfológicas, diferentes assinaturas genéticas e consequentes diferenças nas respostas terapêuticas. Constituem as neoplasias mundialmente mais incidentes entre as

mulheres, com cerca de 1,7 milhões de casos novos anuais. O INCA estimou cerca de 57.960 novos casos de câncer de mama para o ano de 2016 no Brasil, com um risco estimado de 56,2 casos para cada 100 mil mulheres, 14.388 mortes, sendo 181 homens e 14.206 mulheres (INCA, 2015).

Embora seja considerado de bom prognóstico se detectado precocemente, continua sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (Boyle e Forbes, 2008; Ferlay *et al.*, 2015) e a quinta causa de morte por câncer em geral (522.000 óbitos). No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama também é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, exceto na região Norte, onde o câncer do colo do útero ocupa a primeira posição (INCA, 2015).

Como mostra a Tabela 1, o Brasil apresenta valores intermediários no padrão de incidência e mortalidade por câncer de mama. Cabe destacar que, proporcionalmente, as diferenças entre as taxas de incidência e mortalidade nos países desenvolvidos são maiores, sugerindo maior alcance das ações de rastreamento em diagnosticar precocemente a doença e acesso aos avanços no tratamento (INCA, 2015).

**Tabela 1.** Taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama.

Região\País	Incidência		Mortalidade
	Taxa Bruta	Taxa Padronizada	Taxa Bruta
Finlândia	162,9	89,4	31,3
Reino Unido	164,5	95,0	36,7
Espanha	106,6	67,3	25,7
Estados Unidos	145,6	92,9	27,5
Canadá	134,1	79,8	28,2
Austrália	128,0	86,0	25,7
Japão	85,9	51,5	21,3
Paraguai	37,1	43,8	13,0
Bolívia	15,7	19,2	5,8
Zâmbia	11,9	22,4	5,9
Brasil *	66,8	59,5	16,3
Brasil (dados oficiais) **	56,1	-	13,5

Fonte: Globocan. IARC (WHO), 2012.

\* Os dados do Globocan são diferentes dos dados das fontes nacionais por diferenças metodológicas no cálculo das taxas.

\*\* Referem-se à estimativa de incidência para 2014/2015 (INCA, 2014) e à taxa de mortalidade do ano de 2012 (Sistema de Informação sobre Mortalidade/Ministério da Saúde).

### 1.3 DIAGNÓSTICO E FATORES DE RISCO

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como principais estratégias de rastreamento populacional um exame mamográfico, pelo menos a cada dois anos, para mulheres de 50-69 anos de idade, e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40-49 anos de idade. Contudo, o exame clínico deve ser realizado em todas as mulheres que procuram o serviço de saúde, independentemente da faixa etária, como parte do atendimento à saúde da mulher. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado (com história familiar em parentes de primeiro grau), recomenda-se o exame clínico e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos de idade (INCA, 2016).

O sintoma mais comum é o aparecimento de nódulo, geralmente indolor, duro e irregular, mas há tumores que são de consistência branda, globosos e bem definidos. Outros sinais são edema cutâneo semelhante à casca de laranja, retração cutânea, dor, inversão do mamilo, hiperemia, descamação ou ulceração do mamilo e secreção papilar, especialmente quando é unilateral e espontânea. A secreção associada geralmente é transparente, podendo ser rosada ou avermelhada devido à presença de glóbulos vermelhos. Podem também surgir linfonodos palpáveis na axila (INCA, 2016).

O carcinoma de mama não tem uma causa única e diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença, tais como: idade, fatores hereditários, fatores hormonais e fatores comportamentais/ambientais (Trichopoulos *et al.*, 2008).

Mulheres mais velhas, sobretudo a partir dos 50 anos de idade, têm maior risco da doença e o acúmulo de exposições ao longo da vida e as próprias alterações biológicas do envelhecimento aumentam, de modo geral, esse risco (WHO, 2015).

Apesar da maior incidência do carcinoma de mama ocorrer em mulheres a partir dos 50 anos de idade, foram publicados relatos sugerindo um aumento na incidência e mortalidade em mulheres jovens em diferentes populações do mundo. Mesmo assim, mulheres entre 50 e 60 anos de idade estão no grupo que apresenta a maior incidência. Nesta faixa etária, a neoplasia costuma apresentar características de melhor prognóstico, as quais possibilitam mais sucesso nos tratamentos (Stival *et al.*, 2014). De um modo geral, menos de 1% de todos os cânceres de mama ocorrem em mulheres com menos de 25 anos de idade. A grande maioria tem sua incidência aumentada após os 30 anos, apresentando um platô entre 45 e 50 anos (Choy e Giuliano, 2014).

Alguns trabalhos na literatura relatam que o carcinoma mamário em mulheres jovens apresentaria um comportamento mais agressivo e um pior prognóstico que aquele diagnosticado em idades mais avançadas (Anders *et al.*, 2009; Fredholm *et al.*, 2009). Um estudo transversal realizado no Brasil mostrou que mulheres com neoplasia mamária em idade mais jovem (<35 anos), demonstraram tumores com tamanho maior do que 2 centímetros, *status* dos linfonodos positivo, presença de metástase a distância, estadiamento clínico avançado e ausência de resposta terapêutica (Pinheiro *et al.*, 2013).

Johnson *et al.* (2013) relataram em mulheres de 25-35 anos, um aumento estatisticamente significativo na incidência do câncer de mama com metástase para outros órgãos (ossos, cérebro, pulmão) no momento do diagnóstico, sem um aumento correspondente em mulheres de maior idade. Adicionalmente, um aumento da incidência de câncer de mama foi verificado na França (entre 1991-2003) em mulheres com idade inferior a 50 anos de idade (Fontenoy *et al.*, 2010) e na Espanha (entre 1980-2004) em mulheres de 25-45 anos (Pollan *et al.*, 2009).

Os fatores hereditários estão relacionados à presença de mutações em determinados genes de alta penetrância, especialmente *BRCA1* e *BRCA2*. Mulheres que possuem vários casos de câncer de mama e/ou pelo menos um caso de câncer de ovário em parentes consanguíneos, sobretudo em idade jovem, ou câncer de mama masculino, também em parente consanguíneo, podem ter predisposição genética e são consideradas de alto risco para a doença. O câncer de mama de caráter hereditário corresponde a apenas 5% a 10% do total de casos da doença (Trichopoulos *et al.*, 2008).

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

Os fatores comportamentais e ambientais melhor estabelecidos incluem a ingestão de bebida alcoólica, sobrepeso e obesidade na pós-menopausa e exposição à radiação ionizante (Inumaru *et al.*, 2011; IARC, 2016). O risco de câncer de mama devido à radiação ionizante é proporcional à dose e à frequência (Trichopoulos *et al.*, 2008). Doses altas ou moderadas de radiação ionizante (como as que ocorrem nas mulheres expostas a tratamento de radioterapia

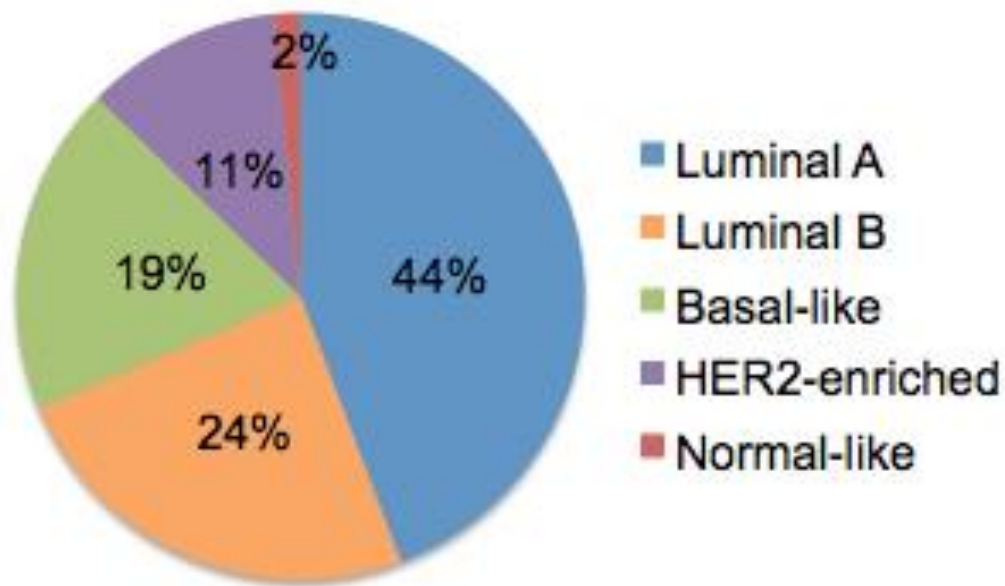
no tórax em idade jovem) ou mesmo doses baixas e frequentes (como as que ocorrem em mulheres expostas a dezenas de exames de mamografia) parecem aumentar o risco de desenvolvimento da neoplasia (Golubicic *et al.*, 2008).

Outro fator ambiental, o tabagismo, estudado ao longo dos anos com resultados contraditórios, é atualmente reconhecido pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) também como um agente carcinogênico com limitada evidência de aumento do risco de câncer de mama em humanos (IARC, 2016).

#### 1.4 SUBTIPOS DO CARCINOMA DE MAMA

Tem sido demonstrado que o carcinoma de mama pode ser classificado em subgrupos biologicamente e clinicamente significativos. Assim, constitui uma doença muito heterogênea e, com base em dados moleculares, costuma-se dividi-la em quatro principais subtipos, com curso clínico distinto e resposta ao tratamento diferenciada. Esta classificação considera o *status* dos receptores hormonais, a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) e o marcador de proliferação celular Ki67 (Goldhirsch *et al.*, 2011).

Os 4 subtipos principais do carcinoma da mama são Luminal A, de melhor prognóstico e definido como receptor de estrógeno (RE) e/ou receptor de progesterona (RP) positivo, HER2 não superexpresso e Ki67 baixo (<14%); Luminal B, que possui prognóstico intermediário, com RE e/ou RP positivo e Ki67 alto (>14%); HER2 enriquecido, que exibe receptores hormonais negativos e a superexpressão do HER2, e por fim, o subtipo Triplo-negativo (TN) que possui receptores hormonais negativos e HER2 não superexpresso (Figura 1) (Goldhirsch *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Perfis dos subtipos moleculares de câncer de mama. Fonte: (Genomics.Org, 2012)

Dentro deste contexto, aproximadamente um milhão de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama a cada ano e aproximadamente 700.000 possuem receptores hormonais (RH+) (Piccart-Gebhart, 2011). Os RE e RP são os marcadores mais estudados no tecido mamário. Quando comparado com tumores receptores hormonais negativos, a neoplasia de mama hormônio positiva apresenta forte resposta clínica ao tratamento hormonal, aparência morfológica mais diferenciada (Henderson e Patek, 1998) e taxas de incidência as quais se elevam de forma contínua com o envelhecimento ao invés de diminuir após a menopausa (Yasui e Potter, 1999; Anderson *et al.*, 2002).

Os carcinomas de mama classificados pela expressão de RE e RP possuem diferentes características clínicas, patológicas e moleculares (Althuis *et al.*, 2004). Esses receptores são expressos tanto no epitélio quanto no estroma mamário (Haslam e Shyamala, 1981; Daniel *et al.*, 1987; Haslam, 1989). Postula-se que determinados fatores de risco estão intimamente associados aos tumores de mama RE+ e RP+ e podem envolver mecanismos relacionados à exposição de estrogênio e progesterona, enquanto que a etiologia do câncer de mama RE- e RP- parece ser independente da exposição hormonal (Manjer *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2001).

Pacientes com tumores que expressam receptores hormonais também apresentam maior sobrevida, tanto livre de doença, quanto global (Wittliff, 1984; Harvey *et al.*, 1999). Embora a terapia hormonal tenha revolucionado o manejo do carcinoma de mama e os resultados tenham melhorado substancialmente nestas pacientes, o tratamento ideal continua sendo um desafio significativo. Por exemplo, o limiar para a adição de quimioterapia

adjuvante é um tema de discussão permanente, e os regimes mais eficazes que incluem hormonioterapia e quimioterapia, ainda estão em debate. A identificação de marcadores tumorais, como o Ki-67, e marcadores do hospedeiro, como o polimorfismo do citocromo P450D6, estão sendo estudados como potenciais ferramentas para oferecer maior adaptação à terapia endócrina adjuvante (Piccart-Gebhart, 2011).

Os tumores TN são responsáveis por 10-20% de todos os carcinomas de mama, e são biologicamente mais agressivos do que outros subgrupos (Kurebayashi, 2009). Normalmente, demonstram alto grau histológico, e são o subtipo de carcinoma de mama mais comum em portadores de mutação no gene *BRCA-1* (Dawson *et al.*, 2009). Este subtipo tumoral está também associado ao gene *TP53*, e estudos epidemiológicos mostram uma alta prevalência entre as mulheres mais jovens e de ascendência Africana (Carotenuto *et al.*, 2010). Caracteristicamente, possui um comportamento mais agressivo e predileção por metástase visceral, favorecendo um pior prognóstico (Maegawa e Tang, 2010).

Sabe-se que a patogênese do câncer é iniciada e modulada pela interação entre as células malignas transformadas, o estroma circundante e o sistema imune inato e adaptativo. Essas interações são complexas e componentes do sistema imune atuam tanto na defesa como contribuindo para a iniciação, crescimento, invasividade e desenvolvimento de metástase (Yaqub e Aandahl, 2009). A compreensão entre a interação dos tumores com seu microambiente é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e estratégias terapêuticas (Fridman *et al.*, 2011).

Dentro deste cenário, as quimiocinas e seus receptores vêm sendo estudados e constituem interessantes marcadores no contexto da carcinogênese mamária.

## 1.5 QUIMIOCINAS

Os mecanismos que interrelacionam os processos inflamatórios, a imunidade e o câncer têm sido muito discutidos. Mediadores solúveis produzidos pelas células tumorais recrutam e ativam células inflamatórias que estimulam a progressão tumoral. Importantes componentes nesta integração são as citocinas produzidas pelas células ativadas do sistema imune inato ou adaptativo, que estimulam o crescimento tumoral e a progressão do câncer. Estudos sobre os aspectos imunológicos que envolvem o microambiente tumoral do câncer de mama ainda são limitados na literatura, o que ressalta a importância de novos estudos.

As quimiocinas ganharam destaque científico nas últimas décadas, uma vez que desempenham funções cruciais no desenvolvimento de diferentes doenças e processos patológicos, incluindo a inflamação, doenças autoimunes, doenças infecciosas como a Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e recentemente no câncer, onde particularmente regulam o processo de metástase (Zlotnik, 2006).

As quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes em 1992, após o Encontro Internacional de Imunologia em Budapest (Lindley, 1993). Constituem uma grande família de mediadores inflamatórios e imunológicos. Assim como as citocinas, as quimiocinas são proteínas secretórias produzidas por leucócitos e células teciduais constitutivamente ou após indução, e exercem seus efeitos localmente de forma autócrina ou parácrina. Desempenham sua atividade via receptores com sete domínios  $\alpha$ -hélices transmembrana acoplados à proteína G, os quais são típicos para atração de leucócitos (Baggiolini, 2001).

