

AMAMENTAÇÃO, NÍVEIS DE CITOCINAS E IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS T REG NO CÂNCER DE MAMA

ADENILDA CRISTINA HONÓRIO FRANÇA¹

CLAUDIA PEREIRA SOARES SANCHEZ LACERDA²

WENDELL SANCHEZ LACERDA³

RESUMO: O câncer é um problema de saúde pública, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos de câncer estimados para 2025. Evidências epidemiológicas sugerem que a amamentação reduz o risco de câncer de mama em virtude da diferenciação do tecido mamário, redução no tempo de vida número de ciclos ovulatórios e de componentes imunológicos presentes na secreção entre estas células e citocinas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis séricos de citocinas (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70) e a fenotipagem de células T regulatórias presentes no sangue de mulheres com câncer de mama e correlacionar com o tempo de amamentação. Foram coletadas amostras de sangue periférico de mulheres sem evidências de câncer de mama (Grupo controle; n = 8) e de mulheres com diagnóstico confirmado para o câncer de mama (Grupo estudo; n = 12). A participantes responderam um questionário semi-estruturado para avaliar as aspectos relacionados a amamentação. As citocinas e fenotipagem foram avaliadas por citometria de fluxo. Observou-se que o tempo de amamentação foi maior no grupo controle quando comparado ao grupo de experimental. Houve aumento da concentração de IL-6, IL-8 e TNF- α . Ressalva-se que houve correlação entre o tempo de amamentação com os níveis da IL-8 no grupo de estudo. Independente do tumor de mama a porcentagem de células T regulatórias foram similares entre os grupos. Os dados sugerem que o câncer de mama condiciona um perfil de citocinas inflamatórias no sangue, e que o aumento do tempo de amamentação possa exercer efeito protetor contra o câncer de mama.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama, Citocinas, Quimiocinas, Tempo de amamentação, Células Treg.

ABSTRACT: The cancer is a public health problem, in the coming decades, the impact of cancer in the population corresponding to 80% of the more than 20 million new cases of cancer estimated for 2025. Epidemiological evidence suggests that breastfeeding reduces the risk of breast cancer due to the differentiation of breast tissue, reduction in the lifetime number of ovulatory cycles and of immune components present in secretions between these cells and cytokines. Thus, the objective of this work was to evaluate serum levels of cytokines (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α and IL-12p70) and phenotyping of regulatory T cells present in the blood of women with breast cancer and correlate with the breastfeeding time. Peripheral blood samples were collected from women without evidence of breast cancer (control group, n = 8) and of women with confirmed diagnosis for breast cancer (student group, n = 12). The participants answered a semi-structured questionnaire to assess the aspects related to breastfeeding. The Cytokines and phenotyping were evaluated by flow cytometry. Observed-time of breastfeeding was higher in the control group when compared to the experimental group. There was increased concentration of IL-6, IL-8 and TNF- α . Caveat that there was correlation between the time of breastfeeding with the levels of IL-8 in the study group. Independent of the breast tumor percentage of regulatory T-cells were similar between the groups. The data suggest that breast cancer makes a profile of inflammatory cytokines in the blood, and that the increase in the time of breast-feeding to exercise protective effect against breast cancer.

KEYWORDS: breast cancer, cytokines, Chemokines, breastfeeding time, Treg Cells.

¹ Pós-doutora pela Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Professora Titular e Orientadora do programa de pós-graduação em Ciências de Materiais, e vice coordenadora do programa de pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas da Universidade Federal de Mato Grosso. Orientadora do Programa de Pós-Graduação de Imunologia e Parasitologia (PGPI) da UFMT – CUA – Barra do Garças/MT – Brasil. Contato: adenida@ufmt.br.

² Docente Nutricionista do Centro Universitário do Vale do Araguaia – UNIVAR, Barra do Garças/MT - Brasil. Mestre em Imunologia e Parasitologia pela UFMT/CUA. Contato: claudiaslacerda@hotmail.com.

³ Docente Médico Especialista em Clínica Médica do Centro Universitário do Vale do Araguaia – UNIVAR, Barra do Garças/MT. Mestre em Imunologia e Parasitologia pela UFMT/CUA. Contato: wendelllacerda@uol.com.br

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de novos casos de câncer estimados para 2025 (BRASIL, 2014).

Sua capacidade de evasão do sistema imunológico faz com que seja o segundo tipo de neoplasia responsável pelo maior número de óbitos entre as mulheres de 40 a 69 anos de idade. Em pacientes abaixo dos 35 anos de idade, a doença é incomum, apenas 4% de todos os casos diagnosticados de câncer de mama ocorrem nessa faixa etária (WOLFF et al. 2013, CORTAZAR et al. 2014).

Anualmente, há cerca de 20% a 29% dos casos novos de câncer em mulheres no mundo, destes 57.120 casos foram registrados no Brasil (SIEGEL, R., D. NAISHADHAM, e A. JEMAL, 2012; Brasil, 2014).

Os fatores de risco mais importantes estão relacionados a eventos hormonais e reprodutivos, bem como a presença de câncer de mama em parente de primeiro grau, características ou comportamentos que resultam em exposição prolongada a estrógenos, tais como menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, terapia de reposição hormonal e menopausa tardia (BRASIL, 2013).

O avanço no diagnóstico da doença apresenta dificuldades uma vez que necessita de tecnologias avançadas de aplicação molecular e microscópicas para as fases pré-invasivas de tumores de mama (BOMBONATI, 2010).

Quando diagnosticado e tratado adequadamente, levam a um bom prognóstico, porém as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil. Provavelmente devido ao diagnóstico tardio em estágios avançados da doença (BRASIL, 2013). Em países desenvolvidos, como na Europa, a sobrevida média após cinco anos de diagnóstico e tratamento é de 85%, enquanto em países em desenvolvimento que é o caso do Brasil, está em torno de 60% (BRASIL, 2013).

