



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**FRANCISCA JANICE LOPES SALES**

**VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE HMGB1 E IL-33 EM CÂNCER**

**DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

**FORTALEZA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S155v Sales, Francisca Janice Lopes.  
Valor prognóstico da expressão de HMGB1 e IL-33 em câncer de mama triplo negativo / Francisca Janice Lopes Sales. – 2023.  
65 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Deysi Viviana Tenazoa Wong.

1. HMGB1. 2. IL-33. 3. Câncer de mama triplo negativo. 4. Imunofluorescência. I. Título.

CDD 571.9

---

FRANCISCA JANICE LOPES SALES

**VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE HMGB1 E IL-33 EM CÂNCER DE MAMA  
TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obter o título de mestre em Patologia. Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Deysi Viviana Tenazoa Wong

Fortaleza

2023

FRANCISCA JANICE LOPES SALES

**VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DE HMGB1 E IL-33 EM CÂNCER DE MAMA  
TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obter o título de mestre em Patologia. Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Deysi Viviana Tenazoa Wong

Aprovada em : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Prof. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Duílio Reis da Rocha Filho  
Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC)

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Katharine Gurgel Dias Florêncio  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Fortaleza- 2023

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de viver.

Agradeço a Prof. Dra. Deysi Viviana que esteve sempre presente em cada etapa do desenvolvimento deste trabalho, incentivando ao seu seguimento. Prof. Dra. Deysi além de uma exemplar orientadora desempenhou seu papel maior como uma grande educadora. Agradeço por ter tido a honra de trabalhar com essa grande profissional.

Agradeço aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Duílio Reis da Rocha Filho, Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho e Dra. Katharine Gurgel Dias Florêncio pela disponibilidade em contribuir com a melhoria do nosso trabalho.

Agradeço a todos os membros do LAFICA pelo grande trabalho que realizam no desenvolvimento da pesquisa, em especial aos alunos Ana Maria Falcão, Iandra Oliveira, Marina Lopes e David Barbosa pela contribuição neste trabalho. Agradeço também ao Prof. Dr. Roberto César pela sua presença sempre constante no laboratório nos incentivando a buscar sempre nos superar em nossos projetos.

Agradeço as Instituições que financiaram esta pesquisa FUNCAP e CNPq. Graças a disponibilidade de seus recursos, este trabalho pode ser desenvolvido.

Por fim agradeço a meus parentes e amigos que direta ou indiretamente participaram comigo durante os anos em que cursei o mestrado. Saibam que este título não é apenas meu, mas de todos que caminharam comigo nessa jornada.

## RESUMO

O Câncer de Mama é uma das neoplasias mais frequentes em todo o mundo, contribuindo para a morbimortalidade feminina. O Câncer de mama Triplo Negativo (CMTN) é um subtipo altamente agressivo de câncer que são negativos para os receptores de estrógeno e progesterona, assim como não apresenta superexpressão do fator tipo 2 de crescimento epidérmico humano (C-erbB2, HER2/neu). O Grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) é considerado um DAMP (Padrão molecular associado ao dano) que regula a tumorigênese, proliferação e metástase maligna. A IL-33, citocina relacionada ao dano celular, tem mostrado desempenhar papel na tumorigênese e respostas inflamatórias associadas ao tumor. O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão de HMGB1 e IL-33 como fatores prognósticos para o CMTN. Foram avaliados dados clínicos-patológicos de 122 pacientes com diagnóstico de CMTN atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba. Adicionalmente, foi construído um bloco de Tissue Microarray (TMA) contendo amostras de blocos de parafina de biopsias de 43 pacientes. Em seguida, foi realizada a imunofluorescência para HMGB1 com o intuito de quantificar a intensidade de expressão e o percentual de células fluorescentes com marcação citoplasmática (cHMGB1). Foi realizada a imunohistoquímica para HMGB1 e IL-33 utilizando o método de detecção Kit Envision DAKO®. Na análise estatística considerou-se como significância o valor de  $p < 0,05$  utilizando o programa estatístico SPSS v.17 e GraphPad Prism v.8. A análise de dados clínico-patológicos indicou que os pacientes tinham mais de 40 anos (79%) e foram diagnosticados com carcinomas ductais de grau 2-3 (96,3%). Metástase tumoral foi observada em 1,9% dos casos. 66,7% dos pacientes com CMTN que realizaram quimioterapia adjuvante apresentaram baixa expressão de HMGB1 ( $p < 0,05$ ). Além disso, verificou-se que os pacientes que recidivaram, 77,8% destes tiveram baixa expressão citoplasmática de HMGB1 em comparação com os de alta expressão ( $p < 0,05$ ). A sobrevida global foi semelhante entre os pacientes com baixa versus alta expressão de HMGB1 citoplasmática ( $P = 0,155$ ). Para IL-33 não foram encontrados resultados significativos, no entanto ressaltamos que o gráfico comparativo entre expressão High e Low de IL-33 versus recidiva, mostrou que 19% dos pacientes com expressão IL-33 High apresentaram recidiva da doença ( $p > 0,05$ ). Assim, a expressão de HMGB1 citoplasmática apresentou associação com a recidiva e a quimioterapia adjuvante em pacientes CMTN.