Quimiocinas são proteínas constituídas de 70 a 130 aminoácidos com quatro resíduos de cisteína conservados (Baggiolini *et al.*, 1994; 1997). Como proteínas secretórias, são sintetizadas com uma sequência guia de 20-25 aminoácidos, a qual é retirada antes de sua liberação. Duas famílias principais, CXC e CC, também conhecidas como  $\alpha$  e  $\beta$  quimiocinas, respectivamente, são distinguidas de acordo com a posição dos dois primeiros resíduos de cisteína, separados por um aminoácido variável (CXC) ou adjacentes (CC). As cisteínas formam duas pontes dissulfeto (Cys1  $\rightarrow$  Cys3 e Cys2  $\rightarrow$  Cys4), o que confere às quimiocinas sua estrutura tridimensional. As pontes dissulfeto mantêm as regiões amino terminais juntas, o que é essencial para sua atividade biológica (Baggiolini, 2001).

Os efeitos das quimiocinas estendem-se muito além da atração de leucócitos aos sítios de inflamação. Evidências indicam que estas participam no desenvolvimento dos órgãos, na angiogênese, na mobilidade de células tronco, na recirculação dos leucócitos, na regulação e no desenvolvimento imunológico e hematopoiético (Sarafi *et al.*, 1997; Luster, 1998; Chensue *et al.*, 2001; Pelus *et al.*, 2002). Recentemente estas proteínas vêm sendo associadas ao processo tumoral, incluindo o carcinoma de mama.

## 1.6 QUIMIOCINA CCL5 (RANTES) NO CÂNCER

Ligante 5 da família de quimiocinas CC, é codificado pelo gene *CCL5*, no braço longo do cromossomo 17 (Donlon *et al.*, 1990), na mesma área codificadora do HER2,



provavelmente contribuindo para seus associados padrões de expressão. Também conhecida como RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), é uma proteína de 8 kDA, quimiotática para linfócitos T, eosinófilos, basófilos, entre outras células no sítio inflamatório. Com a ajuda de outras citocinas (interleucina-2, interferon gama), induz a proliferação e ativação de linfócitos *natural killer* (NK) (Maghazachi *et al.*, 1996).

*CCL5* foi descrito pela primeira vez em uma pesquisa para genes de expressão tardia (3-5 dias) após ativação de células T, e posteriormente identificada como uma quimiocina da família CC, expressa em mais de uma centena de doenças humanas. A expressão desta quimiocina é regulada nos linfócitos T pelo fator de transcrição 13 *Kruppel-like* (Song *et al.*, 1999). Em conjunto com as quimiocinas *CCL3* e *CCL4*, foi descrita como um supressor natural do HIV secretado por linfócitos T CD8+ ativados e outras células imunes (Cocchi *et al.*, 1995).

A expressão de *CCL5* tem sido extensivamente analisada em pacientes com carcinoma de mama durante os últimos anos. Foi descrito que essa quimiocina é expressa em células residentes no tumor, nos linfonodos comprometidos e em metástases em sítios distantes, e detectada em fluidos intersticiais que perfundem o tumor, efusões pleurais e soro. Embora a expressão dessa quimiocina resida principalmente nas células tumorais, ela também pode ser detectada em leucócitos que permeiam o tumor e células mesenquimais do ambiente tumoral (Karnoub e Weinberg, 2006).

A primeira evidência de correlação entre carcinoma mamário e *CCL5* foi descrita por Luboshits *et al.* (1999). Essa investigação demonstrou elevada expressão de *CCL5* em células tumorais, sem evidências do mesmo em células teciduais adjacentes ao tumor ou em indivíduos saudáveis, e que a expressão de *CCL5* aumentava durante a transformação maligna, sugerindo seu envolvimento no desenvolvimento tumoral. O possível envolvimento na progressão do tumor também foi sugerido por Wigler *et al.* (2002), uma vez que níveis maiores de expressão de *CCL5* por células tumorais foram significativamente associadas a estádios mais avançados de doença.

Robinson *et al.* (2003) demonstraram que animais inoculados com linhagens tumorais de mama apresentaram uma maior produção de *CCL5* e que administração de antagonista para seu receptor (Met-*CCL5*), nestes mesmos animais, proporcionou regressão significativa no tamanho dos tumores, indicando uma relação direta do envolvimento desta quimiocina com carcinomas de mama.

Relatos indicam que os níveis séricos de CCL5 estão elevados em pacientes com carcinoma de mama, em comparação com indivíduos saudáveis, podendo ter valor diagnóstico e/ou prognóstico, e ainda, podendo servir como marcador de doença ativa, necessitando de investigações complementares (Niwa *et al.*, 2001). Smeets *et al.* (2013) observaram que os níveis plasmáticos e séricos de CCL5 tenderam a ser mais elevados em pacientes com metástases linfonodais, se comparados a pacientes com carcinoma de mama linfonodo-negativo, aumentando com o estadió clínico. Entretanto, essa diferença não foi significativa ( $p=0.22$ ).

Estudos moleculares deram suporte para a correlação entre expressão de CCL5 e doença agressiva, uma vez que a expressão de CCL5 está aumentada em ‘carcinomas inflamatórios’, forma altamente agressiva da doença, se comparado a tumores não inflamatórios (Bieche *et al.*, 2004). Nesse sentido, estudos tem demonstrado que a expressão de CCL5 por células tumorais pode ser um valioso fator preditivo para detecção de pacientes em estadió II com risco de progressão da doença (Yaal-Hahoshen *et al.*, 2006)

Metástase representa a causa de 90% das mortes por tumores sólidos, surgindo a partir da evolução somática de uma população geneticamente variada de células tumorais, sob pressões seletivas de um ambiente, que impõe normas variadas sobre o comportamento celular (Gupta e Massague, 2006). Assim, a quimiocina CCL5 tem sido relacionada com a progressão de uma série de neoplasias malignas e com indução de metástase no carcinoma de mama (Vaday *et al.*, 2006).

Em um estudo onde as células tumorais de mama foram estimuladas a super-expressar CCL5, evidenciou-se que esta potencializa metástases aumentando a motilidade e o extravasamento de células tumorais para locais distantes do sítio primário. Ainda, foi demonstrado que o CCL5 é capaz de promover metástases pela indução da secreção de metaloproteinases que degradam as proteínas da matriz extra-celular circundantes, facilitando o movimento das células tumorais, *in vitro*. Além disso foi verificado que células tumorais migraram em direção a células progenitoras produtoras de CCL5 (Swamydas *et al.*, 2013) De fato, alta expressão de CCL5 está associada a alta expressão de enzimas degradantes de matriz extracelular (Espinoza-Sanchez *et al.*, 2017).

Células progenitoras mesenquimais são células multipontentes, requisitadas na regeneração de tecidos como cartilagem, osso e músculo (Pittenger *et al.*, 1999). Essas células são encontradas em grande parte da medula óssea, mas também encontram-se presentes no estroma associado ao tumor (De Ugarte *et al.*, 2003). Secretam CCL5 por

estímulo das células tumorais, que então age de uma forma parácrina sobre as células cancerosas, induzindo invasão e metástases (Karnoub e Weinberg, 2006). As células progenitoras mesenquimais, derivadas de tecido adiposo humano, podem promover a invasão de células de tumor da mama (MDA MB 231), quando co-cultivadas, o que significa que as células progenitoras de tecido residente podem ser estimuladas por células do tumor de mama humano para secretar CCL5 e, assim, promover a invasão das células cancerosas (Yamaguchi *et al.*, 2008).

Analisados em conjunto, esses dados sugerem que o CCL5 induz processos de progressão e agressividade tumoral. Diante de vários estudos sobre a contribuição de CCL5 como fator crítico no câncer de mama, ainda há necessidade de estudos complementares que elucidem os mecanismos moleculares ativados por esta quimiocina no processo de desenvolvimento e progressão tumoral.

## 1.7 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS

A maioria dos receptores de quimiocinas reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor. Contudo, os receptores CC ligam-se somente às quimiocinas CC, e do mesmo modo os receptores CXC ligam-se somente as quimiocinas CXC. Esta restrição, ligante-receptor, provavelmente está relacionada às diferenças estruturais entre as quimiocinas CC e CXC, as quais têm estruturas primárias, secundárias e terciárias similares, mas quaternárias diferentes (Baggiolini, 2001).

Os receptores para quimiocinas são expressos em diferentes tipos de leucócitos; porém, alguns receptores estão restritos a determinados tipos celulares, como o CXCR1, predominantemente presente em neutrófilos, enquanto outros são mais amplamente expressos em outros tipos celulares, como CCR2 em monócitos, células T, células NK, células dendríticas e basófilos. Estes receptores são expressos constitutivamente ou induzidos, dependendo de tipos celulares. Como exemplo, os receptores CCR1 e CCR2 são expressos constitutivamente em monócitos, mas nos linfócitos são expressos somente após a estimulação pela IL-2 (Loetscher *et al.*, 1996).

A identificação de um grande número de receptores de quimiocinas e a caracterização de sua seletividade e expressão em diferentes tipos de leucócitos tem fornecido informações sobre a regulação do tráfego leucocitário na saúde e na doença. Fagócitos sanguíneos expressam diferentes tipos e combinações de receptores de quimiocinas, como CXCR1 e

CXCR2, e os receptores de IL-8 são encontrados exclusivamente em neutrófilos, os quais estão envolvidos principalmente na imunidade contra bactérias. Monócitos, eosinófilos e basófilos compartilham alguns receptores e expressam outros com exclusividade (CCR3 em eosinófilos e basófilos e CCR5 em monócitos) e, portanto podem ser recrutados seletivamente por quimiocinas apropriadas (Baggiolini, 2001).

Os receptores de quimiocinas, assim como outros membros da família de receptores tipo proteína G acoplados, estão funcionalmente ligados às fosfolipases através das proteínas G (Premack e Schall, 1996, Bokoch, 1995). A ativação do receptor leva a uma cascata de sinalização celular, incluindo a geração de trifosfato de inositol, a liberação de cálcio intracelular e a ativação da proteína quinase C. A sinalização por meio do receptor de quimiocina também leva a ativação de proteínas ligantes tipo guanosina trifosfato da família de RAS (Laudanna *et al.*, 1996). As proteínas ligantes estão envolvidas na motilidade celular através da regulação de processos actina-dependentes, tais como ondulação da membrana, formação de pseudópodos e organização de complexos de adesão celular. Portanto, o que tem sido demonstrado é que os receptores de quimiocinas ativam múltiplas vias sinalizadoras da célula, os quais regulam a maquinaria intracelular necessária para muitas das respostas celulares.

O CCR5, receptor da família CC, apresenta sete domínios transmembrana hidrofóbicos e exerce sua atividade via proteína G. Liga-se as quimiocinas CCL5, CCL3 e CCL4 (Samson *et al.*, 1996) e é codificado pelo locus *CMBKR5* localizado no cromossomo 3 (Loetscher, Ugucioni, *et al.*, 1998). Está envolvido na quimiotaxia de leucócitos para os sítios de inflamação (Baggiolini, 1998), desempenhando importante papel no recrutamento de macrófagos, monócitos e células T na inflamação (Panzer *et al.*, 2005). É normalmente expresso em linfócitos T e células dendríticas, dirigindo a resposta imune preferencialmente para Th1 (Loetscher, Gong, *et al.*, 1998).

## 1.8 RECEPTOR CCR5 NO CÂNCER

Quimiocinas quando ligadas aos seus receptores podem induzir uma série de reações em cascata intracelulares que podem regular a migração de células tumorais (Ben-Baruch, 2006). Alguns relatos indicam que a expressão de receptores de quimiocinas em muitas células tumorais não é aleatória (Zlotnik, 2006) e podem ter um papel no processo de metástase.

Tem sido discutido que o receptor CCR5 pode, também, apresentar um efeito indireto sobre a progressão de tumores, por meio do controle de uma resposta imune antitumoral (Manes *et al.*, 2003) e que a retenção de células T no local do tumor parece ser mediada por mecanismos dependentes de CCR5 da célula imune e do tumor.

Foi demonstrado que a expressão de CCR5 pode promover o crescimento tumoral e contribuir para a metástase. Van Deventer *et al.* (2005) mostraram que camundongos com metástase pulmonar de melanoma, que expressam CCR5, apresentam crescimento tumoral e resposta inadequada à terapia, quando comparados com camundongos *knockout* para CCR5. Os autores demonstraram que a expressão de CCR5 em células estromais contribuiu para o processo de metástase.

CCR5 também está envolvido na metastatização de condrossarcomas (Tang *et al.*, 2010) e de células de tumor oral (Chuang *et al.*, 2009). Por outro lado, no contexto hematopoiético, a expressão de CCR5 correlaciona-se com a capacidade agressiva das doenças linfoproliferativas tipo *NK-cell*, para se infiltrar em múltiplos órgãos (Makishima *et al.*, 2007), bem como o crescimento de células de mieloma múltiplo (Menu *et al.*, 2006).

A interação entre CCL5/CCR5 pode favorecer o desenvolvimento tumoral de várias maneiras: agindo como fator de crescimento, estimulando a angiogênese, modulando a matriz extracelular, induzindo o recrutamento de células inflamatórias e estromais adicionais, e fazendo parte de mecanismos de evasão imune (Kershaw *et al.*, 2013).

Com relação a importância do eixo CCL5/CCR5 na carcinogênese mamária, foi demonstrado que células endoteliais progenitoras, derivadas da medula óssea, requerem o receptor CCR5 para promoção de angiogênese. Nesse estudo, a supressão do eixo CCL5/CCR5, na medula óssea, levou a diminuição do crescimento tumoral. Surpreendentemente, a restauração deste na medula óssea, não reverteu o crescimento tumoral. Tais achados sugerem que as células endoteliais do microambiente tumoral necessitam de CCL5 produzido diretamente pelas células tumorais para promover angiogênese (John Sax *et al.*, 2016).

Lin *et al.* (2012) verificaram que CCR5 foi altamente expresso em câncer de mama com presença de metástase em linfonodos. O tratamento com a citocina TNF- $\alpha$  induziu a expressão aumentada de CCR5 em células MCF-7; IFN- $\gamma$  sozinho induziu aumento acentuado na expressão de CCR5. Isto foi também observado nas células MDA-MB-231 de linhagem celular altamente metastática. No entanto, expressão basal de um receptor de

quimiocina por si só não pode ser considerado um bom marcador de agressividade uma vez que pode estar sujeito a alterações pelo microambiente.

### 1.9 POLIMORFISMO GENÉTICO NO RECEPTOR CCR5

Um polimorfismo no gene *CCR5* foi identificado, consistindo na deleção de 32 pares de bases, sendo denominado de *CCR5-delta32* (*rs333*) (Liu *et al.*, 1996). Esta variante resulta em uma forma não funcional do receptor, impedindo a sua interação com suas quimiocinas ligantes (Smith *et al.*, 1997; Sidoti *et al.*, 2005).