A alta prevalência do câncer de mama é um fator importante que instiga a busca de novos biomarcadores para um melhor rastreamento, diagnóstico e posterior prognóstico da doença. Proteínas séricas ou plasmáticas são utilizadas frequentemente no rastreamento de algumas neoplasias, como no câncer de próstata e ovário e algumas biomoléculas séricas estão sendo estudadas quanto à sua eficácia na detecção do câncer de mama (JESNECK, J.L., et al., 2009).

O prognóstico do câncer de mama depende do estadiamento da doença, assim como das características do tumor. Quando diagnosticada no início, o tratamento tem maior potencial curativo, no entanto, quando há evidências de metástases; o tratamento tem por

objetivos prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida do paciente.

De acordo com o sistema de classificação do Tumor Nódulo e Metástase (TNM) da AMERICAN JOIN COMMITTEE ON CANCER (2002), estadiamento é a nomenclatura utilizada para se falar sobre o grau de comprometimento tumoral referente ao órgão específico (T), ao espalhamento para os gânglios; nódulo (N) e a presença de metástases (M) sistêmicas para ossos, fígado, pulmão e dos demais órgãos constituindo o sistema TNM de estadiamento do câncer.

O tratamento do câncer de mama, conforme prevê a Política Nacional de Prevenção e Controle do Câncer, deve ser feito por meio das Unidades de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia e dos Centros de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia, que fazem parte de hospitais de nível terciário. Este nível de atenção deve estar capacitado para realizar o diagnóstico diferencial e definitivo do câncer determinar sua extensão que chamamos de estadiamento, tratar por meio de cirurgia, radioterapia, oncologia clínica e cuidados paliativos, acompanhar e assegurar a qualidade da assistência oncológica (MORAN, et al, 2014).

Para o desenvolvimento de um tumor são necessárias as mutações e as células do sistema imunológico inato e adaptativo para aquisição de características teciduais malignas. Células do sistema imunológico afetam células malignas

por meio de produção de citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas e nitrogênio (VAN, COUSSENS, 2006 e DENARDO, COUSSENS, 2007).

As células imunológicas ativadas, incluindo linfócitos T e B, amplificam a resposta inflamatória. Assim, as células T auxiliares de tipo 1 (células Th1) ativam macrófagos por meio do contato de célula-célula e secreção de IFN- γ (BADUAL et al., 2008), as células Th2 ativam eosinófilos através da liberação de citocinas e as células B secretam anticorpos que ativam a cascata do sistema complemento, bem como os fagócitos, as células NK e os mastócitos através de receptores Fc (BADUAL, 2007; CARRERAS et al, 2006; WHITESIDE, 2012).

Entretanto, certas células imunológicas adaptativas, Tregs, podem suprimir a resposta inflamatória (YAMAGUCHINT; WINH; SAKAGUCHI, 2011).

As citocinas quimiotáticas possui elevado grau de especificidade para quimiotaxia de populações específicas de leucócitos, recrutam células efetoras e atuam nos estágios da inflamação. Determinadas quimiocinas denominadas interleucinas, podem ser produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios e recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação; outras são produzidas normalmente em diversos tecidos e recrutam leucócitos na ausência de inflamação. O perfil das citocinas/quimiocinas que persistem no sítio inflamatório é

fundamental para o desenvolvimento de doenças crônicas (VICARI; CAUX, 2002).

Como o câncer de mama é considerado fracamente imunogênico e pouco reconhecido pelo sistema imunológico acredita-se que a resposta imunológica a esse tipo de tumor está associada à ação de citocinas moduladoras presentes no microambiente tumoral (ALLAN, 2004; RAO et al., 2006).

Em pacientes com câncer de mama, a expressão de níveis séricos de várias citocinas parece estar associada a um subgrupo de alto risco de pacientes com menores taxas de sobrevida em comparação com os pacientes que apresentam baixos níveis de citocinas, podendo então ser utilizadas como biomarcadores de fator prognóstico da doença (TRIPSIANIS et al., 2013 e LYON, et al., 2008).

A IL-6 tem sido alvo de atenção especial devido ao seu papel central nos processos fisiopatológicos (TANIGUCHI; KARIN, 2014). A IL-6 são compostos de IL-11, IL-27, IL-31, fator inibitório de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), fator neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1) e citocinas do tipo cardiotrofina, que afetam a proliferação celular, a sobrevivência, a diferenciação, a migração, a invasão, a metástase, a angiogênese, a inflamação e o metabolismo (TANIGUCHI; KARIN, 2014).

Os níveis séricos de IL-8 são elevados em mulheres com câncer de mama iniciais ou avançados. Estudos relatam correlação direta

com o estágio clínico do câncer de mama (BENOY, 2004). O envolvimento da IL-8 no desenvolvimento do câncer mama constitui uma associação com a progressão e recorrência da doença (SNOUSSI et al., 2006).

A IL-10 também pode exercer duplo efeito proliferativo e inibitório sobre as células tumorais de mama indicando a complexidade da IL-10 no início e na progressão do câncer da mama (HAMIDULLAH et al., 2012).

Níveis de IL-10 em amostras de sangue de pacientes com câncer da mama foram alternados em maiores ou menores do que os controles e correlacionado diretamente com o estágio clínico da doença (KOZLOWSKI, 2003).

Células Treg medeiam a supressão quando células imunológicas ativadas por agentes endógenos ou exógenos ameaçam destruir tecidos ou quando um tumor progressivo recruta ativamente e programa Treg para uma baixa regulação antitumoral as respostas imunológicas (YAMAGUCHI, 2011; WHITESIDE, 2008).