**Palavras-chave:** HMGB1, IL-33, Câncer de mama triplo negativo, imunofluorescência

## ABSTRACT

Breast Cancer is one of the most frequent neoplasms worldwide, contributing to female morbidity and mortality. Triple Negative Breast Cancer (CMTN) is a highly aggressive subtype of cancer that is negative for estrogen and progesterone receptors and lacks overexpression of human epidermal growth factor type 2 (C-erbB2, HER2/neu). High Mobility Group 1 (HMGB1) is a DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) that regulates tumorigenesis, proliferation, and malignant metastasis. IL-33, a cytokine related to cell damage, has been shown to play a role in tumorigenesis and tumor-associated inflammatory responses. This study aimed to analyze the expression of HMGB1 and IL-33 as prognostic factors for CMTN. Clinical-pathological data of 122 patients diagnosed with CMTN treated at Hospital Haroldo Juaçaba were evaluated. Additionally, a Tissue Microarray (TMA) block was constructed containing samples of paraffin blocks from the biopsies of 43 patients. Then, immunofluorescence for HMGB1 was performed to quantify the intensity of expression and the percentage of fluorescent cells with cytoplasmic (cHMGB1) staining. Immunohistochemistry for HMGB1 and IL-33 was performed using the Envision DAKO® Kit detection method. In the statistical analysis, significance was considered at  $p < 0.05$  using the statistical program SPSS v.17 and GraphPad Prism v.8. Analysis of clinicopathological data indicated that patients were over 40 years old (79%) and were diagnosed with grade 2-3 ductal carcinomas (96.3%). Tumor metastasis was observed in 1.9% of cases. 66.7% of patients with CMTN who underwent adjuvant chemotherapy had low expression of HMGB1 ( $p < 0.05$ ). Furthermore, it was found that of patients who relapsed, 77.8% of these had low cytoplasmic expression of HMGB1 compared to high expression ( $p < 0.05$ ). Overall survival was similar between patients with low versus high cytoplasmic HMGB1 expression ( $P = 0.155$ ). For IL-33, no significant results were found. However, we emphasize that the comparative graph between High and Low expression of IL-33 versus relapse showed that 19% of patients with IL-33 High expression had a disease relapse ( $p > 0, 05$ ). Thus, cytoplasmic HMGB1 expression was associated with relapse and adjuvant chemotherapy in CMTN patients.

**Keywords:** HMGB1, IL-33, Triple negative breast cancer, immunofluorescence

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação molecular dos subtipos de Câncer de mama	11
<b>Tabela 2</b>	Dados clínicos e patológicos	25
<b>Tabela 3</b>	Associação entre a expressão de HMGB1 e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com câncer de mama triplo negativo	27
<b>Tabela 4</b>	Associação entre a expressão de HMGB1 e as variáveis de tratamento e recidiva em pacientes com câncer de mama triplo negativo	28
<b>Tabela 5</b>	Associação entre a expressão de HMGB1 citoplasmática e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com câncer de mama triplo negativo	31
<b>Tabela 6</b>	Associação entre a expressão de HMGB1 citoplasmática e as variáveis de tratamento e recidiva em pacientes com câncer de mama triplo negativo	32



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Efeitos biológicos desempenhados pelo HMGB1	16
<b>Figura 2</b>	Múltiplos papéis da IL-33 em malignidades	19
<b>Figura 3</b>	Fluxograma da coleta de amostras e delineamento experimental	22
<b>Figura 4</b>	Determinação do Cut off da quantificação pela intensidade de expressão de HMGB1 em biopsias de câncer de mama triplo negativo	29
<b>Figura 5</b>	Sobrevida global estratificada pela intensidade de expressão de HMGB1 em pacientes com câncer de mama Triplo Negativo.	32
<b>Figura 6</b>	Sobrevida global estratificada pela expressão citoplasmática de HMGB1 em pacientes com câncer de mama Triplo Negativo	36
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografias da expressão citoplasmática de HMGB1 por imunofluorescência nos pacientes com câncer de mama triplo negativo	37
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografias da expressão de HMGB1 por imunohistoquímica nos pacientes através da análise de escores de intensidade de marcação	41
<b>Figura 9</b>	Fotomicrografias da expressão de IL-33 na IHQ, demonstrando o grupo High e Low	43
<b>Figura 10</b>	Gráfico comparativo entre os pacientes que apresentaram recidiva da doença estratificados entre IL-33 High e IL-33 Low	45
<b>Figura 11</b>	Sobrevida global estratificada pela expressão High e Low de HMGB1 e IL-33 em pacientes com Câncer De mama Triplo Negativo	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
DAMP	Padrões Moleculares Associados ao Dano
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HMGB1	High Mobility Group Box 1 – Proteína do grupo de alta mobilidade B1
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano.
IL-33	Interleucina-33
MCI	Morte Celular Imunogenica
PRP	Receptores de Reconhecimento Padrão
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
TILs	Linfócitos Infiltrantes de Tumor
TLRs	Receptores Toll-like