A variante *delta32* é comum entre Europeus caucasóides (frequência alélica variando entre 0,05 - 0,15), porém raro ou ausente na maioria dos outros grupos étnicos, como nativos africanos e ameríndios (Martinson *et al.*, 1997; McNicholl *et al.*, 1997). A ausência desta variante também foi relatada na população nativa da América do Sul, como populações nativas da Amazônia Brasileira (Leboute *et al.*, 1999; Chies e Hutz, 2003), e em Asiáticos (O'Brien e Moore, 2000; Wang *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005).

No Brasil, Vargas *et al.* (2006) encontraram boa correlação entre a frequência desse alelo e a classificação populacional de acordo com a cor da pele (15,9% em pardos, 7,1% em negros e 6,6% em brancos). A frequência de 1,5% foi descrita em doadores de sangue saudáveis homocigotos e de 8,2% em heterocigotos para *delta32*, na população de Londrina e região (Reiche *et al.*, 2008).

As diferenças na distribuição mundial do *CCR5-delta32* podem ser explicadas pela hipótese de que esta mutação surgiu na população caucasóide (Libert *et al.*, 1998) e teve sua frequência rapidamente aumentada devido à forte pressão seletiva, possivelmente originada por patógenos que infectam macrófagos: *Yersinia pestis*, *Shigella*, *Salmonella* ou *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que estes patógenos poderiam provocar apoptose nestas células de uma maneira CCR5-dependente (Stephens *et al.*, 1998). Muito provavelmente teve sua origem na Islândia e, aparentemente, esta deleção disseminou-se nos séculos VIII, IX e X com os ataques Vikings (Martinson *et al.*, 1997).

Estudos sustentam que a deleção poderia estar associada à resistência à infecção pelo HIV (Dean *et al.*, 1996; Samson *et al.*, 1996; Zuniga *et al.*, 2003), e que pacientes portadores desse alelo poderiam ter melhor prognóstico na leishmaniose (Brajao De Oliveira *et al.*, 2007), na esclerose múltipla (Kaimen-Maciel *et al.*, 2007), no lúpus eritematoso sistêmico (Schauren *et al.*, 2013; na asma em crianças com infecção por *Mycoplasma pneumoniae*

(Ungvari *et al.*, 2007) e na rejeição de enxerto renal em modelos animais (Kruger *et al.*, 2007).

De um modo geral, a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares da patogênese do câncer é extremamente importante para o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento desta doença. Estudos mostram que as células e seus receptores desempenham um papel essencial em processos moleculares e fisiológicos (Do Val Carneiro *et al.*, 2009; Aoki *et al.*, 2011).

Assim, o câncer é uma doença complexa, onde muitas alterações ainda merecem uma abordagem molecular aprofundada. A interação entre quimiocinas e seus receptores depende da interação com moléculas de sinalização por células do sistema imunológico e não imunológico, e este pode ser modificado por alterações genéticas relacionadas a polimorfismos, expressão gênica e proteica. O receptor CCR5 no câncer poderia influenciar na progressão, formação tumoral e prognóstico, mas essa influência ainda não está elucidada. Assim, a compreensão do papel do eixo CCL5/CCR5 no microambiente tumoral pode sugerir estas moléculas como marcadores para prognóstico, e até mesmo para o tratamento do câncer de mama.

Com base no que foi relatado e frente ao fato de que recentemente tem sido explorado o papel da quimiocina CCL5 e do receptor CCR5 no microambiente tumoral da mama, neste estudo, pretende-se investigar este eixo em relação a suscetibilidade e ao prognóstico do carcinoma mamário.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

❖ Analisar o polimorfismo *delta32* no gene do receptor *CCR5* e a expressão proteica de *CCL5* em amostras de pacientes com carcinoma de mama.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

#### **Artigo 1:**

- ❖ Avaliar o polimorfismo *CCR5-delta32* em pacientes com carcinoma de mama e em controles livres de carcinoma mamário, em um estudo de associação do tipo caso-controle;
- ❖ Avaliar a presença da variante *CCR5-delta32* em relação a parâmetros prognósticos da doença;
- ❖ Avaliar a expressão da proteína *CCL5* em amostras de tecido normal adjacente e tumoral da mama, bem como sua possível correlação com parâmetros prognósticos da doença;
- ❖ Correlacionar os dados do polimorfismo genético *CCR5-delta32* com a expressão proteica de *CCL5*.

#### **Artigo 2:**

- ❖ Analisar o polimorfismo genético *CCR5-delta32* em pacientes com carcinoma de mama e procurar uma correlação com parâmetros prognósticos da doença;
- ❖ Analisar a expressão da proteína *CCL5* em amostras de sobrenadante tumoral e normal de pacientes com câncer mama e correlacioná-la com parâmetros prognósticos da doença;
- ❖ Avaliar a possível correlação entre a presença da variante alélica *delta32* e a expressão proteica de *CCL5*.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O convite às pacientes com diagnóstico de câncer de mama para participarem deste estudo ocorreu durante o atendimento Clínico Oncológico no Hospital do Câncer de Londrina no período de 2011 a 2015. O grupo controle foi proveniente da Unidade Básica de Saúde (UBS) Orlando Sestari, Bairro União da Vitória, Londrina, PR. As atividades de pesquisa foram realizadas no Laboratório de Polimorfismos de DNA e Imunologia e Genética Molecular, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Foram obtidas para o presente estudo:

- 167 amostras de sangue periférico de pacientes portadoras de carcinoma de mama para o estudo de associação caso-controle;
- 179 amostras de sangue periférico de mulheres livres de carcinoma de mama para o estudo de associação caso-controle;
- 24 blocos de parafina contendo tecido normal e tumoral para as análises de imunohistoquímica;
- 49 amostras de sobrenadante de tecidos tumorais e normais a fresco para as análises de expressão proteica por método de enzimaensaio (ELISA);

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 17123113400005231, segundo resolução 466/2012). Todas as participantes do estudo (pacientes e controles) assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente à obtenção das amostras.

#### 3.2 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA SEGUNDO UICC

O critério para a classificação dos tumores envolvidos no presente estudo seguiu a sistematização da União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM). Após a avaliação destes fatores, os casos foram classificados em estadiamentos que variaram de I a IV graus crescentes de gravidade da doença os quais sintetizam as classificações conforme o tamanho do tumor (T), comprometimento nodular (N) e metástases (M), além de agrupar as diversas combinações possíveis (Sobin *et al.*, 2009).

### 3.3 OBTENÇÃO DO DNA DE SANGUE PERIFÉRICO E DE TECIDO MAMÁRIO

O DNA genômico proveniente de leucócitos do sangue periférico de pacientes e controles foi extraído a partir de 200 µL do sangue total, coletado com EDTA como anticoagulante, utilizando-se o método de coluna de resina (Kit de Extração Mini Spin Plus, BioPur, Curitiba, Paraná, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi eluído em 50µL do tampão fornecido e estocado a -20°C.

Os tecidos mamários tumoral e normal pós-cirúrgico, previamente separados pelo anatomopatologista, foram homogeneizados por pinçamentos sucessivos em solução fisiológica estéril e posteriormente centrifugados a 2000 rpm para obtenção das células do tecido. A partir destas, foram obtidos os DNAs, tanto dos tecidos normais quanto dos tumorais, após digestão protéica com Proteinase K, e ressuspensos em 50 µL de água milli-Q autoclavada, e o sobrenadante reservado e armazenado a -20°C para reação de ELISA.

Suas concentrações foram determinadas por espectrofotometria a 260nm (NanoDrop ND-2000-ThermoScientific, Wilmington, DE, EUA).

### 3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA O POLIMORFISMO CCR5-DELTA32

Os *primers* para o gene *CCR5* foram sintetizadas de acordo com as sequências depositadas no *GenBank*, sob número de acesso AF009962 (Aoki *et al.*, 2009).

As reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em termociclador Master cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) e consistiram de um ciclo com uma temperatura inicial de 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de um minuto a 94°C para desnaturação, um minuto a 57° para anelamento e um minuto a 72°C para extensão das fitas, e por fim uma temperatura de 72°C durante 10 minutos para uma extensão final.

Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucléicos, e com um controle positivo, no qual se utilizou DNA de amostra previamente testada e positiva. As amostras foram analisadas e visualizadas em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata.

### 3.5 ANÁLISE DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Para análise de expressão por imunohistoquímica, foram utilizados cortes histológicos de 5µm de tecido tumoral de mama e tecido normal adjacente ao tumor, embebidos em blocos de parafina.

O processo de coloração foi realizado por automação em equipamento *BenchMark XTsystem* (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Para recuperação antigênica foram utilizados reagentes próprios (*cell conditioner 1*, por 60 mn – Ventana Medical Systems – Tucson, AZ, EUA), (pH 8) contendo Tris/Borate/EDTA, e posterior adição do anticorpo monoclonal primário-IgG de coelho anti-CCL5 humano na diluição 1/200, durante 32 minutos (clone 236A/E7; Abcam, Cambridge, UK; eBioscience).

As amostras foram incubadas com anticorpo secundário biotinelado específico por 30 minutos. *Streptavidin horseradish* peroxidase e *3,3-diaminobenzidine* foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante (DAB Ultraview paraffin detection Kit, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA).

A contra coloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Gill e a montagem das lâminas realizada em bálsamo do Canadá.

Não foi possível estabelecer um controle positivo do anticorpo primário uma vez que não existe descrição na literatura de tecido normal que expresse CCL5.

A análise das lâminas foi realizada com auxílio de patologista especializado. O protocolo de análise foi estabelecido no próprio laboratório de pesquisa. Foram considerados os seguintes padrões de marcação: 0=ausência de marcação; +: marcação fraca; ++: marcação moderada e +++: marcação forte.

### 3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DE CCL5 POR ELISA

Amostras de tumores e tecidos adjacentes normais da glândula mamária foram ressuspendidas em 5 mL de solução fisiológica. Após centrifugação a 500xg, o sobrenadante foi recolhido e reservado para ELISA.

A análise foi realizada utilizando RayBio® Human Rantes (RayBiotech, Norcross, GA, EUA). O sobrenadante de cada grupo foi recolhido, adicionado à placa pré-revestida com anticorpo monoclonal anti-CCL5 humano e incubado durante a noite a 4-8°C. Em seguida, as amostras foram lavadas e o anticorpo secundário biotinelado-*Horse Radish* Peroxidase + Sav

conjugado foram adicionados. Após lavagem, adicionou-se imediatamente o substrato peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e cromógeno 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), seguido por solução de bloqueio de ácido fosfórico 1M. A placa de ELISA foi lida no comprimento de onda de 450 nm utilizando ELX-300 Reader (BioTek, Instrument Corporation, VT, EUA).

Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada amostra tumoral e normal foi realizada em duas repetições. A sensibilidade do ensaio foi de 2 pg/mL. O processamento de dados foi realizado utilizando o *software* Gen5 (BioTek, Instrument Corporation, VT, EUA).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagens (%).

As variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP).

O estudo de associação do tipo caso controle foi realizado pelo cálculo da Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança a 95%. As demais análises estatísticas foram realizadas pelos testes de Mann–Whitney e correlação Tau b de Kendal, utilizando-se os programa SPSS Statistics 20.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA) e Graph Pad 5 (Graph Pad Software, San Diego, USA). Para todos os dados, o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 4 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### Artigo 1

#### **“*CCR5-delta32* allelic variant and CCL5 protein expression in breast cancer susceptibility and prognosis”**

#### **Abstract**

Chemokines can act as pro-tumoral or anti-tumoral regulators of malignancy by affecting cells of the tumor microenvironment and the tumor cells themselves. The chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5/RANTES) has been identified as a key node in the bidirectional communication between breast cancer (BC) and normal cells. The activation of the C-C motif chemokine receptor 5 (CCR5) in BC cells controls invasiveness serving as a driver for metastasis. In this context, the aim of the present study was to determine whether a polymorphism in *CCR5* gene (*rs333/delta32*) and the CCL5 protein expression, by conventional polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry (IHC), respectively, were associated with BC susceptibility and prognosis. The peripheral blood samples (167) and tissue samples (24) were obtained from BC patients, and peripheral blood samples from 179 were taken as controls. It was found no significant association between *CCR5* allelic variant and BC susceptibility (OR=1.35; CI95%=0,63-2.91). Analysis in relation to prognostic parameters found a significant association between *CCR5-delta32* and lymph nodes commitment and/or metastasis ( $p= 0.02$ ). The IHC analysis showed that the tumoral cell cytoplasm staining was predominant in all tissue samples and when it was compared the CCL5 staining profile and prognostic parameters from patients, there were no significant associations. The fact that *CCR5-delta32* has been shown to be associated with metastatic process and that cytoplasm tumoral staining was more intense requiring future validation, but may indicate this axis chemokine/receptor as a candidate marker for prognosis in breast carcinogenesis.

**Keywords:** prognosis; CCL5; CCR5; immunohistochemistry; polymorphism; breast cancer.

## Introduction

Breast cancer (BC) present highest incidence and mortality in women population in the world, both in developing and developed countries. For Brazil, in 2016, it was expected 57,960 new cases of BC, with an estimated risk of 56.20 cases per 100,000 women (INCA 2015).

BC cells can be found in different types of human body tissue and lymph nodes, which have a favorable microenvironment for BC cells survival. Specific chemo-attractive molecules and signaling pathways can promote migration and growth of breast tumors to these distant places, as chemokines superfamily and their receptors (Karnoub and Weinberg 2006, Hinton, Avraham et al. 2010).

Chemokines can act as pro-tumoral or anti-tumoral regulators of malignancy by affecting cells of the tumor microenvironment (leukocytes, endothelial cells, fibroblasts) and the tumor cells themselves (migration, invasion, proliferation, resistance to chemotherapy). The chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5/RANTES), which can be secreted either by tumor cells or by mesenchymal stromal cells recruited to the tumor, has been identified as a key node in the bidirectional communication between tumoral and normal breast cells (Velasco-Velazquez and Pestell 2013). CCL5 produced by mesenchymal stem cells (MSCs) acts to induce malignancy-associated changes in BC cells, to promote spread through binding with its cognate receptor, the C-C motif chemokine receptor 5 (CCR5) (Karnoub, Dash et al. 2007).

The activation of CCR5 in BC cells controls their invasiveness serving as a driver for metastasis. It is a seven transmembrane protein expressed by the main cells of immune system, such as macrophages, T cells, immature dendritic cells and monocytes, playing important roles in the inflammatory responses, and also enhancing the immune reaction by stimulating the activation and proliferation of T cells and macrophages (Alkhatib 2009, Flanagan 2014). Polymorphic variations in *CCR5* gene, in particular the *delta32* leads to decreased expression and dysfunction of the receptor (Nahon, Sutton et al. 2008, Ahmadabadi, Hassanshahi et al. 2013). *CCR5-delta32* consists is a 32-base pair deletion in the coding region, encodes a truncated inactive receptor that is not expressed on the cell membrane (Liu, Paxton et al. 1996).