O potencial da utilização de Treg tanto para proteção contra danos nos tecidos por células T ativadas quanto por agressão contra células imunitárias efetoras antitumorais levou a uma consideração mais extensa dos mecanismos subjacentes ao recrutamento de Treg para locais de tecido expressam receptores tipo Toll (TLRs) e que ligando-os ao de TLR podem regular as funções de Treg, incluindo a sua migração para

os locais tumorais que é regulado por citocinas produzidas no microambiente tumoral (TME) ativando vários receptores de citocinas, que podem mediar o tráfego de Treg para os sítios teciduais (ONDONDO, 2013).

Em via contrária, parece igualmente provável que em tumores com extensos infiltrados inflamatórios, como no caso do câncer da mama, as Treg são necessárias para o controle da inflamação crônica, prevenindo danos nos tecidos e limitando o desenvolvimento de tumores unificados com a inflamação (LADOIRE; MARTIN; GHIRINGHELLI, 2011; RECH et. al, 2010).

Em mulheres diagnosticadas com carcinomas de mama, a presença e a frequência de Treg no tumor estão associadas com melhor prognóstico. (DROESER, et. al., 2012, ONDONDO, 2013, SALAMA, et al., 2009, DUHEN. 2012). As funções supressoras elevadas mediadas por Treg na circulação periférica de pacientes com neoplasias malignas sólidas ou hematológicas. No contexto de Treg, as "funções supressoras" são geralmente definidas como inibição significativa em células responsivas a ativação, proliferação, produção de citocinas / fator solúvel ou de níveis de expressão de genes. Vários ensaios in vitro foram desenvolvidos para medir a supressão

mediada por Treg (STRAUSS, 2008, RUITENBERG, 2011, CANAVAN, 2012).

Conforme pesquisas realizadas pelo o Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, (2002) cerca de 50 mil mulheres com câncer de mama e 97 mil controles sugere que o aleitamento materno pode ser responsável por 2/3 da redução estimada no câncer de mama. A amamentação foi mais protetora quando mais prolongada: o risco relativo de ter câncer decresceu 4,3% a cada 12 meses de duração da amamentação, independentemente da origem das mulheres (países desenvolvidos versus não-desenvolvidos), idade, etnia, presença ou não de menopausa e número de filhos.

A busca por novos marcadores imunológicos como feramenta auxiliar do acompanhamento das pacientes diagnosticadas com câncer de mama, bem como verificar a correlação da amamentação com parametros imunológicos como citocinas e células Treg se constituindo na justificativa deste estudo.

Correlacionar o tempo de amamentação com níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α) bem como analisar a fenotipagem de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no sangue de mulheres diagnosticadas com câncer de mama constiu-se o objetivo deste estudo.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado em dois locais, no Campus Universitario do Araguaia da UFMT –

CUA e na Associação de Voluntários no Combate ao Câncer de Barra do Garças – MT (Barra Mamma). A seleção das mulheres do

grupo de estudo, ocorreu na sede da associação. Todos os participantes deste trabalho foram informado sobre os objetivos do estudo e as coletas somente foram realizadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram coletados, aproximadamente 20mL de sangue de cada indivíduo para a análise de citocinas e células T. As amostras foram centrifugadas a 1500rpm por 40 minutos para obter plasma. As células armazenadas e as amostras de plasma foram aliquotadas e armazenadas a -80°C para posterior dosagem das citocinas.

Todas as amostras foram encaminhadas para o laboratório de Imunologia da Relação Materno-Infantil da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) CUA para o desenvolvimento da parte experimental.

O estudo abrangeu 20 mulheres: 08 mulheres saudáveis e 12 mulheres com câncer de mama. As participantes foram separadas em dois grupos. O primeiro grupo composto por mulheres sem o diagnóstico de câncer de mama, o segundo mulheres com diagnóstico de câncer de mama.

O estudo englobou mulheres diagnosticadas por meio de exames clínicos e laboratorial de câncer de mama atestadas pelo médico. Ter idade entre 30 anos a 60. Mulheres multiparas, que fizeram uso exclusivo da amamentação nos primeiros seis meses de vida do bebê. Mulheres que concordaram por meio da

Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento, confirmando o aceite em participar do estudo. Mulheres não Indígenas.

Foram excluídas do estudo mulheres com patologias crônicas como: hipertensão arterial, diabetes, obesidade, ou que tenha feito uso crônico de antiinflamatórios não-esteróides, corticosteróides ou imunossupressores nos três meses anteriores. Mulheres que não fizeram uso da amamentação exclusiva nos primeiros seis meses de vida do bebê.

A concentração de citocinas (IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70) presentes nas amostras foram avaliadas pelo método citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA®). Os resultados foram analisados pelo software FCAP Array 3.0.

Células mononucleares periféricas foram marcadas com 20 μL de Anti-CD4 FITC (Isotiocianato de fluoresceína), Anti-CD3 PE (Ficoeritrina), Anti-CD25 FITC. Para a marcação intracelular foi utilizado 20 μL de Anti-Foxp3 PE sendo a obtenção das células e marcação realizada de acordo com as instruções do fabricante (Biosciences. San Diego, CA, USA).

As amostras foram incubadas por 30 minutos, com proteção da luz e a temperatura ambiente. As células foram lavadas e ressuspensas em tampão fosfato (PBS) acrescido de BSA (soro albumina bovino) e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados

foram analisados através do software Cells Quest.

Para a análise de imunofenotipagem e os percentuais de células CD3+, CD4+, CD25+ e Foxp3+ e a concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α utilizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Para análise de correlação entre as citocinas e o tempo de amamentação utilizou-se o teste de correlação linear de Pearson. Para todos os testes, considerou-se $p < 0,05$, como limite de significância estatística.