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
SUMÁRIO .....	11
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Câncer de mama e subtipos moleculares.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Câncer de mama triplo negativo.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Papel das citocinas no câncer de mama .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.1 HMGB1 .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.2 IL-33 (Interleucina-33) .....</b>	<b>19</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>21</b>
<b>3.OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>4.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Desenho do estudo .....	24
4.2 Aspectos Éticos .....	24
4.4.Elegibilidade .....	25
4.4.1 Critérios de inclusão.....	24
4.4.2Critérios de exclusão.....	25
4.5 Variáveis do estudo:.....	25
4.6 Montagem do Tissue Microarray (TMA).....	24
4.7Avaliação da expressão de HMGB1 por imunofluorescência.....	26
4.8 Imunohistoquímica para HMGB1 e IL-33 .....	25
4.9 Análise por Escore.....	26
4.10 Análise estatística.....	27
<b>5.RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>56</b>

# 1.INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças complexas caracterizado pelo crescimento celular descontrolado e capacidade de invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância. Do ponto de vista epidemiológico, o câncer é considerado a segunda causa de morte no mundo, tornando-se um problema de saúde mundial. No Brasil, estima-se que haverá 704 mil casos novos de câncer para o triênio de 2023-2025. Entre as mulheres, o câncer de maior incidência, excluindo o de pele não melanoma, é o câncer de mama (INCA, 2023). De acordo com a Globocan, em 2018 a incidência de cancer de mama foi de mais de 2 milhões de casos no mundo (BRAY et al., 2018). Para o Brasil, é estimado para cada ano do triênio 2023-2025 a ocorrência de 73.610 casos novos de câncer de mama. Correspondendo a um risco estimado de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres. No Ceará, estima-se 21,49 casos novos de câncer de mama femenina para cada 100 mil mulheres (INCA, 2023).

## 1.1 Câncer de mama e subtipos moleculares

O câncer de mama é uma patologia complexa de alta heterogeneidade, na qual os tumores, ainda que possuam histologia e clínica semelhantes, podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009). A busca de marcadores de expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) marcou o início da classificação molecular há cerca de 30 anos atrás. A partir de microarranjos de DNA foi possível classificar o câncer de mama em quatro subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2 positivo e Triplo negativo (PEROU et al, 2000.) Os subtipos estão descritos na **Tabela 1** (BARRETO-NETO et al., 2014).

**Tabela 1** . Classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama de acordo com o perfil imunohistoquímico.

<b>Subtipo</b>	<b>Padrão Molecular</b>
Luminal A	RE (+) e/ou RP (+); HER2 (-); ki 67 < 14%
Luminal B	RE(+) e/ou RP (+); HER2 (+) e/ou ki67 > 14%
Triplo Negativo	RE (-) RP (-); HER2 (-)
HER2+	RE (-) RP (-); HER2 (+)

RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (BARRETO-NETO et al., 2014)

Os tumores luminais A e B tem como origem o epitélio luminal do ducto mamário, e recebem essa denominação por conta da semelhança das células neoplásicas com as células mamárias normais do lumen dos ductos mamários (SOTIRIOU et al, 2003).

O subtipo molecular luminal A, em comparação aos demais, apresenta melhor prognóstico. Tem como característica receptores positivos para estrogênio (RE) e/ou progesterona (RP) e negativos para superexpressão de HER2 (PEROU et al, 2000; SØRLIE et al 2001; SOTIRIOU et al 2003). O subtipo luminal B, apresenta receptores para hormônios positivos, expressando também genes associados ao HER2. Por apresentar um maior número de genes associados a proliferação celular tais como MKI67, CCNB1 e MYBL2, seu prognóstico torna-se pior que o subtipo luminal A (SORLIE et al, 2001; SORLIE et al, 2003).