CCL5/CCR5 antagonism has been shown to inhibit BC metastasis (Velasco-Velazquez, Jiao et al. 2012), leading to tumors that are pale and necrotic (Robinson, Scott et al. 2003). Specific therapies inhibiting CCL5/CCR5 axis may not only prevent malignant progression, but also significantly delay tumor growth by inhibiting the angiogenic switch in primary tumors and disseminated micrometastasis (Sax et al. 2016). Furthermore, this axis participates in the (Robinson, Scott et al. 2003) recruitment of specific immune cells into tumors, inducing local immunosuppression and favoring tumor progression (Velasco-Velazquez, Xolalpa et al. 2014, Weitzenfeld and Ben-Baruch 2014).

In this context, the aim of the present study was to determine whether the genetic variant *CCR5-delta32* and the CCL5 protein expression were associated with BC susceptibility and prognosis in a breast cancer patient's sample.

## **Materials and methods**

### **Human subjects**

Human Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil, approved the present study (CAAE 17123113400005231). Patients and controls were informed in detail regarding the research, and the Consent Term was obtained.

The peripheral blood samples (167) and tissue samples (24) were obtained from BC patients, who had undergone surgery at the Londrina Cancer Hospital (LCH), Parana State, Brazil, and peripheral blood from 179 control women, from Basic Assistance Unity Orlando Sestari, Londrina, PR. Control group, taken from the same patients Parana, Brazil, geographic region, had no BC confirmed by clinical and imaging examination, no self-declared family history of BC and personal history of any malignant disease.

### **Prognostic parameters**

Data relating to clinicopathologic parameters and immunohistochemistry (IHC) subgroups of BC were kindly provided by LCH. The parameters included: tumor size, lymph nodes involvement and/or distant metastasis, nuclear grade and tumoral staging (TNM classification), were determined according to the Union of International Control of Cancer classification criteria (Sobin, Gospodarowicz et al. 2009).

BC subgroups were determined according to IHC profile of estrogen (ER) and progesterone (EP) receptors and human epidermal growth factor 2 (HER2) oncogene adopted in the LCH, available in the medical records. IHC were performed by pathologists who followed the score criteria present in the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations (Hammond, Hayes et al. 2010, Wolff, Hammond et al. 2013). The parameter tumor size was subdivided into classes according to a criterion based on the chemotherapy treatment adopted by the LCH: absence of chemotherapy (up to 1.5 cm), adjuvant chemotherapy (between 1.5 and 3 cm) and neoadjuvant chemotherapy (greater than 3 cm).

BC subgroups were termed: 76.65% Luminal A or B (positive for ER and/or EP receptors), 7.18% HER2+ (positive for the HER2 overexpression) and 16.17% triple negative (TN) (negative for the hormone receptors and for HER2 overexpression).

### **Genomic DNA extraction**

Genomic DNA was obtained from samples of peripheral blood cells of 167 BC women and 179 healthy control women, using Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Parana, Brazil), according to manufacturer instructions. DNA was resuspended in 50 uL of elution buffer and quantified by NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) at a wavelength of 260/280 nm. Final preparation was stored at -20C° and used as template in polymerase chain reactions (PCRs).

### ***CCR5-delta32* polymorphism**

Genotyping of *CCR5-delta32* was determined by conventional PCR, using specific primers according to sequences deposited in GenBank, under accession number AF009962 (Aoki et al. 2009). Samples were amplified with genomic DNA (100 ng) and the buffer kit plus 1.25 units of Taq polymerase (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) at 25 uL of final volume, in a Master Cycler Gradient thermal (Eppendorf, Hamburg, Germany). Negative controls were employed to make sure that no contaminants were introduced.

PCR conditions were as follows: denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 57°C and 1 min at 72°C and 10 min of elongation at 72°C. All PCR products were analyzed on polyacrylamide gel (10%) eletroforesis, stained with silver nitrate.



### **CCL5 protein expression**

For IHC, 5 $\mu$ m of tissue sections were obtained from 24 BC tumors samples. IHC was assessed according to manufacturer recommendations on an immune staining (Benchmark XT system, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Antigen retrieval was performed with proprietary reagents (cell conditioner 1 for 60mn, Ventana Medical Systems). A mouse/rabbit monoclonal antibody for human CCL5 (clone 236A/E7; Abcam, Cambridge, UK; eBioscience) was applied on each sample, at room temperature, for 32 min. Sections were incubated with a specific secondary biotinylated antibody for 30 min. Streptavidin horseradish peroxidase, and 3,3-diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (DAB Ultraview paraffin detection kit, Ventana Medical Systems). Finally, sections were counterstained with hematoxylin and mounted with Canada balsam.

CCL5 staining was evaluated in tumor and normal adjacent tissues by an experienced pathologist. The protocol was established at the research laboratory. For the staining scores were considered: 0: no staining, +: weak staining, ++: moderate staining and +++: strong staining.

### **Statistical analysis**

The categorical variables were expressed as absolute numbers. genotypes and allele frequencies were determined using Fisher's exact test. For case control study, an estimative of the relative risk, at 95% confidence intervals (CI) was calculated as the Odds ratio (OR). Correlation analyses involving the allelic variant and IHC profile in relation to prognostic parameters were performed by Kendall's Tau b test (SPSS 20.0 Inc., Chicago, IL, USA).  $P < 0.05$  values were considered statistically significant.

### **Results**

The range of mean age for BC patients was 56 years and for control group was 53 years ( $p > 0.05$ ). Although some clinicopathologic characteristics were not available, it was observed that 90.65% of patients presented ductal carcinoma, 2.92% presented lobular carcinoma, 5.26% presented *in situ* carcinoma and 1.17% presented rare subtypes of BC.

Electrophoretic profile for *CCR5-delta32* polymorphism is demonstrated in Figure 1. Genotype distribution and case control study association are showed in Table 1. In the present

study, we did not find any association between delta-32 genetic variant and BC susceptibility (*CCR5-delta32*: OR=1.35; CI 95%=0.63-2.91).

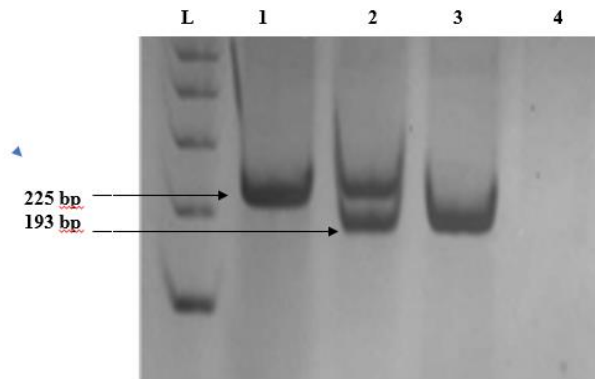


Figure1. **Electrophoretic profile of *CCR5-delta32* polymorphism.** PCR products were detected using silver staining method after polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1: wild-type homozygous genotype (wt/wt) yields 225-bp; Lane 2: heterozygous genotype (wt/delta32) yields 225-bp and 193-bp; Lane 3: mutated homozygous genotype (delta32/delta32) yielded a 193-bp product. L: 100bp DNA ladder (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA); 4: negative control.

Table 1. Allelic and genotypic frequencies in a case control study of *CCR5-delta32* polymorphism in BC patients and neoplasia-free controls.

		<i>BC</i>		<i>Control</i>		<i>OR (CI95%)</i>	<i>p value</i> <sup>a</sup>
		N	%	N	%		
<i>Genotypes</i>	WT/WT	151	90.42	166	92.74		
	WT/ delta32	16	9.58	12	6.70	1.35 (0.63-2.91)	0.45
	delta32/delta32	0	0	1	0.56		
<i>Allele frequency</i>	WT	318	90.42	344	96.09	1.24 (0.59 -2.58)	0.58
	delta32	16	9.58	14	3.91		

OR: Odds ratio; CI: confidence interval. <sup>a</sup> Fisher's exact test

WT/WT: wild-type homozygous genotype, Wt/delta32: heterozygous genotype, delta32/delta-32: mutated homozygous genotype

Analysis in relation to prognostic parameters significant correlation was not found in relation to tumor size, tumor staging and carcinoma subtypes. On the other hand, it was a significant correlation between *CCR5-delta32* and lymph nodes commitment and/or metastasis parameter ( $p=0.02$ ) (Table 2).

Table 2: *CCR5-delta32* analysis in relation to BC clinical prognostic parameters.

Prognostic Parameters		Number of individuals n (%)	<i>CCR5-delta32</i> genotypes	
			WT/WT n (%)	WT/delta32 + delta32/delta32 n (%)
Tumor size (cm) (n = 165)	0 - 1.5	50 (30.30)	45 (27.27)	5 (3.03)
	>1.5 - 3.0	99 (60.00)	89 (53.94)	10 (6.06)
	> 3.0	16 (9.70)	15 (9.09)	1 (0.61)
		$\tau = -0.021$	$p=0.79$	
Lymph nodes commitment and/or metastasis (n = 164)	Absent	77 (46.95)	74 (45.12)	3 (1.83)
	Present	87 (53.05)	74 (45.12)	13 (7.93)
		$\tau = 0.19$	$p=0.02^*$	
Tumoral staging (n = 166)	I	40 (24.10)	39 (23.49)	1 (0.61)
	II	70 (42.17)	62 (37.35)	8 (4.82)
	III	43 (25.90)	37 (22.29)	6 (3.61)
	IV	13 (7.83)	12 (7.23)	1 (0.60)
		$\tau = 0.10$	$p =0.16$	
Progesterone receptor (n = 167)	Negative	95 (56.89)	85 (50.90)	10 (5.99)
	Positive	72 (43.11)	66 (39.52)	6 (3.59)
		$\tau = -0.04$	$p =0.634$	
Estrogen receptor (n = 167)	Negative	41 (24.55)	36 (21.56)	5(2.99)
	Positive	126(75.45)	115 (68.86)	11 (6.59)
		$\tau =- 0.05$	$p =0.51$	
HER2 overexpression (n = 162)	Negative	136 (83.95)	122 (75.32)	14 (8.63)
	Positive	26 (16.05)	24 (14.81)	2 (1.24)
		$\tau = -0.13$	$p =0.68$	
Triple negative subtype (n = 166)	Yes	26 (15.67)	21 (12.65)	5 (3.02)
	No	140 (84.33)	129 (77.71)	11 (6.62)
		$\tau = 0.19$	$p =0.07$	

Tau\_b Kendall,  $p < 0.05$  values were considered statistically significant

WT/WT: wild-type homozygous genotype, WT/delta32: heterozygous genotype, delta32/delta-32: mutated homozygous genotype

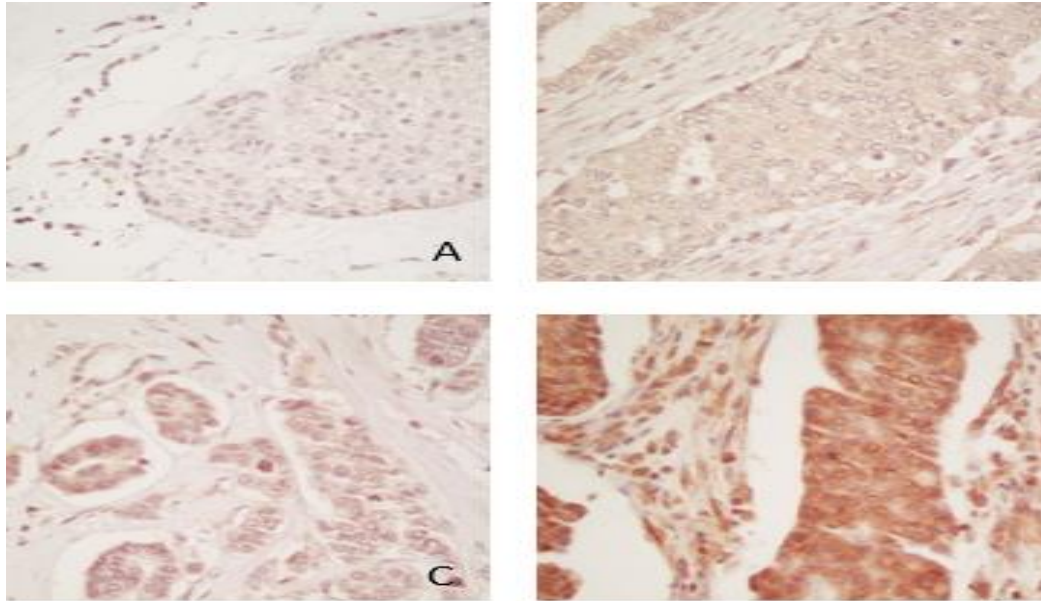


Figure 2. **CCL5 protein expression in breast carcinoma tissue samples.** CCL5 immunoreactivity was observed in the cell membrane and on cytoplasm of tumor epithelial cells. Representative micrograph result for positive CCL5 staining: (A) not staining, (B) weak staining = 1, (C) moderate staining = 2, and (D) strong staining = 3. CCL5 cytoplasmic expression in invasive breast carcinoma (200x).

### **Immunohistochemistry analysis**

In 24 BC patients analyzed for CCL5 protein expression, tumoral cytoplasm staining was predominant in all samples (Figure 1). When it was compared CCL5 staining and BC prognostic parameters, there was no significant correlation in relation to tumor size ( $p=0.86$ ), lymph node involvement and/or metastasis ( $p=0.97$ ), tumor staging ( $p=0.80$ ), Ki67 ( $p=0.60$ ), progesterone receptor ( $p=0.63$ ), estrogen receptor ( $p=0.92$ ) and HER2 overexpression ( $p=0.902$ ). CCL5 protein profile was also analyzed in relation to *CCR5-delta32* variant, but no significant correlation was found (Table 3).

Table 3: CCL5 staining status in breast cancer samples in relation to *CCR5-delta32* polymorphism.

	Staining scores	<i>CCR5</i> genotypes	
		WT/WT n(%)	WT/delta32 n(%)
CCL5 staining	+	5 (20.83)	3 (12.50)
	++	4 (16.67)	3 (12.50)
	+++	3 (12.50)	6 (25.00)
		$\tau=0.24$	$p=0.23$

Kendalls' tau\_b test; +: weak, ++: moderate, and +++: strong.

WT/WT: wild-type homozygous genotype, Wt/delta32: heterozygous genotype

## Discussion

The main findings of the present study were that *CCR5-delta32* analysis in relation to prognosis showed a significant correlation in relation to lymph nodes commitment and/or metastasis parameter ( $p=0.02$ ). This association warrants further investigation in BC larger samples, but may suggest this receptor as a candidate prognostic marker for mammary carcinogenesis. Also, CCL5 protein immunostaining in cytoplasm was predominant in all BC samples, either in normal and tumoral cells.

It was found that the frequency of *CCR5-delta32* genotypes and alleles were in agreement with previous studies carried out in other Brazilian populations (Brajao de Oliveira, Reiche et al. 2007, Kaimen-Maciel, Reiche et al. 2007, Reiche, Ehara Watanabe et al. 2008, Baltus, Kallaur et al. 2016) and in worldwide populations.