As coletas respeitaram os protocolos técnicos dos serviços envolvidos. As mulheres foram previamente informadas e o material somente foi coletado ou utilizado sob expresso consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE), conforme resolução No466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O projeto de pesquisa deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Araguaia, protocolo em anexo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os aspectos clínicos das mulheres avaliadas no estudo estão apresentadas na tabela 1. Verificou-se que a maioria das mulheres do grupo de estudo se encontrava na faixa etária entre 51 a 60 anos. O tempo de amamentação foi maior em mulheres do grupo controle quando

comparado ao grupo de mulheres com câncer de mama.

As características relativas ao tipo de parto, doenças crônicas, tabagismo, etilismo e paridade foram similares em ambos os grupos estudados.

Tabela 1. Características clínicas das mulheres de estudo de acordo com o diagnóstico de câncer de mama.

Variáveis	Controle (n=8) N (%)	Estudo (n=12) N (%)
Idade		
30-40	2 (25)	2 (18,2)
40-50	3 (37,5)	3 (27,3)
51-60	3 (37,5)	6 (54,6)
Tempo de amamentação (meses)*	30 \pm 5,1	23,2 \pm 2,3 \ddagger
Tipo de parto		
Vaginal	3 (37,5)	4 (36,36)
Cesariana	3 (37,5)	4 (36,36)
Ambos os partos	2 (25)	3 (27,27)
Hipertensão	0 (0,0)	0 (0,0)
Diabetes	0 (0,0)	0 (0,0)
Histórico familiar de câncer	5 (62,5)	6 (54,54)
Tabagismo	0 (0,0)	0 (0,0)
Etilismo	0 (0,0)	0 (0,0)
Problemas gestacionais	0 (0,0)	0 (0,0)
Paridade a termo	7 (87,5)	11 (100,0)
Prematuridade	1 (12,5)	0 (0,0)
Aborto	0 (0,0)	2 (18,2)

*Considerando o tempo de amamentação de todos os filhos. Os valores foram apresentados em média e erro padrão. \ddagger diferenças entre grupos.

Na tabela 2 estão apresentadas as concentrações de citocinas presentes no plasma de mulheres do grupo controle e com diagnóstico de câncer de mama. Verificou-se que as mulheres com diagnóstico de câncer de mama apresentaram níveis mais elevados da quimiocina IL-8 e das citocinas IL-6 e TNF- α quando comparadas às do grupo controle.

Tabela 2. Concentração de citocinas no sangue de mulheres com diagnóstico de câncer de mama.

Citocinas (pg/mL)	Controle (n=8)	Estudo (n=12)	p*
IL-8	3,7 \pm 0,11	13,8 \pm 5,8	0,001
IL-1 β	8,3 \pm 1,7	12,4 \pm 6,8	0,33
IL-6	2,8 \pm 0,5	7,6 \pm 6,4	0,03
IL-10	3,7 \pm 0,7	5,9 \pm 4,1	0,11
TNF- α	4,4 \pm 0,8	5,5 \pm 1,6	0,04

Os dados maternos foram apresentados em média e DP.

As citocinas mensuradas no estudo foram correlacionadas com o tempo de amamentação das mulheres do estudo. Observou-se que houve correlação entre o tempo de amamentação com os níveis da IL-8 no grupo de mulheres com cancer de mama (Figura 1), no qual um maior tempo de amamentação correlacionou-se positivamente com os níveis da IL-8.

Não foram encontradas correlações entre os níveis das citocinas IL-1 β (Figura 2), IL-6 (Figura 3), IL-10 (Figura 4) e TNF- α (Figura 5) e tempo de amamentação nos dois grupos investigados.

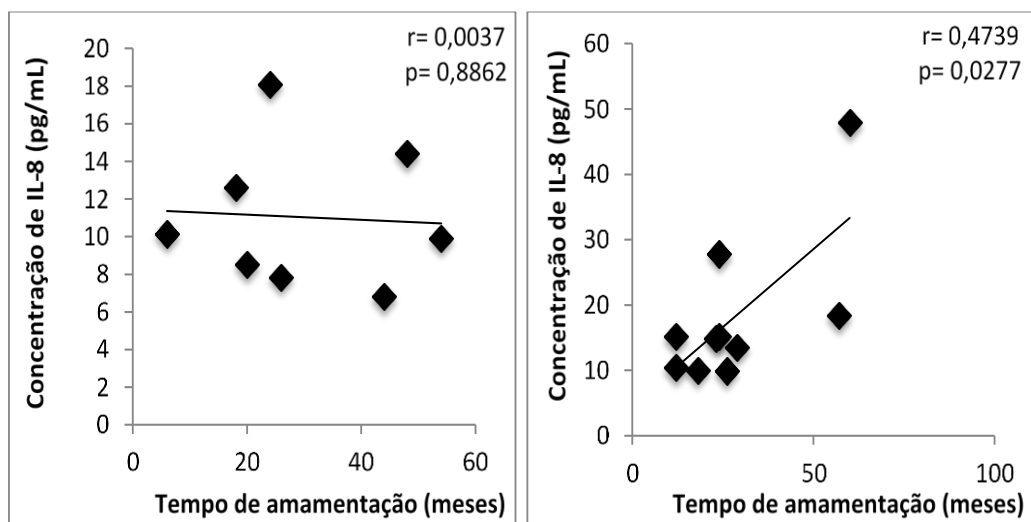


Figura 1. Correlação das concentrações de IL-8 entre os grupos controle (A) e de estudo (B).