CCR5 is the major receptor for the CC chemokine and is capable to bind to CCL3 (MIP1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP1 $\beta$ ), and CCL5. It is expressed not only in immune cells, such as Th1 cells, Treg cells, and NK cells, but also in non-immune cells including neurons, fibroblasts, epithelial, and endothelial cells (Mackay 2001, Shachar and Karin 2013). CCL5 is as one of the key chemotactic factors for macrophages in BC. It was shown that tumor cell-derived CCL5 promoted BC by recruiting macrophages into the tumor microenvironment (Datar, Qiu et al. 2015).

In many years, association between chemokines and their receptors for BC neoplasia has become a hot topic (Muller, Homey et al. 2001). Epidemiological studies showed that *CCR5*rs333 polymorphism was associated with cancer development, including prostate and bladder cancers (Balistreri, Carruba et al. 2009, Kucukgergin, Isman et al. 2012). However, some studies indicated that there was no significant association between *delta-32* and cancer susceptibility, such as prostate cancer (Zambra, Biolchi et al. 2013), and also BC (Degerli, Yilmaz et al. 2005, Aoki, da Silva do Amaral Herrera et al. 2009).

In a study realized by our research group, Aoki, da Silva do Amaral Herrera et al. (2009) no differences were detected for *delta-32* variant between BC patients and control donors. Also involving a Brazilian population de Oliveira, Amarante et al. (2014) observed no significant differences in *CCR5-delta32* genotypes between acute lymphoblastic leukemia (ALL) and a neoplasia-free group, indicating no effect of this genetic variant on susceptibility and recurrence risk for this disease. In this study, we did not find any association between this genetic variant and BC susceptibility. These all results may reflect absence of association, but should be interpreted with caution, especially given the low frequency of this polymorphism in South Brazilian population, which hinders association studies involving low penetrance genes. In a meta-analysis approach to compile various studies involving *CCR5-delta32* in Brazilian populations, it was found a moderate frequency; moreover, this allele was found to occur slightly more frequent in South and Southeast than in populations from North and Northeast regions, reflecting Brazilian migration patterns, which involved mixing of different ethnic populations (Silva-Carvalho, de Moura et al. 2016).

Association between *CCR5-delta32* polymorphism, clinical features and prognosis of BC has been investigated (Zhang, Meng et al. 2013). In this context, we also investigated whether this polymorphism could be involved with BC prognostic parameters. It was found no significant correlation in relation to tumor size, tumor staging and carcinoma subtypes. On the other hand, it was a significant correlation between *CCR5-delta32* and lymph nodes commitment and/or metastasis parameter. Axillary lymph nodes and metastasis are considered to be the most important prognostic factors for BC (Eisenberg, Koifman et al. 2001). In a study carried out by Zhang, Meng et al. (2013) *CCR5* receptor plays a role in BC susceptibility and axillary lymph node metastasis parameter, and it can be used indirectly as a marker of prognosis.

Altered expression of chemokines and their receptors and outcome parameters have been found in many pathological conditions, including cancer. *CCL5* produced by cells in the

tumor microenvironment has been established as an important contributor to metastatic disease (Khalid, Wolfram et al. 2015). In this study, CCL5 protein immunostaining in cytoplasm was predominant in all samples; however, when it was compared to BC prognostic parameters, there were no significant associations. In this context, Niwa, Akamatsu et al. (2001) and Luboshits, Shina et al. (1999) have reported elevated CCL5 levels in BC patients. It has been also showed by immunohistochemistry that CCL5 protein expression was co-localized with lymphatic endothelial cells in the lungs of tumor-bearing mice; however, normal mice without tumors did not show CCL5 expression in lymphatic endothelial cells (Lee, Fertig et al. 2014).

All in all, *CCR5-delta32* has been shown to be associated with metastatic process and CCL5 cytoplasmic staining was predominant in both normal and tumoral tissue. These both results require future validation, but possibly indicate this axis chemokine/receptor as candidate marker in breast carcinogenesis.

### **Conflict of Interests**

The authors declare that there is no conflict of interests.

### **Acknowledgments**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and State University of Londrina Coordination for Post-Graduation (PROPPG-UEL). The authors wish to express their gratitude to Fundação Araucária do Paraná, CAPES, and Secretaria da Ciencia, Tecnologia e Ensino Superior (SETI).

## References

- Ahmadabadi, B. N., G. Hassanshahi, H. Khoramdelazad, V. Mirzaei, S. M. Sajadi, M. Hajghani, H. Khodadadi, R. Pourali, M. K. Arababadi and D. Kennedy (2013). "Downregulation of CCR5 expression on the peripheral blood CD8+ T cells of southeastern Iranian patients with chronic hepatitis B infection." *Inflammation***36**(1): 136-140.
- Alkhatib, G. (2009). "The biology of CCR5 and CXCR4." *Curr Opin HIV AIDS***4**(2): 96-103.
- Aoki, M. N., A. C. da Silva do Amaral Herrera, M. K. Amarante, J. L. do Val Carneiro, M. H. Fungaro and M. A. Watanabe (2009). "CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development." *Int J Mol Med***23**(3): 429-435.
- Balistreri, C. R., G. Carruba, M. Calabro, I. Campisi, D. Di Carlo, D. Lio, G. Colonna-Romano, G. Candore and C. Caruso (2009). "CCR5 proinflammatory allele in prostate cancer risk: a pilot study in patients and centenarians from Sicily." *Ann N Y Acad Sci***1155**: 289-292.
- Baltus, T. H., A. P. Kallaur, M. A. Lozovoy, H. K. Morimoto, F. Delongui, D. F. Alfieri, T. M. Iriyoda, I. Dichi, A. N. Simao and E. M. Reiche (2016). "CCR5Delta32 (rs333) polymorphism is associated with the susceptibility to systemic lupus erythematosus in female Brazilian patients." *Rheumatol Int***36**(1): 7-15.
- Brajao de Oliveira, K., E. M. Reiche, H. Kaminami Morimoto, M. H. Pelegrinelli Fungaro, D. Estevao, R. Pontello, T. Franco Nasser and M. A. Watanabe (2007). "Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis." *J Cutan Pathol***34**(1): 27-32.
- Datar, I., X. Qiu, H. Z. Ma, M. Yeung, S. Aras, I. de la Serna, F. Al-Mulla, J. P. Thiery, R. Trumbly, X. Fan, H. Cui and K. C. Yeung (2015). "RKIP regulates CCL5 expression to inhibit breast cancer invasion and metastasis by controlling macrophage infiltration." *Oncotarget***6**(36): 39050-39061.
- de Oliveira, C. E., M. K. Amarante, L. Perim Ade, P. M. Ozawa, C. Hiroki, G. A. Freire Vitiello, R. Losi Guembarovski and M. A. Watanabe (2014). "Absence of Association between CCR5 rs333 Polymorphism and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia." *Adv Hematol***2014**: 924030.
- Degerli, N., E. Yilmaz and F. Bardakci (2005). "The delta32 allele distribution of the CCR5 gene and its relationship with certain cancers in a Turkish population." *Clin Biochem***38**(3): 248-252.
- Eisenberg, A., S. Koifman and L. Cordeiro de Rezende (2001). "Predictive factors to lymph node involvement on breast cancer " *Revista Brasileira de Cancerologia* **47**(n°4 Out/Nov/Dez ).
- Flanagan, C. A. (2014). "Receptor conformation and constitutive activity in CCR5 chemokine receptor function and HIV infection." *Adv Pharmacol***70**: 215-263.
- Hammond, M. E., D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerty, S. Badve, P. L. Fitzgibbons, G. Francis, N. S. Goldstein, M. Hayes, D. G. Hicks, S. Lester, R. Love, P. B. Mangu, L. McShane, K. Miller, C. K. Osborne, S. Paik, J. Perlmutter, A. Rhodes, H. Sasano,



J. N. Schwartz, F. C. Sweep, S. Taube, E. E. Torlakovic, P. Valenstein, G. Viale, D. Visscher, T. Wheeler, R. B. Williams, J. L. Wittliff and A. C. Wolff (2010). "American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer." J Clin Oncol**28**(16): 2784-2795.

Hinton, C. V., S. Avraham and H. K. Avraham (2010). "Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain." Clin Exp Metastasis**27**(2): 97-105.

INCA (2015). Estimativa Cancer 2016- Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil, MINISTÉRIO DA SAÚDE- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

Kaimen-Maciél, D. R., E. M. Reiche, D. G. Brum Souza, E. R. Frota Comini, F. Bobroff, H. K. Morimoto, M. A. Ehara Watanabe, J. Carvalho De Oliveira, T. Matsuo, J. Lopes and E. A. Donadi (2007). "CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis." Int J Mol Med**20**(3): 337-344.

Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo and R. A. Weinberg (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." Nature**449**(7162): 557-563.

Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2006). "Chemokine networks and breast cancer metastasis." Breast Dis**26**: 75-85.

Khalid, A., J. Wolfram, I. Ferrari, C. Mu, J. Mai, Z. Yang, Y. Zhao, M. Ferrari, X. Ma and H. Shen (2015). "Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer." Mini Rev Med Chem**15**(13): 1063-1072.

Kucukgergin, C., F. K. Isman, B. Cakmakoglu, O. Sanli and S. Seckin (2012). "Association of polymorphisms in MCP-1, CCR2, and CCR5 genes with the risk and clinicopathological characteristics of prostate cancer." DNA Cell Biol**31**(8): 1418-1424.

Lee, E., E. J. Fertig, K. Jin, S. Sukumar, N. B. Pandey and A. S. Popel (2014). "Breast cancer cells condition lymphatic endothelial cells within pre-metastatic niches to promote metastasis." Nat Commun**5**: 4715.

Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup and N. R. Landau (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell**86**(3): 367-377.

Luboshits, G., S. Shina, O. Kaplan, S. Engelberg, D. Nass, B. Lifshitz-Mercer, S. Chaitchik, I. Keydar and A. Ben-Baruch (1999). "Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma." Cancer Res**59**(18): 4681-4687.

Mackay, C. R. (2001). "Chemokines: immunology's high impact factors." Nat Immunol**2**(2): 95-101.

- Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature**410**(6824): 50-56.
- Nahon, P., A. Sutton, P. Rufat, C. Simon, J. C. Trinchet, L. Gattegno, M. Beaugrand and N. Charnaux (2008). "Chemokine system polymorphisms, survival and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis." World J Gastroenterol**14**(5): 713-719.
- Niwa, Y., H. Akamatsu, H. Niwa, H. Sumi, Y. Ozaki and A. Abe (2001). "Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer." Clin Cancer Res**7**(2): 285-289.
- Reiche, E. M., M. A. Ehara Watanabe, A. M. Bonametti, H. K. Morimoto, A. Akira Morimoto, S. L. Wiechmann, T. Matsuo, J. Carvalho De Oliveira and F. Vissoci Reiche (2008). "Frequency of CCR5-Delta32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population." Int J Mol Med**22**(5): 669-675.
- Robinson, S. C., K. A. Scott, J. L. Wilson, R. G. Thompson, A. E. Proudfoot and F. R. Balkwill (2003). "A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth." Cancer Res**63**(23): 8360-8365.
- Sax, M. J., C. Gasch, V. R. Athota, R. Freeman, P. Rasighaemi, D. E. Westcott, C. J. Day, I. Nikolic, B. Elsworth, M. Wei, K. Rogers, A. Swarbrick, V. Mittal, N. Pouliot and A. S. Mellick (2016). "Cancer cell CCL5 mediates bone marrow independent angiogenesis in breast cancer." Oncotarget.
- Shachar, I. and N. Karin (2013). "The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications." J Leukoc Biol**93**(1): 51-61.
- Silva-Carvalho, W. H., R. R. de Moura, A. V. Coelho, S. Crovella and R. L. Guimaraes (2016). "Frequency of the CCR5-delta32 allele in Brazilian populations: A systematic literature review and meta-analysis." Infect Genet Evol.
- Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2009). TNM classification of malignant tumours. Oxford.
- Velasco-Velazquez, M., X. Jiao, M. De La Fuente, T. G. Pestell, A. Ertel, M. P. Lisanti and R. G. Pestell (2012). "CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells." Cancer Res**72**(15): 3839-3850.
- Velasco-Velazquez, M. and R. G. Pestell (2013). "The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer." Oncoimmunology**2**(4): e23660.
- Velasco-Velazquez, M., W. Xolalpa and R. G. Pestell (2014). "The potential to target CCL5/CCR5 in breast cancer." Expert Opin Ther Targets**18**(11): 1265-1275.

Weitzenfeld, P. and A. Ben-Baruch (2014). "The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer." Cancer Lett**352**(1): 36-53.

Wolff, A. C., M. E. Hammond, D. G. Hicks, M. Dowsett, L. M. McShane, K. H. Allison, D. C. Allred, J. M. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, P. B. Mangu, S. Paik, E. A. Perez, M. F. Press, P. A. Spears, G. H. Vance, G. Viale, D. F. Hayes, O. American Society of Clinical and P. College of American (2013). "Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update." J Clin Oncol**31**(31): 3997-4013.

Zambra, F. M., V. Biolchi, I. S. Brum and J. A. Chies (2013). "CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." Hum Immunol**74**(8): 1003-1008.

Zhang, Y., F. Y. Meng, W. L. Li, C. X. Zhou, Z. Guan and H. Y. Fan (2013). "Association of chemotactic factor receptor 5 gene with breast cancer." Genet Mol Res**12**(4): 5289-5300.

**ARTIGO 2****“CCL5 protein level: influence on breast cancer staging and lymph nodes commitment”****Abstract**

Many tumor cells express chemokines and chemokine receptors, and these molecules can contribute to distinct modes of metastasis processes. It is known that they play a crucial role in breast cancer (BC) tumorigenesis and progression. Considering this, it was investigated a possible role for C-Chemokine receptor type 5 (CCR5) polymorphism (*rs333/delta32*) by conventional polymerase chain reaction (PCR) and CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5) protein level by immunosorbent assay (ELISA) in 49 BC patients (resulting in 49 tumoral tissue samples and 49 adjacent normal tissue samples). There was a significant difference between CCL5 level in tumoral and adjacent normal tissues for the same BC patients ( $p < 0.0001$ ). A significant association was also found for CCL5 level in relation to lymph nodes commitment ( $p=0.03$ ). Likewise, there was a significant difference in CCL5 level from tumor tissue of stage III in relation to stage I ( $p < 0.02$ ). On the other hand, it was verified that *CCR5-delta32* polymorphism presented no significant association in relation to CCL5 protein level. Considering the present findings, we suggest that CCL5 may be involved in BC staging and metastasis.

**Keywords:** CCL5, ELISA, tumoral stages, breast cancer, CCR5, polymorphism.

## Introduction

Secreted factors from each of the diverse cells in a tumor regulate inter-cellular signaling between tumor cells and microenvironment to promote breast cancer (BC) progression (Lee, Fertig et al. 2014). Specifically, cytokines, growth factors and chemokines contribute to distinct modes of metastasis and subsequent mortality (Hanahan and Weinberg 2011).

The chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), which can be secreted either by tumor cells or mesenchymal stromal cells recruited to the tumor, has been identified as a key node in the bidirectional communication between tumoral and normal breast cells (Velasco-Velazquez and Pestell 2013).

In a study involving BC cells and CCL5 overexpressed, it was found that the chemokine enhances metastasis by increasing the motility and extravasation of cancer cells, from blood to distant sites in the body (Karnoub, Dash et al. 2007). The same study also demonstrated that the CCL5-induced metastatic phenotype is reversible, since cells that have already formed metastatic lesions do not display enhanced invasiveness. Additionally, CCL5 was also shown to promote metastasis by inducing the secretion of metalloproteinases that break down surrounding extracellular matrix proteins, thereby facilitating the movement of tumor cells (Swamydas, Ricci et al. 2013).

*CCR5* gene, located on chromosome 3p21, encodes the CC chemokine receptor 5 (CCR5) (Liu, Paxton et al. 1996, Barmania, Potgieter et al. 2013). Its ligands include CCL3, CCL4, CCL8 and the CCL5 chemokines (Szpakowska, Fievez et al. 2012). A specific polymorphism in *CCR5* gene (*rs333/delta32*) was found to be associated with poor prognosis and cancer risk, such as oral, colorectal, bladder, metastatic melanoma and also breast one (Manes, Mira et al. 2003, Ugurel, Schrama et al. 2008). This *CCR5-delta32* variant consists of a 32bp deletion that results in a frameshift in the coding sequence producing a defective protein, which lacks the receptor expression on the cell surface (Liu, Paxton et al. 1996, Samson, Libert et al. 1996). Some studies have shown that disease-free survival is shorter in BC patients bearing the mutated allele, on the other hand, these individuals exhibit a significantly longer metastasis-free survival (Span, Pollakis et al. 2015).

Elevated levels of CCL5 and CCR5 have been detected in more than 58% of BC molecular subtypes (basal and HER2+) (Velasco-Velazquez and Pestell 2013). Additionally, CCL5-CCR5 interactions in the tumor microenvironment regulate metabolic events,

specifically glycolysis, to promote proliferation and invasion in BC cells (Gao, Rahbar et al. 2016).

Inside this context, the present study attempts to investigate the influence of CCL5 protein level on breast tumor microenvironment and in relation to a *CCR5-delta32* polymorphism and disease prognostic parameters.

## **METHODS**

### ***Human subjects***

Following approval from the Human Ethics Committee of State University of Londrina (CAAE 17123113400005231), tissue samples from surgeries were collected from BC patients. A term of free and informed consent was signed by all sample donors prior to biologic material collection. Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) classification criteria and pathological features included: histopathological grade, proliferation index (measured by Ki67 immunostaining), p53 immunostaining, and lymph node metastasis (Sobin, Gospodarowicz et al. 2009). Surgical excision tissue was obtained from BC patients (98 samples: 49 tumoral tissues and 49 normal adjacent tissues), free of adjuvant or neoadjuvant chemotherapy and with clinical and pathological data available from Londrina Cancer Hospital (LCH), Parana State, Brazil.

The parameter tumor size was subdivided into classes according to a criterion based on the chemotherapy treatment adopted by the LCH: absence of chemotherapy (up to 1.5 cm), adjuvant chemotherapy (between 1.5 and 3 cm) and neoadjuvant chemotherapy (greater than 3 cm)."

Due to high miscegenation rates observed in Brazilian populations, it is not reliable to classify individuals into ethnic groups by physical examination (Pimenta, Zuccherato et al. 2006). The patients were from Londrina and nearby cities, located in southern Brazilian region, which shows high degree of European inheritance (Caucasoid ethnicity) (Pena, Bastos-Rodrigues et al. 2009).

### ***Genomic DNA extraction***

Genomic DNA was obtained from tissue samples by salting-out method (Kirby 1993). DNA was resuspended in 50 µL of H<sub>2</sub>O milliQ and quantified by NanoDrop

2000c<sup>®</sup> Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) at a wavelength of 260/280 nm. Final preparation was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and used as template in polymerase chain reactions (PCRs).

### ***CCR5 (rs 333) polymorphism genotyping***

Genotyping of *CCR5-delta32* was determined by conventional PCR, using specific primers according to the sequences deposited in GenBank, under accession number AF009962 (Aoki, da Silva do Amaral Herrera et al. 2009)

The reaction was carried out in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ , using 0.1 Mm dNTPs, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1x reaction buffer, 0.15  $\mu\text{mol}$  of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, CA, USA). PCR conditions were: denaturation step at  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min, 35 cycles of 1 min at  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min at  $58^{\circ}\text{C}$  and 1 min at  $72^{\circ}\text{C}$ , and 10 min of elongation at  $72^{\circ}\text{C}$ .

PCR products were a 225 bp fragment (for wild-type) or 193 bp fragment (for deleted allele *delta32*) that were analyzed on polyacrylamide gel (10%), stained with silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ). Negative controls were employed to make sure that no contaminants were introduced.

### ***Determination of tissue CCL5 levels***

Samples from tumor and normal adjacent tissues of mammary gland were resuspended in 5 mL of saline solution. After centrifugation at 500xg the supernatant was collected and reserved for enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Analysis was performed using RayBio<sup>®</sup> Human Rantes (RayBiotech, Norcross, GA, USA). In brief, from each group supernatant was collected, added into the pre-coated plate with anti-human CCL5 monoclonal antibody and incubated overnight at  $4-8^{\circ}\text{C}$ . After, samples were washed and biotinylated secondary antibody-HRP + Sav conjugated were added. After washing, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase substrate was immediately added, followed by 1M phosphoric acid stop solution. The ELISA plate was read at wave length of 450 nm using ELX-300 Reader (BioTek, Instrument Corporation, VT, USA).

The results were expressed in pg/mL for CCL5. Each experimental and control sample was assayed in two biological replicates. Assay sensibility was 2 pg/mL. Data processing was performed using the analytical curve-fitting software Gen5 (BioTek, Instrument Corporation, VT, USA).

### *Statistical analyses*

CCL5 levels were compared to *CCR5* genotypes by Mann–Whitney U test. The continuous variables were expressed as mean and  $\pm$  standard deviation ( $\pm$ SD). Statistical analysis was performed using Prism 5 software (Graph Pad Software, San Diego, USA). Analyses involving CCL5 level in relation to prognostic parameters were performed by Chi square test (SPSS 20.0 Inc., Chicago, IL, USA).  $P < 0.05$  values were considered statistically significant.

## RESULTS

It was observed that 92.0% of patients presented ductal carcinoma, 4.0% lobular carcinoma and 4.0% presented *in situ* carcinoma. The mean age of patients was 52 years.

The electrophoretic profile for *CCR5-delta32* polymorphism is demonstrated in Figure 1. In the present sample, 72.92% of patients were homozygous for wild type genotype (wt/wt) and 27.08% were *delta32* carriers (heterozygous).

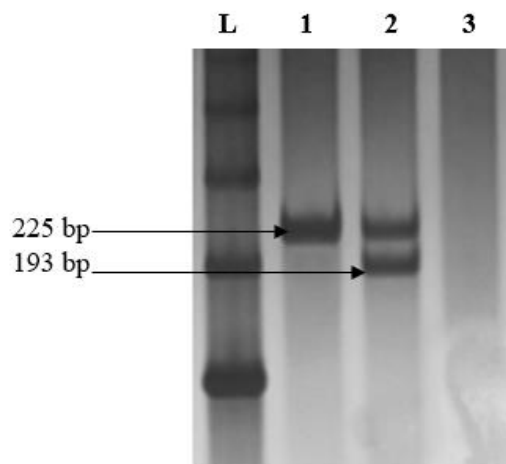


Figure1. Electrophoretic profile of *CCR5-delta32* polymorphism. The genotypes were analyzed on polyacrylamide gel (10%), stained with silver nitrate. Lane 1 wild-type homozygous genotype (wt/wt), 225 base pairs (bp); lane 2 heterozygous genotype (wt/delta32), 225bp and 193bp; lane 3: negative control; L: 100bp ladder (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA).



CCL5 level in breast tumor and normal adjacent tissues for the same patients are shown in Figure 2. The supernatant of the normal adjacent tissue presented mean concentration of 50.56 pg/mL, while tumor tissues showed higher concentration, 172.0 pg/mL ( $p < 0.0001$ )

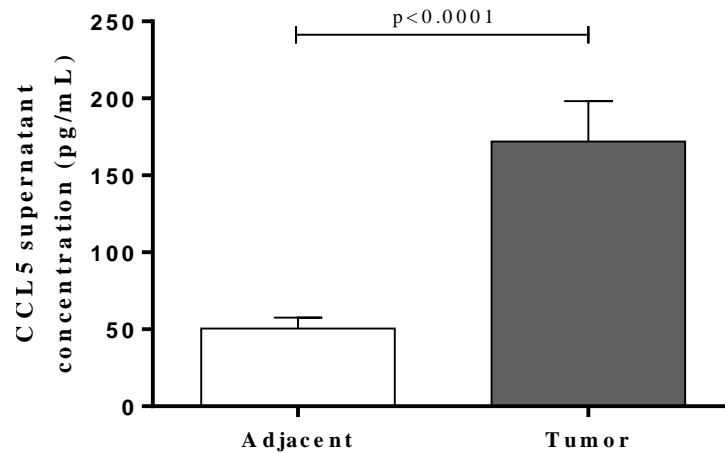


Figure 2. **CCL5 chemokine level.** CCL5 level was evaluated by ELISA in the supernatant of normal adjacent and tumoral tissues from BC patients. Each case and control sample was assayed in two biological replicates. Data processing was performed using the analytical curve-fitting software Gen5.

For CCL5 protein level in the tumor tissue, although there was no significant association between patients in stages II and IV when compared to stage I ( $p = 0.36$  and  $p = 0.45$ , respectively), there was a significant difference between stage III in relation to stage I ( $p = 0.02$ ) (Figure 3).

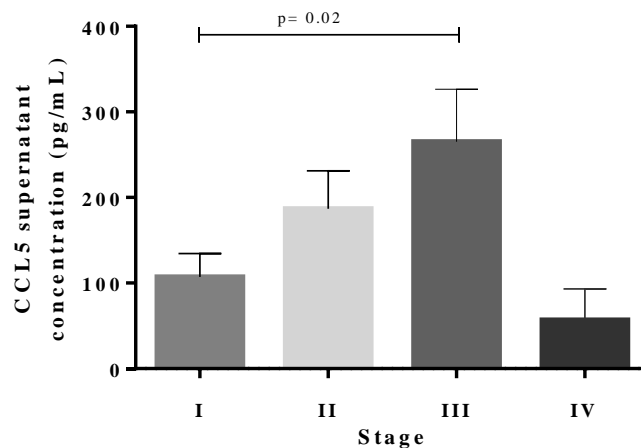


Figure 3. **CCL5 chemokine protein level according to tumor staging.** CCL5 was evaluated in relation to clinical staging in supernatant of breast tumor tissues. Bars showing CCL5 mean tissue concentration.

In the present study, there was no significant difference between CCL5 levels in tumor or normal adjacent tissues in relation to *CCR5-delta32* genotypes (Figure 4).

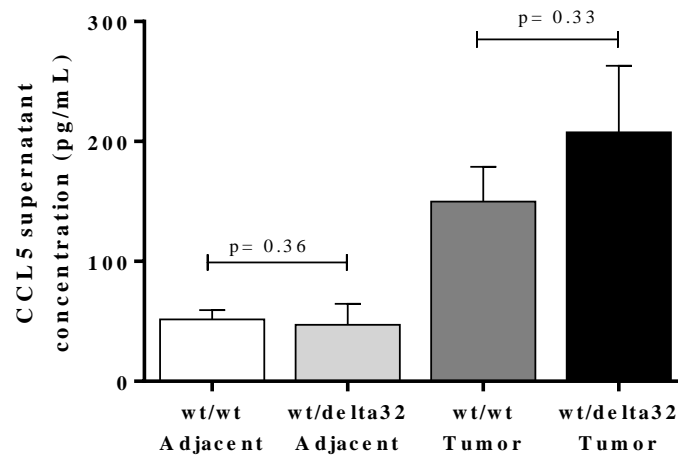


Figure 4. **CCL5 level according to *CCR5-delta32* genotypes.** Concentration in the supernatant of the normal adjacent and tumor tissues from BC patients in relation to *CCR5* rs333 genetic polymorphism.

Regarding prognostic parameters and CCL5 protein level, there was no significant difference for metastasis, estrogen and progesterone receptors, Ki67 index, p53 staining and HER2 amplification patient's parameters. However, it was verified a significant high level of CCL5 in relation to lymph nodes commitment ( $p=0.03$ ) (Table 1).

Table 1. CCL5 tumor tissue level in relation to patients prognostic parameters.

Prognostic Parameters		Number of patients n (%)	CCL5 Tumor tissue level	
			<100 pg/mL n (%)	≥100 pg/mL n (%)
Tumor size (cm) (n =47)	0 - 1.5	10 (21.27)	8 (17.02)	2 (4.25)
	>1.5- 3.0	21 (44.68)	9 (19.15)	12 (25.53)
	> 3.0	16 (34.05)	6 (12.77)	10 (21.28)
p=0.08				
Histological grade (n=47)	I	18 (38.30)	12 (25.53)	6 (12.77)
	II	21 (44.68)	7 (14.89)	14 (29.79)
	III	8 (17.02)	4 (8.51)	4 (8.51)
p=0.17				
Metastasis (n = 47)	Absent	21 (44.68)	13 (27.66)	8 (17.02)
	Present	26 (55.32)	10 (21.28)	16 (34.04)
p=0.11				
Lymph nodes commitment (n=47)	Absent	23 (48.94)	15 (31.91)	8 (16.98)
	Present	24 (51.06)	8 (17.02)	16 (34.04)
p =0.03*				
Progesterone receptor status (n = 47)	Negative	28 (59.57)	16 (34.04)	12 (25.53)
	Positive	19 (40.43)	7 (14.90)	12 (25.53)
p=0.17				
Estrogen receptor status (n = 47)	Negative	13 (27.66)	9 (19.15)	4 (8.51)
	Positive	34 (72.34)	14 (29.79)	20 (42.55)
p =0.08				
HER2 overexpression (n = 47)	Negative	41 (87.23)	20 (42.55)	21 (44.68)
	Positive	6 (12.77)	3 (6.38)	3 (6.38)
p =0.95				
Ki67 status (n =47)	Low	10 (21.28)	7 (14.89)	3 (6.39)
	Moderate	22 (46.80)	8 (17.00)	14 (29.80)
	High	15 (31.92)	8 (17.04)	7 (14.90)
p =0.19				
p53 status (n=46)	Negative	26 (56.52)	12 (26.09)	14 (30.43)
	Positive	20 (43.48)	11 (23.91)	9 (19.57)
p =0.55				

\*  $\chi^2$  test p<0.05 values were considered statistically significant.