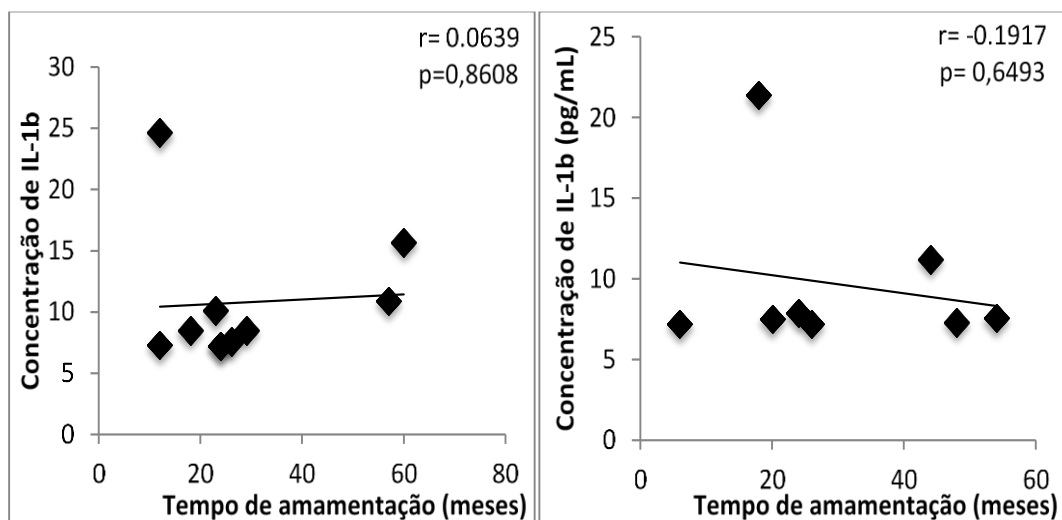


Figura 2. Correlação das concentrações de IL - 1 β entre os grupos controle (A) e de estudo (B).

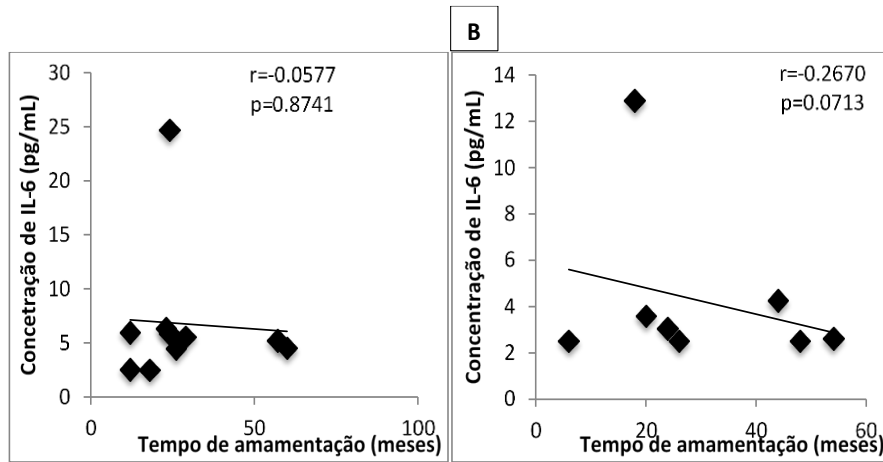


Figura 3. Correlação das concentrações de IL - 6 entre os grupos controle (A) e de estudo (B).

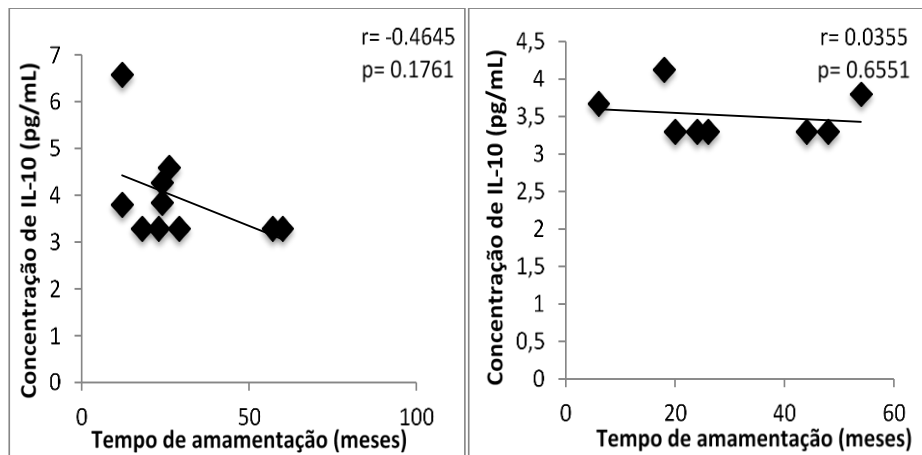


Figura 4. Correlação das concentrações de IL - 10 entre os grupos controle (A) e de estudo (B).

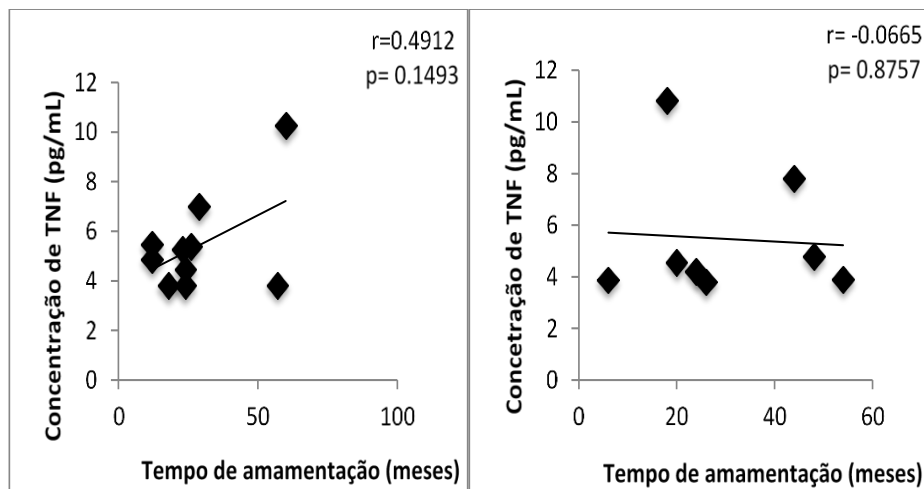


Figura 5. Correlação das concentrações de TNF- α entre os grupos controle (A) e de estudo (B).

Quando se avaliou a porcentagem de células T verificou-se que não houve diferença entre os grupos controle e de estudo com relação

à porcentagem de células T auxiliares ($p = 0.6095$) e T regulatórias ($p = 0.5277$).

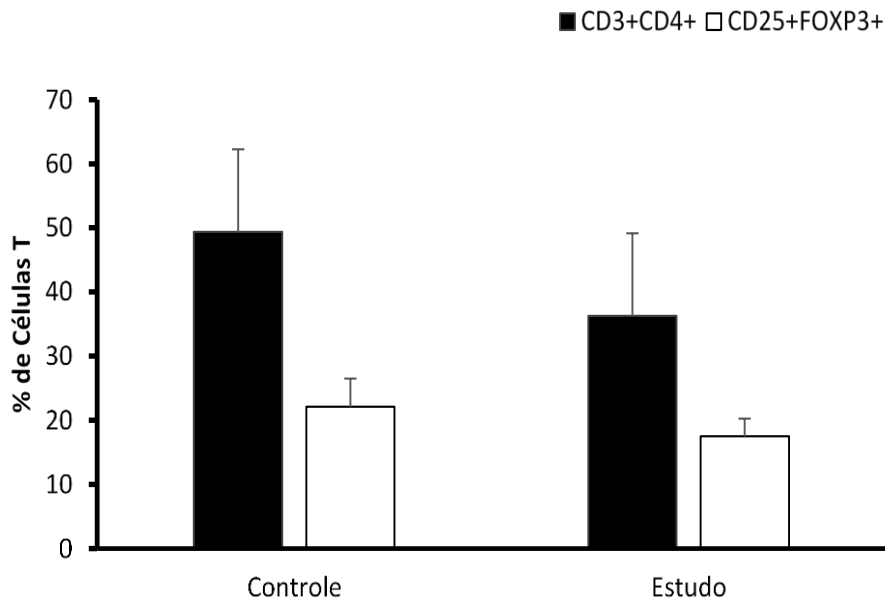


Figura 6. Fenótipo de superfície de células T auxiliares e regulatórias sanguíneas.

Evidências de estudos epidemiológicos associam à amamentação a efeitos protetores para o câncer de mama (COLDITZ, BAER, TAMIMI, 2006; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2002).

Na literatura, em relação aos casos de câncer, 25% do total são causados por infecção e inflamação crônica nos quais mediadores da resposta inflamatória como citocinas, radicais livres, prostaglandinas e fatores de crescimento podem induzir mudanças genéticas e epigenéticas que levam ao desenvolvimento e progressão do câncer, demonstrando que a inflamação e o câncer estão intimamente

associados (HUSSAIN & HARRIS, 2007; COUSSENS & WERB, 2002).

No presente estudo, verificou-se que as mulheres que tiveram diagnóstico de câncer de mama apresentaram um menor tempo de amamentação em relação ao grupo controle e níveis mais elevados da quimiocina IL-8 e das citocinas IL-6 e TNF- α .

Também evidenciou que a IL-8 apresenta correlação com o tempo amamentação onde as mulheres do estudo relataram ter amamentado seus filhos. Não foram encontradas diferenças nos tipos celulares CD3+CD4+ e CD25+Foxp3+ entre os grupos estudados.

Apesar de não terem sido verificadas diferenças nas porcentagens de células Treg entre as mulheres saudáveis e com câncer de mama no presente estudo tem se tornado claro o papel dessas células na progressão do câncer e sua relevante função suprimindo a imunidade específica do tumor (HA, 2009).

A literatura relata que as células T regulatórias CD4⁺ que expressam o fator de transcrição Foxp3⁺ tem papel altamente supressor e são fundamentais para manutenção da auto tolerância e homeostase imunológica, porém tem se relacionado à progressão do tumor pela supressão da efetividade da imunidade antitumoral em tumores malignos (TAKEUCHI & NISHIKAWA, 2016).

Segundo os achados de Takenaka et al. (2012) o fator de transcrição Foxp3⁺ é altamente expresso tanto nos linfócitos como em células tumorais e essa expressão pode ter distintas atividades biológicas e valores prognósticos de acordo com sua localização, o que pode contribuir para estabelecer o tratamento adequado para a doença

É provável que neste estudo não tenham sido verificadas aumentos nos números de células T regulatórias nas mulheres com câncer de mama quando comparadas aos controles saudáveis devido às diferentes fases do tratamento na qual se encontravam as pacientes investigadas no estudo.

Considerando os resultados de diversos trabalhos na literatura, é provável que o aumento

dos marcadores inflamatórios IL-6, IL-8 e TNF- α encontrados no presente estudo possam contribuir com resultados desfavoráveis nas pacientes investigadas.

Uma das limitações deste estudo reside no fato de não terem sido avaliadas a composição de amostras de leite materno, em especial de fatores imunomodulatórios como citocinas, de forma a melhor investigar o seu impacto na proteção das mulheres do grupo controle que amamentaram por um período superior às diagnosticadas com câncer de mama.

Estudos têm mostrado que tanto o tipo quanto o tempo de amamentação apresentam efeito dose-resposta na redução do risco contra o câncer de mama (UNAR-MUNGUÍA et al. 2017).