## Discussion

The main findings of the present study were that the tumoral tissue presented higher CCL5 concentration than the normal adjacent tissue, and that it was also a significant difference between the protein concentration in tumor tissue from stage III in relation to stage I. It was also observed a high CCL5 concentration in relation to lymph node involvement.

Studies have emphasized the possible involvement of chemokines and their receptors in BC progression (Lee, Fertig et al. 2014, Gao, Rahbar et al. 2016). They have been shown to affect many cellular functions, including survival, adhesion, invasion and proliferation. Inside this context, it was investigated the CCL5 protein level on tumor microenvironment and its relation to *CCR5-delta32* polymorphism, also taking into account the prognostic parameters of BC patients.

Velasco-Velazquez, Jiao et al. (2012) showed that about 7% of MDA-MB-231 cells expressed high levels of CCR5 and that these cells were more invasive than cells expressing low levels of CCR5. Norton, Popel et al. (2015) established that among the triple-negative BC cells it is possible to observe two distinct populations of cells expressing different numbers of cell-surface receptor. The authors also established that CCR5 is a possible candidate receptor for influencing the differences in metastatic ability of the two similar cell lines, MDA-MB-231 and MDA-MB-231-luc. Therefore, the CCR5 high cells could be the cells that are most likely to migrate and metastasize. In the present study, there was no significant difference between CCL5 levels in tumor or normal adjacent tissues in relation to *CCR5-delta32* genotypes.

CCL5 is one of the key chemotactic factors for macrophages in the tumor microenvironment (Soria and Ben-Baruch 2008, Borsig, Wolf et al. 2014). The exact functions of this cytokine in tumor biology are still unclear, but it is known that CCL5 is important to trigger and amplify the anti-tumor host response and inducing proper immune responses against tumors (Nesbeth, Scarlett et al. 2009).

It has been also reported that CCL5 is associated with cancer progression and metastasis because it promotes tumor cell survival, proliferation, and invasion (Lapteva and Huang 2010). Notably, considerable emphasis has been placed on studying metastasis as a dynamic process that is highly dependent on the tumor microenvironment and, in regard to BC, CCL5 has been established as an important contributor to metastatic disease (Khalid, Wolfram et al. 2015).

Tumor-derived CCL5 is detected in many clinical specimens of BC and is greater in plasma levels of patients with progressive and more advanced disease, than those in remission (Niwa, Akamatsu et al. 2001, Azenshtein, Luboshits et al. 2002, Nouh MA 2005). It also constitutes a prominent part of a poor prognosis signature of inflammatory disease (Wigler, Shina et al. 2002, Bieche, Lerebours et al. 2004). It has been described that circulating CCL5 levels tended to be higher in BC patients with larger tumor sizes, lymphovascular invasion, multifocal tumors and with positive lymph-node status (Smeets, Brouwers et al. 2013).

In the present study, we found that the tumor presented higher CCL5 concentration than normal adjacent tissue. It was also a significant difference between the protein concentrations in tumor tissue from stage III in relation to stage I, which can indicate CCL5 level as a poor prognostic factor, also related to more advanced disease.

Clinicopathological parameters have been validated and serve as a guide for the use of systemic therapy and prognostication. These include age, tumor size, histological grade, vascular invasion, histological type and lymph node stage (Lacroix 2006). The status of the axillary lymph nodes is one of the most important prognostic factors in women with BC. Histological examination of lymph nodes is the most accurate method for assessing spread of disease to these nodes (Mabry and Giuliano 2007). Regarding prognostic parameters and CCL5 protein level, it was verified a significant high level of CCL5 in relation to lymph nodes commitment, which may indicate this cytokine as a prognosis marker in breast pathogenesis. This fact also can indicate CCL5 level as a poor prognostic factor.

Some limitations deserve be discerned, such as the low number of patients in group IV and the sensibility of immunohistochemistry and ELISA. This result should be interpreted with caution, since according to Smeets, Brouwers et al. 2013, circulating CCL5 concentration to known clinicopathological predictors for node involvement did not allow more precise prediction of the lymph node status.

In summary, the present findings contribute to the evidence of CCL5 involvement in BC microenvironment, in which it could affect tumor progression, especially in the context of metastatic process. The data for staging and lymph node involvement may suggest that CCL5 could be a poor prognostic marker in BC. Overall, these results should also take into account the molecular subtypes of BC.

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible and the Cancer Hospital of Londrina, Londrina, PR, Brazil. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), and Universidade Estadual de Londrina (PROPPG-UEL).

## References

- Aoki, M. N., A. C. da Silva do Amaral Herrera, M. K. Amarante, J. L. do Val Carneiro, M. H. Fungaro and M. A. Watanabe (2009). "CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development." *Int J Mol Med***23**(3): 429-435.
- Azenshtein, E., G. Luboshits, S. Shina, E. Neumark, D. Shahbazian, M. Weil, N. Wigler, I. Keydar and A. Ben-Baruch (2002). "The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity." *Cancer Res***62**(4): 1093-1102.
- Barmania, F., M. Potgieter and M. S. Pepper (2013). "Mutations in C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) in South African individuals." *Int J Infect Dis***17**(12): e1148-1153.
- Bieche, I., F. Lerebours, S. Tozlu, M. Espie, M. Marty and R. Lidereau (2004). "Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature." *Clin Cancer Res***10**(20): 6789-6795.
- Borsig, L., M. J. Wolf, M. Roblek, A. Lorentzen and M. Heikenwalder (2014). "Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory." *Oncogene***33**(25): 3217-3224.
- Gao, D., R. Rahbar and E. N. Fish (2016). "CCL5 activation of CCR5 regulates cell metabolism to enhance proliferation of breast cancer cells." *Open Biol***6**(6).
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell***144**(5): 646-674.
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo and R. A. Weinberg (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." *Nature***449**(7162): 557-563.
- Khalid, A., J. Wolfram, I. Ferrari, C. Mu, J. Mai, Z. Yang, Y. Zhao, M. Ferrari, X. Ma and H. Shen (2015). "Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer." *Mini Rev Med Chem***15**(13): 1063-1072.

- Kirby, L. T. (1993). DNA Fingerprinting: An Introduction. New York, Oxford University Press.
- Lacroix, M. (2006). "Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells." Endocr Relat Cancer**13**(4): 1033-1067.
- Lapteva, N. and X. F. Huang (2010). "CCL5 as an adjuvant for cancer immunotherapy." Expert Opin Biol Ther**10**(5): 725-733.
- Lee, E., E. J. Fertig, K. Jin, S. Sukumar, N. B. Pandey and A. S. Popel (2014). "Breast cancer cells condition lymphatic endothelial cells within pre-metastatic niches to promote metastasis." Nat Commun**5**: 4715.
- Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup and N. R. Landau (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell**86**(3): 367-377.
- Mabry, H. and A. E. Giuliano (2007). "Sentinel node mapping for breast cancer: progress to date and prospects for the future." Surg Oncol Clin N Am**16**(1): 55-70.
- Manes, S., E. Mira, R. Colomer, S. Montero, L. M. Real, C. Gomez-Mouton, S. Jimenez-Baranda, A. Garzon, R. A. Lacalle, K. Harshman, A. Ruiz and A. C. Martinez (2003). "CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner." J Exp Med**198**(9): 1381-1389.
- Nesbeth, Y., U. Scarlett, J. Cubillos-Ruiz, D. Martinez, X. Engle, M. J. Turk and J. R. Conejo-Garcia (2009). "CCL5-mediated endogenous antitumor immunity elicited by adoptively transferred lymphocytes and dendritic cell depletion." Cancer Res**69**(15): 6331-6338.
- Niwa, Y., H. Akamatsu, H. Niwa, H. Sumi, Y. Ozaki and A. Abe (2001). "Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer." Clin Cancer Res**7**(2): 285-289.
- Norton, K. A., A. S. Popel and N. B. Pandey (2015). "Heterogeneity of chemokine cell-surface receptor expression in triple-negative breast cancer." Am J Cancer Res**5**(4): 1295-1307.
- Nouh MA, E. S., Zaki SA, El-Maghraby SM, Kadry DY (2005). "Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression." J Egypt Natl Canc Inst**17**: 51-55.
- Pena, S. D., L. Bastos-Rodrigues, J. R. Pimenta and S. P. Bydlowski (2009). "DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians." Braz J Med Biol Res**42**(10): 870-876.
- Pimenta, J. R., L. W. Zuccherato, A. A. Debes, L. Maselli, R. P. Soares, R. S. Moura-Neto, J. Rocha, S. P. Bydlowski and S. D. Pena (2006). "Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites." Hum Hered**62**(4): 190-195.
- Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muylldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart

- and M. Parmentier (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature**382**(6593): 722-725.
- Smeets, A., B. Brouwers, S. Hatse, A. Laenen, R. Paridaens, G. Floris, H. Wildiers and M.-R. Christiaens (2013). "Circulating CCL5 Levels in Patients with Breast Cancer: Is There a Correlation with Lymph Node Metastasis?" ISRN Immunology: 1-5.
- Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2009). TNM classification of malignant tumours. Oxford.
- Soria, G. and A. Ben-Baruch (2008). "The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer." Cancer Lett**267**(2): 271-285.
- Span, P. N., G. Pollakis, W. A. Paxton, F. C. Sweep, J. A. Foekens, J. W. Martens, A. M. Sieuwerts and H. W. van Laarhoven (2015). "Improved metastasis-free survival in nonadjuvantly treated postmenopausal breast cancer patients with chemokine receptor 5 del32 frameshift mutations." Int J Cancer**136**(1): 91-97.
- Swamydas, M., K. Ricci, S. L. Rego and D. Dreau (2013). "Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases." Cell Adh Migr**7**(3): 315-324.
- Szpakowska, M., V. Fievez, K. Arumugan, N. van Nuland, J. C. Schmit and A. Chevigne (2012). "Function, diversity and therapeutic potential of the N-terminal domain of human chemokine receptors." Biochem Pharmacol**84**(10): 1366-1380.
- Ugurel, S., D. Schrama, G. Keller, D. Schadendorf, E. B. Brocker, R. Houben, M. Zapatka, W. Fink, H. L. Kaufman and J. C. Becker (2008). "Impact of the CCR5 gene polymorphism on the survival of metastatic melanoma patients receiving immunotherapy." Cancer Immunol Immunother**57**(5): 685-691.
- Velasco-Velazquez, M., X. Jiao, M. De La Fuente, T. G. Pestell, A. Ertel, M. P. Lisanti and R. G. Pestell (2012). "CCR5 antagonist blocks metastasis of basal breast cancer cells." Cancer Res**72**(15): 3839-3850.
- Velasco-Velazquez, M. and R. G. Pestell (2013). "The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer." Oncoimmunology**2**(4): e23660.
- Wigler, N., S. Shina, O. Kaplan, G. Luboshits, S. Chaitchik, I. Keydar and A. Ben-Baruch (2002). "Breast carcinoma: a report on the potential usage of the CC chemokine RANTES as a marker for a progressive disease." Isr Med Assoc J**4**(11 Suppl): 940-943.



## 5. CONCLUSÕES

### **Conclusões do Artigo 1:**

- Não foi observada associação significativa entre a variante genética *CCR5-delta32* e a suscetibilidade ao câncer de mama;
- As análises em relação aos parâmetros prognósticos indicaram uma correlação significativa entre *CCR5-delta32* e acometimento de linfonodos e/ou metástase à distância;
- Com relação à expressão proteica de CCL5 por imunohistoquímica, foi observada a predominância de marcação citoplasmática tanto no tecido tumoral quanto normal da mama;
- Não foram observadas correlações significativas entre a expressão proteica de CCL5 em relação aos parâmetros prognósticos e nem em relação aos genótipos de *CCR5-delta32*.

### **Conclusões do Artigo 2:**

- Com relação à expressão de CCL5 por ELISA, foi observada uma concentração maior da proteína no sobrenadante de tecido tumoral quando comparado ao sobrenadante do tecido normal adjacente;
- Quando esta expressão foi comparada nos diferentes estadiamentos tumorais, foi observada uma diferença significativa entre os estadiamentos de classe I e III;
- Quando a expressão de CCL5 foi averiguada em relação aos parâmetros prognósticos, foi observada uma maior concentração da proteína em relação ao comprometimento linfonodal.
- Não foram observadas correlações significativas entre a expressão proteica de CCL5 em tecido normal e tumoral em relação aos diferentes genótipos de *CCR5-delta32*.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A presença de CCL5 em níveis elevados no tecido tumoral e sua forte associação com metástases linfonodais constituem evidências de seu papel na patogênese do câncer de mama. Assim, o receptor CCR5 e a quimiocina CCL5 podem influenciar no desenvolvimento tumoral e na progressão da doença, mas essa influência ainda não está elucidada.

A compreensão do papel do eixo CCL5/CCR5 no microambiente tumoral pode definir estas moléculas como marcadores para prognóstico e até mesmo tratamento do câncer de mama, o que requer estudos adicionais para sua validação.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Althuis, M. D. et al. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 10, p. 1558-68, Oct 2004.
- Anders, C. K. et al. Breast cancer before age 40 years. **Semin Oncol**, v. 36, n. 3, p. 237-49, Jun 2009.
- Anderson, W. F. et al. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **Breast Cancer Res Treat**, v. 76, n. 1, p. 27-36, Nov 2002.
- Aoki, M. N. et al. Caveolin involvement and modulation in breast cancer. **Mini Rev Med Chem**, v. 11, n. 13, p. 1143-52, Nov 2011.
- Aoki, M. N. et al. CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development. **Int J Mol Med**, v. 23, n. 3, p. 429-35, Mar 2009.
- Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565-8, Apr 09 1998.
- \_\_\_\_\_. Chemokines in pathology and medicine. **J Intern Med**, v. 250, n. 2, p. 91-104, Aug 2001.
- Baggiolini, M.; Dewald, B.; Moser, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. **Adv Immunol**, v. 55, p. 97-179, 1994.
- \_\_\_\_\_. Human chemokines: an update. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 675-705, 1997..
- Ben-Baruch, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Semin Cancer Biol**, v. 16, n. 1, p. 38-52, Feb 2006.
- Bieche, I. et al. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 20, p. 6789-95, Oct 15 2004.
- Bokoch, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1649-60, Sep 1 1995.
- Boyle, F.; Forbes, J. Breast cancer survivors. **Aust Fam Physician**, v. 37, n. 10, p. 791, Oct 2008.
- Brajao De Oliveira, K. et al. Analysis of the CC chemokine receptor 5 delta32 polymorphism in a Brazilian population with cutaneous leishmaniasis. **J Cutan Pathol**, v. 34, n. 1, p. 27-32, Jan 2007.
- Carotenuto, P. et al. Triple negative breast cancer: from molecular portrait to therapeutic intervention. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 20, n. 1, p. 17-34, 2010.

Chang, H. Y. et al. [Association between CCR5 promoter polymorphisms and hepatitis B virus infection]. **Korean J Hepatol**, v. 11, n. 2, p. 116-24, Jun 2005.