Nos últimos anos alguns trabalhos passaram a sugerir que o leite materno também pode representar oportunidades para entender os mecanismos relacionados à carcinogênese na mama, além de identificar marcadores que podem fornecer importantes informações que detectem precocemente mulheres com elevado risco para a doença (MURPHY et al. 2016).

Alguns estudos tem evidenciado que o uso de anti-inflamatórios não esteroidais parece inibir o processo inflamatório decorrente do desmame, sugerindo que as mulheres com alto risco para o câncer de mama podem se beneficiar dos efeitos desses anti-inflamatórios na redução do risco do câncer de mama (LYONS et al. 2011), uma vez que o tratamento com esses

agentes parece reduzir os atributos provedores do tumor na matriz extracelular da mama em involução (O'BRIEN et al. 2011).

Sendo assim, é razoável pensar que as concentrações dos constituintes do leite materno, em especial as citocinas, podem apresentar papel na inflamação presente na carcinogênese do câncer de mama, e inclusive, serem mais importantes que os níveis sistêmicos maternos pois estão em contato direto com o microambiente da glândula mamária.

É interessante notar que mesmo quando são verificadas elevações nos níveis circulantes de citocinas inflamatórias na mãe, essas alterações não são acompanhadas por aumento nas concentrações dessas citocinas no leite materno, demonstrando que os mecanismos de proteção presentes nessa secreção parecem ser mediados pelo caráter anti-inflamatório de seus componentes (FUJIMORI et al. 2016).

É provável que a exposição da glândula mamária aos componentes com propriedades anti-inflamatórias do leite materno confira efeitos benéficos contra a inflamação observada no processo de involução.

Outros achados sugerem ainda que o perfil de expressão de proteínas associadas com o câncer no leite materno é influenciado pela idade materna na primeira gestação a termo e podem desempenhar um papel em um risco de câncer no futuro (QIN et al. 2012).

Os resultados dos diversos estudos mencionados reiteram que os constituintes do

leite materno podem fornecer indícios importantes quanto ao risco de desenvolvimento da doença.

O presente estudo possibilitou compreender a influência do câncer de mama nas porcentagens de células T auxiliares, T regulatórias e níveis de citocinas além de sugerir um potencial efeito protetor de um maior tempo de amamentação na proteção contra o câncer de mama. Investigações futuras são necessárias para melhor compreender os mecanismos pelos quais os fatores imunomodulatórios presentes no leite materno parecem proteger as mulheres que amamentam.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos dados obtidos, permite-se a conclusão por este estudo que as mulheres do grupo controle apresentaram maior tempo de amamentação quando comparadas às diagnosticadas com câncer de mama sugerindo um possível efeito do período do aleitamento sobre o câncer de mama.

O câncer de mama mostrou levar a alterações nos níveis de citocinas e IL-6, IL-8 e TNF- α evidenciada pelos valores aumentados no sangue de mulheres acometidas pela doença.

Houve correlação entre o tempo de amamentação e os níveis de IL-8, o que pode denotar a importância do papel preventivo da amamentação na possível imunomodulação materna relativa à esta citocina.

As porcentagens de linfócitos T regulatórios foram similares entre as mulheres do grupo controle e diagnosticadas com câncer de mama, o que pode demonstrar a interferência das células tumorais sobre a expressão das células Treg, através de múltiplos fatores inibitórios imunológicos.

Estes dados sugerem que o câncer de mama condiciona um perfil de citocinas inflamatórias no sangue, e que a intensificação do tempo de amamentação pode exercer efeito protetor contra o câncer de mama, enquanto do período da lactação, o que poderia ser relacionado a fatores imunológicos presentes na composição do leite materno, o qual não fora objeto de análise deste estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN JOIN COMMITTEE ON CÂNCER. – **Cancer Staging Handbook**. Springer. Sixth edition. Chicago. 2002.

BENOY IH, SALGADO R, VAN DAM P, GEBOERS K, VAN MARCK E, SCHARPÉ S, VERMEULEN PB, DIRIX LY. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. **Clin Cancer Res**. Nov 1;10(21):7157-62, 2004

BRASIL, Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2013.

_____, Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

CAMISASCHI C, CASATI C, RINI F, ET AL. A expressão de LAG-3 define um subconjunto de células T reguladoras de CD4 (+) CD25 (alta) Foxp3 (+) que são expandidas em locais de tumor. **J Immunol**. 2010; 184 : 6545-6551, 2010.

CANAVAN JB, AFZALI B, SCOTTÀ C, ET AL. Um teste de diagnóstico rápido para a função das células T reguladoras humanas para permitir a terapia de células T reguladora. **Sangue**. 2012; 119 : e57-e66, 2012.

CARDOSO, F. et al. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). **Ann Oncol**, v. 25, n. 10, p.1871–1888, 2014.

CARRERAS J, LOPEZ-GUILLERMO A, FOX BC, ET AL. Números elevados de células T reguladoras FOXP3-positivas infiltrando tumores estão associados com uma melhoria da sobrevivência global no linfoma folicular. **Sangue**, 108: 2957-2964, 2006.

COLDITZ GA, BAER HJ, TAMIMI RM. **BREAST CANCER**. IN: SCHOTTENFELD D, FRAUMENI JF JR, editors. Cancer epidemiology and prevention. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2006. p. 995–1012.

COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and cancer. *Nature*. Dec 19-26; 420(6917): 8607, 2002.

DROESER R, ZLOBEC I, KILIC E, ET AL. Padrão diferencial e significado prognóstico dos linfócitos infiltrantes tumorais CD4 +, FOXP3 + e IL-17 + nos cânceres de mama ductal e lobular. **BMC Câncer**, 12 : 134, 2012.

DUHEN T, DUHEN R, LANZAVECCHIA A, SALLUSTO F, DJ CAMPBELL. Subconjuntos funcionalmente distintos de células Foxp3 + Treg humanas que fenotipicamente espelham células Th efetoras. **Sangue**, 119 : 4430-4440, 2012.

FRANCISCO LM, SALINAS VH, BROWN KE, et al. O PD-1 regula o desenvolvimento, a manutenção ea função de células T reguladoras induzidas. **J Exp Med.**, 206: 3015-3029, 2009.

FREY DM, DROESER RA, VIEHL CT, ET al. A alta frequência de linfócitos T reguladores FOXP3 (+) que infiltram tumores prediz uma sobrevivência melhorada em pacientes com câncer colorretal proficiente em reparo incompatível. **Int J Câncer**, 126 : 2635-2643, 2010,

HUSSAIN, S. P., & HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. **International Journal of Cancer**, 121, 2373–2380, 2007.

JACOBS JF, IDEMA AJ, BOL KF, ET AI. As células T reguladoras e a via PD-L1 / PD-1 medeiam a supressão imunológica em tumores cerebrais humanos malignos. **Neuro Oncol.**, 11: 394-402, 2009.

KALATHIL S, LUGADE AA, MILLER A, IYER R, THANAVALA Y. As frequências mais altas das células reguladoras GARP (+) CTLA-4 (+) Foxp3 (+) T e células supressoras derivadas de mielóides em pacientes com carcinoma hepatocelular estão associadas Funcionalidade de células T prejudicada. **Cancer Res.** 73 : 2435-2444, 2013.

KOZŁOWSKI L, ZAKRZEWSKA I, TOKAJUK P, WOJTUKIEWICZ MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. **Rocz Akad Med Białymst.**, 48:82-4, 2003.

LADOIRE S, MARTIN F, GHIRINGHELLI F. Papel prognóstico das células T reguladoras FOXP3 + infiltrando carcinomas humanos: o paradoxo do câncer colorretal. **Câncer Immunol Immunother.**, 60 (7): 909-918, 2011.

LOBO AM, LOBO D, STEURER M, GASTL G, GUNSILIUS E, GRUBECK-LOEBENSTEIN B. Aumento das células T

reguladoras no sangue periférico de pacientes com câncer. **Clin Cancer Res.**, 9 : 606-612, 2003.

LYONS TR, O'BRIEN J, BORGES VF, CONKLIN MW, KEELY PJ, ELICEIRI KW, MARUSYK A, TAN AC, SCHEDIN P. Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX-2. **Nat Med.** Aug 7;17(9): 1109-15, 2011.

MOUGIAKAKOS D, CHOUDHURY A, LLADSER A, KIESSLING R, CC DE JOHANSSON. As células T reguladoras no câncer. **Adv Cancer Res.**, 107 : 57-117, 2010.

MURPHY J, SHERMAN ME, BROWNE E, CABALLERO AI, PUNSKA EC, PFEIFFER RM, YANG HP, LEE M, YANG H, GIERACH GL, ARCARO KF. Potential of breastmilk analysis to inform early events in breast carcinogenesis: rationale and considerations. **Breast Cancer Res Treat.** 2016 May;157(1):13-22.

ONDONDO B, JONES E, GODKIN A, GALLIMORE A. Casa doce lar: o microambiente tumoral como um refúgio para as células T reguladoras. **Immunol.** 4: 197, 2013.

QIN W, ZHANG K, KLIETHERMES B, RUHLEN RL, BROWNE EP, ARCARO KF, SAUTER ER. Differential expression of cancer associated proteins in breast milk based on age at first full term pregnancy. **BMC Cancer.** 2012 Mar 21;12:100.

RUITENBERG JJ, BOYCE C, HINGORANI R, PUTNAM A, GHANEKAR SA. Avaliação rápida de células T reguladoras humanas expandidas in vitro. **J Immunol Methods.**, 372: 95-106, 2011.

SLEDGE, G. W. et al. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 19, p. 1979–1986, jul. 2014.

SNOUSSI, K. et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and Aggressiveness. *BMC Cancer*, v.10, n.283, 2010.

STRAUSS L, BERGMANN C, SZCZEPANSKI MJ, LANG S, KIRKWOOD JM, RECH AJ, MICK R, KAPLAN DE, CHANG KM, DOMCHEK SM, VONDERHEIDE RH. Homeostase de células T reguladoras FOXP3 (+) CD4 (+) periféricas em pacientes com câncer de mama precoce e tardio. *Câncer Immunol Immunother*. 59 (4): 599-607, 2010.

TAKEUCHI Y, NISHIKAWA H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol*, Aug;28(8):401-9. 2016.

UNAR-MUNGUÍA M, TORRES-MEJÍA G, COLCHERO MA, GONZÁLEZ DE COSÍO T. Breastfeeding Mode and Risk of Breast Cancer. *J Hum Lact*. 2017 Feb 1:890334416683676.

VICARI A.P., CAUX C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Review*, v.13, p.143–154, 2002.

WHITESIDE TL. Expressão de ICOS em células reguladoras CD4 + CD25^{high}Foxp3 + T humanas infiltrando melanoma: implicações e impacto na supressão imunológica mediada pelo tumor. *J Immunol.*, 180 (5): 2967-2980. 2008

WHITESIDE TL. Quais são as células T reguladoras (Treg) que regulam o câncer e por quê? *Semin Cancer Biol.*, 22 : 327-334. 2012.

WOLFF, A. C. et al. 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*, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, nov. 2014.

YAMAGUCHI T, WING JB, SAKAGUCHI S. Dois modos de supressão imunológica por células T reguladoras FoxP39 (+) sob condições

inflamatórias ou não inflamatórias. *Semin Immunol.*, 23 : 424-430, 2011.