Chensue, S. W. et al. Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice. **J Exp Med**, v. 193, n. 5, p. 573-84, Mar 5 2001.

Chies, J. a. B.; Hutz, M. H. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 71-75, 2003.

Choy, J. O.; Giuliano, A. E. **Câncer de Mama**. 15. Rio de Janeiro: 2014. 40.

Chuang, J. Y. et al. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells. **J Cell Physiol**, v. 220, n. 2, p. 418-26, Aug 2009.

Cocchi, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. **Science**, v. 270, n. 5243, p. 1811-5, Dec 15 1995.

Daniel, C. W.; Silberstein, G. B.; Strickland, P. Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography. **Cancer Res**, v. 47, n. 22, p. 6052-7, Nov 15 1987.

Dawson, S. J.; Provenzano, E.; Caldas, C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. **Eur J Cancer**, v. 45 Suppl 1, p. 27-40, Sep 2009.

De Ugarte, D. A. et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**, v. 174, n. 3, p. 101-9, 2003.

Dean, M. et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. **Science**, v. 273, n. 5283, p. 1856-62, Sep 27 1996.

Do Val Carneiro, J. L. et al. Plasma malondialdehyde levels and CXCR4 expression in peripheral blood cells of breast cancer patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 135, n. 8, p. 997-1004, Aug 2009.

Donlon, T. A. et al. Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. **Genomics**, v. 6, n. 3, p. 548-53, Mar 1990.

Espinoza-Sanchez, N. A. et al. IL-1beta, IL-8, and Matrix Metalloproteinases-1, -2, and -10 Are Enriched upon Monocyte-Breast Cancer Cell Cocultivation in a Matrigel-Based Three-Dimensional System. **Front Immunol**, v. 8, p. 205, 2017.

Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 01 2015.

- Fontenoy, A. M. et al. Recent trends in breast cancer incidence rates in the Loire-Atlantique, France: a decline since 2003. **Cancer Epidemiol**, v. 34, n. 3, p. 238-43, Jun 2010.
- Fredholm, H. et al. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7695, Nov 11 2009.
- Fridman, W. H. et al. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 344, p. 1-24, 2011.
- Genomics.Org, M. **A comprehensive atlas of breast cancer genomes**. 2012.
- Goldhirsch, A. et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, v. 22, n. 8, p. 1736-47, Aug 2011.
- Golubicic, I.; Borojevic, N.; Pavlovic, T. Risk factors for breast cancer: is ionizing radiation among them? **J BUON**, v. 13, n. 4, p. 487-94, Oct-Dec 2008.
- Gupta, G. P.; Massague, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-95, Nov 17 2006.
- Harvey, J. M. et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 5, p. 1474-81, May 1999.
- Haslam, S. Z. The ontogeny of mouse mammary gland responsiveness to ovarian steroid hormones. **Endocrinology**, v. 125, n. 5, p. 2766-72, Nov 1989.
- Haslam, S. Z.; Shyamala, G. Relative distribution of estrogen and progesterone receptors among the epithelial, adipose, and connective tissue components of the normal mammary gland. **Endocrinology**, v. 108, n. 3, p. 825-30, Mar 1981.
- Henderson, I. C.; Patek, A. J. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 52, n. 1-3, p. 261-88, 1998.
- Iarc, I. a. F. R. O. C.-. **Monographs of Carcinogenic Risks to Humans and Handbooks of Cancer Prevention**. . 2015.
- Iarc, I. a. F. R. O. C.-. **List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans**. 2016.
- Inca, I. N. D. C. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: 2016.
- Inca, I. N. D. C. B.-. **Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015.
- Inumaru, L. E.; Silveira, E. A.; Naves, M. M. V. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública - Rio de Janeiro**, v. 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011.

John Sax, M. et al. Cancer cell CCL5 mediates bone marrow independent angiogenesis in breast cancer. **Oncotarget**, 2016.

Johnson, R. H.; Chien, F. L.; Bleyer, A. Incidence of Breast Cancer With Distant Involvement Among Women in the United States, 1976 to 2009. **Jama**, v. 309, n. 8, p. 800, 2013.

Kaimen-Maciel, D. R. et al. CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. **Int J Mol Med**, v. 20, n. 3, p. 337-44, Sep 2007.

Karnoub, A. E.; Weinberg, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. **Breast Dis**, v. 26, p. 75-85, 2006.

Kershaw, M. H.; Westwood, J. A.; Darcy, P. K. Gene-engineered T cells for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 8, p. 525-541, 2013.

Kruger, B. et al. RANTES/CCL5 polymorphisms as a risk factor for recurrent acute rejection. **Clin Transplant**, v. 21, n. 3, p. 385-90, May-Jun 2007.

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

Laudanna, C.; Campbell, J. J.; Butcher, E. C. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. **Science**, v. 271, n. 5251, p. 981-3, Feb 16 1996.

Leboute, A. P.; De Carvalho, M. W.; Simoes, A. L. Absence of the deltacr5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. **Hum Genet**, v. 105, n. 5, p. 442-3, Nov 1999.

Libert, F. et al. The deltacr5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. **Hum Mol Genet**, v. 7, n. 3, p. 399-406, Mar 1998.

Lin, S. et al. Chemokine C-C motif receptor 5 and C-C motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia. **Cancer Sci**, v. 103, n. 5, p. 904-12, May 2012.

Lindley, I. J. D. W., J.; Kunkel, S.L. . Nomenclature announcement - the chemokines. **Immunol Today** 14:24, 1993.

Liu, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367-77, Aug 09 1996.

Loetscher, P. et al. N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1 with CXC chemokine receptor 4 agonist and antagonist activities. **J Biol Chem**, v. 273, n. 35, p. 22279-83, Aug 28 1998.

Loetscher, P. et al. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. **J Exp Med**, v. 184, n. 2, p. 569-77, Aug 1 1996.

Loetscher, P. et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 344-5, Jan 22 1998.

Luboshits, G. et al. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. **Cancer Res**, v. 59, n. 18, p. 4681-7, Sep 15 1999.

Luster, A. D. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436-445, 1998.

Maegawa, R. O.; Tang, S. C. Triple-negative breast cancer: unique biology and its management. **Cancer Invest**, v. 28, n. 8, p. 878-83, Oct 2010.

Maghazachi, A. A.; Al-Aoukaty, A.; Schall, T. J. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 2, p. 315-9, Feb 1996.

Makishima, H. et al. Chemokine system and tissue infiltration in aggressive NK-cell leukemia. **Leuk Res**, v. 31, n. 9, p. 1237-45, Sep 2007.

Manes, S. et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. **J Exp Med**, v. 198, n. 9, p. 1381-9, Nov 3 2003.

Manjer, J. et al. Smoking associated with hormone receptor negative breast cancer. **Int J Cancer**, v. 91, n. 4, p. 580-4, Feb 15 2001.

Martinson, J. J. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet**, v. 16, n. 1, p. 100-3, May 1997.

McNicholl, J. M. et al. Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 261-71, Jul-Sep 1997.

Menu, E. et al. Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: a study in the 5TMM model. **Clin Exp Metastasis**, v. 23, n. 5-6, p. 291-300, 2006.

Niwa, Y. et al. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 2, p. 285-9, Feb 2001.

O'brien, S. J.; Moore, J. P. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. **Immunol Rev**, v. 177, n. 1, p. 99-111, 2000.

Panzer, U. et al. The chemokine receptor 5 [Delta]32 mutation is associated with increased renal survival in patients with IgA nephropathy. **Kidney Int**, v. 67, n. 1, p. 75-81, 2005.

Pelus, L. M. et al. Peripheral blood stem cell mobilization. A role for CXC chemokines. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 43, n. 3, p. 257-75, Sep 2002.

Piccart-Gebhart, M. J. New developments in hormone receptor-positive disease. **Oncologist**, v. 16 Suppl 1, p. 40-50, 2011.

Pinheiro, A. B. et al. **Câncer de Mama em Mulheres Jovens: Análise de 12.689 Casos.** Rio de Janeiro: Revista Brasileira de Cancerologia, 2013. 351-359.

Pittenger, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 02 1999.

Pollan, M. et al. Recent changes in breast cancer incidence in Spain, 1980-2004. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 22, p. 1584-91, Nov 18 2009.

Premack, B. A.; Schall, T. J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. **Nat Med**, v. 2, n. 11, p. 1174-8, Nov 1996.

Reiche, E. M. et al. Frequency of CCR5-Delta32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population. **Int J Mol Med**, v. 22, n. 5, p. 669-75, Nov 2008.

Robinson, S. C. et al. A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. **Cancer Res**, v. 63, n. 23, p. 8360-5, Dec 01 2003.

Samson, M. et al. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. **Genomics**, v. 36, n. 3, p. 522-6, Sep 15 1996.

Sarafi, M. N. et al. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **J Exp Med**, v. 185, n. 1, p. 99-109, Jan 6 1997.

Schauren, J. S. et al. CCR5delta32 in systemic lupus erythematosus: implications for disease susceptibility and outcome in a Brazilian population. **Lupus**, v. 22, n. 8, p. 802-9, Jul 2013.

Sidoti, A. et al. Distribution of the mutated delta 32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. **Int J Immunogenet**, v. 32, n. 3, p. 193-8, Jun 2005.

Smeets, A. et al. Circulating CCL5 Levels in Patients with Breast Cancer: Is There a Correlation with Lymph Node Metastasis? **ISRN Immunology**, p. 1-5, 2013.

Smith, M. W. et al. CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. **Lancet**, v. 350, n. 9079, p. 741; author reply 742, Sep 6 1997.

Sobin, L. H.; Gospodarowicz, M. K.; Wittekind, C. **TNM classification of malignant tumours**. 7 th. Oxford: 2009. ISBN ISBN: 978-1-4443-3241-4

Song, A. et al. RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 93-103, Jan 1999.

Stephens, J. C. et al. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. **Am J Hum Genet**, v. 62, n. 6, p. 1507-15, Jun 1998.



Stival, R. S. M.; Prestes, A. L. D. O.; Mansani, F. P. Câncer de mama em mulheres jovens: uma análise do estadiamento clínico inicial e dos subtipos moleculares dos tumores. **Rev Bras Mastologia - Ponta Grossa**, v. 24, n. 1, p. 17-22, 2014.

Swamydas, M. et al. Mesenchymal stem cell-derived CCL-9 and CCL-5 promote mammary tumor cell invasion and the activation of matrix metalloproteinases. **Cell Adh Migr**, v. 7, n. 3, p. 315-24, May-Jun 2013.

Tang, X. Y. et al. Overexpression of fatty acid binding protein-7 correlates with basal-like subtype of breast cancer. **Pathol Res Pract**, v. 206, n. 2, p. 98-101, Feb 15 2010.

Trichopoulos, D. et al. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int J Cancer**, v. 122, n. 3, p. 481-5, Feb 01 2008.

Ungvari, I. et al. CCR5 Delta 32 mutation, Mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 119, n. 6, p. 1545-7, Jun 2007.

Vaday, G. G. et al. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. **Prostate**, v. 66, n. 2, p. 124-34, Feb 01 2006.

Van Deventer, H. W. et al. C-C chemokine receptor 5 on stromal cells promotes pulmonary metastasis. **Cancer Res**, v. 65, n. 8, p. 3374-9, Apr 15 2005.

Vargas, A. E. et al. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 3, p. 321-5, Mar 2006.

Vargo-Gogola, T.; Rosen, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659-72, Sep 2007.

Wang, F. S. et al. Population survey of CCR5 delta32, CCR5 m303, CCR2b 64I, and SDF1 3'A allele frequencies in indigenous Chinese healthy individuals, and in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals in HIV-1 risk groups. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 32, n. 2, p. 124-30, Feb 01 2003.

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

Wigler, N. et al. Breast carcinoma: a report on the potential usage of the CC chemokine RANTES as a marker for a progressive disease. **Isr Med Assoc J**, v. 4, n. 11 Suppl, p. 940-3, Nov 2002.

Wittekind, C. et al. TNM residual tumor classification revisited. **Cancer**, v. 94, n. 9, p. 2511-6, May 1 2002.

Wittliff, J. L. Steroid-hormone receptors in breast cancer. **Cancer**, v. 53, n. 3 Suppl, p. 630-43, Feb 1 1984.

Yaal-Hahoshen, N. et al. The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 15, p. 4474-80, Aug 01 2006.

Yamaguchi, J. et al. Prognostic impact of marginal adipose tissue invasion in ductal carcinoma of the breast. **Am J Clin Pathol**, v. 130, n. 3, p. 382-8, Sep 2008.

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

Yasui, Y.; Potter, J. D. The shape of age-incidence curves of female breast cancer by hormone-receptor status. **Cancer Causes Control**, v. 10, n. 5, p. 431-7, Oct 1999.

Yoo, K. et al. Postmenopausal obesity as a breast cancer risk factor according to estrogen and progesterone receptor status (Japan). **Cancer Lett**, v. 167, n. 1, p. 57-63, Jun 10 2001.

Zlotnik, A. Chemokines and cancer. **Int J Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2026-9, Nov 1 2006.

Zuniga, J. A. et al. Biological relevance of the polymorphism in the CCR5 gene in refractory and non-refractory rheumatoid arthritis in Mexicans. **Clin Exp Rheumatol**, v. 21, n. 3, p. 351-4, May-Jun 2003.

**ANEXOS**

## ANEXO A

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



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
Universidade Estadual de Londrina  
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	189/2013
CAAE:	17123113 4 0000 5231
Data da Relatoria:	30/09/2013
Pesquisador(a):	Mana Angelica Ehara Watanabe
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental
<p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p><b>"Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer."</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>Aprovado</b></p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Londrina, 30 de setembro de 2013.</p> <p></p> <p><b>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli</b> Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p>	



## ANEXO B

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

## Termo De Consentimento Livre E Esclarecido

**Informações sobre a pesquisa:**

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinadas moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

**Procedimentos do Estudo:**

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico. Em caso de tecido mamário tumoral, o tecido retirado durante a cirurgia será encaminhado para análise e o restante será utilizado para a realização deste projeto.

**Confidencialidade da Pesquisa**

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A amostra de sangue e tecido obtidos, serão utilizados para obtenção de DNA, RNA e plasma para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

**Consentimento livre esclarecido e informado:**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecida pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente desse estudo sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, 20 \_\_\_\_.

Assinatura do doador (ou responsável): \_\_\_\_\_

## ANEXO C

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Informações sobre a pesquisa:**

Você está sendo convidada a participar, como voluntária saudável, da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinadas moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

**Procedimentos do Estudo:**

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

**Confidencialidade da Pesquisa**

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. A amostra de sangue e tecido obtidos, serão utilizados para obtenção de DNA, RNA e plasma para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

**Consentimento livre esclarecido e informado:**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecida pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente como doadora saudável desse estudo sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a execução deste projeto.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, 20 \_\_\_\_.

Assinatura do doador (ou responsável): \_\_\_\_\_