O subtipo superexpressão de HER2, possui elevada expressão da oncoproteína HER2 e revela negatividade para receptores hormonais (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004). Apresenta o segundo pior prognóstico. O subtipo triplo negativo apresenta o pior prognóstico em relação aos outros subtipos, no que se refere à sobrevida em cinco anos. Não apresenta receptores homonais nem expressão de HER2 (BARRETO-NETO et al, 2014)

## 1.2 Câncer de mama triplo negativo

Dentro os subtipos de câncer de mama destacamos o Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN), conhecido por não expressar em suas células receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2) (RYU et al., 2011).

O CMTN foi relatado na literatura pela primeira vez em 2005, sendo responsável por 16% de todos os casos de câncer de mama (SHAH et al, 2012). Responde por 15% a 20% dos casos de câncer de mama invasivo, com graus mais elevados ou metástases nodais frequentes e geralmente se desenvolvem em uma taxa mais elevada em pacientes jovens (FOULKES; SMITH; REIS-FILHO, 2010).

Devido à ausência de receptores hormonais e expressão de HER2, o CMTN é normalmente caracterizado por mau prognóstico (PRAT et al, 2014; LUO et al, 2020). Comparando o CMTN com outros subtipos de câncer de mama, o tempo de sobrevivência dos pacientes é menor, apresentando uma taxa de mortalidade de 40% nos primeiros 5 anos pós diagnóstico (DENT et al., 2007).

Ao adotar o método de análises genômica na avaliação de casos de CMTN, vários subtipos foram identificado ao longo dos anos. Esses estudos mostraram que este tipo de cancer é notavelmente heterogêneo a nível transcricional. Revelaram ainda que o CMTN pode ser classificado em vários subtipos, com vias biológicas exclusivas para cada subtipo (JÉZÉQUEL et al., 2015).

O câncer de mama triplo negativo (CTNM) é uma entidade que apresenta uma heterogeneidade histopatológica, transcriptômica e genômica bem evidenciada. Contudo, o tratamento desse tumor é realizado de forma padrão nos regimes de quimioterapia (MARRA et al, 2020). Do ponto de vista genômico, os CTNM apresentam mutações somáticas em genes

supressores tumorais cruciais, como o *PTEN* (Phosphatase and tensin homolog) e *TP53*. Além disso, foram descritas que 10% dos pacientes com CTNM apresentam mutações em genes condutoras ou *drivers* como o *PIK3CA*, da via de sinalização PI3K/AKT (KOBOLDT et al., 2012). Assim, a procura por biomarcadores preditivos de resposta ao tratamento do CTNM pode trazer benefícios e caminhar para a medicina de precisão.

### 1.3 Papel das citocinas no câncer de mama

O processo pelo qual o cancer de mama é iniciado ainda é desconhecido, por este motivo várias hipóteses foram levantadas. Neste contexto, a inflamação foi proposta para mediar a iniciação, promoção, angiogênese e metástase de tumores. Em um microambiente tumoral, a inflamação compreende células imunológicas e fibroblastos ativadas que secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Essas citocinas são os mediadores críticos da comunicação entre as células neoplásicas no microambiente tumoral inflamatório (CANDIDO; HAGEMANN, 2013). Particularmente em Cancer de Mama, duas quimiocinas, IL-8 e CCL2 regulam a angiogênese tumoral (BIÈCHE et al., 2007), a sobrevivência e a metástase de células cancerosas (FANG et al., 2012). Essas duas quimiocinas permitem o recrutamento de outras células, incluindo monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células NK.

Algumas pesquisas consideraram que a IL-33 desempenha um importante papel na progressão do câncer de mama, por meio da diminuição da imunidade antitumoral inata e aumento da acúmulo intratumoral de células imunossupressoras. Foi constatado no modelo de câncer de mama 4T1 um aumento dependente do tempo de IL-33 endógeno em ambos os níveis de mRNA e metástase pulmonar durante a progressão do câncer (JOVANOVIC et al, 2014)

Outra importante citocina é o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que em condições

normais, medeia a via inflamatória e controla as células inflamadas. Em um ambiente cancerígeno agressivo, o TnF- $\alpha$  é produzido de forma excessiva pelos macrófagos associados ao tumor (TAMs) (WANG; LIANG; ZEN, 2014) regulando positivamente muitos genes envolvidos na proliferação, invasão e metástase de células cancerosas (KIM et al., 2012).

A inflamação é uma resposta da imunidade inata a patógenos ou moléculas liberadas na lesão tecidual. Esta primeira linha não específica de defesa é formada a partir da ligação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) a um conjunto de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), que incluem receptores Toll-like (TLRs) e inflamassomas. Estes receptores detectam os DAMPs e elaboram uma resposta imunológica (FELDMAN; ROTTER-MASKOWITZ; OKUN, 2015).

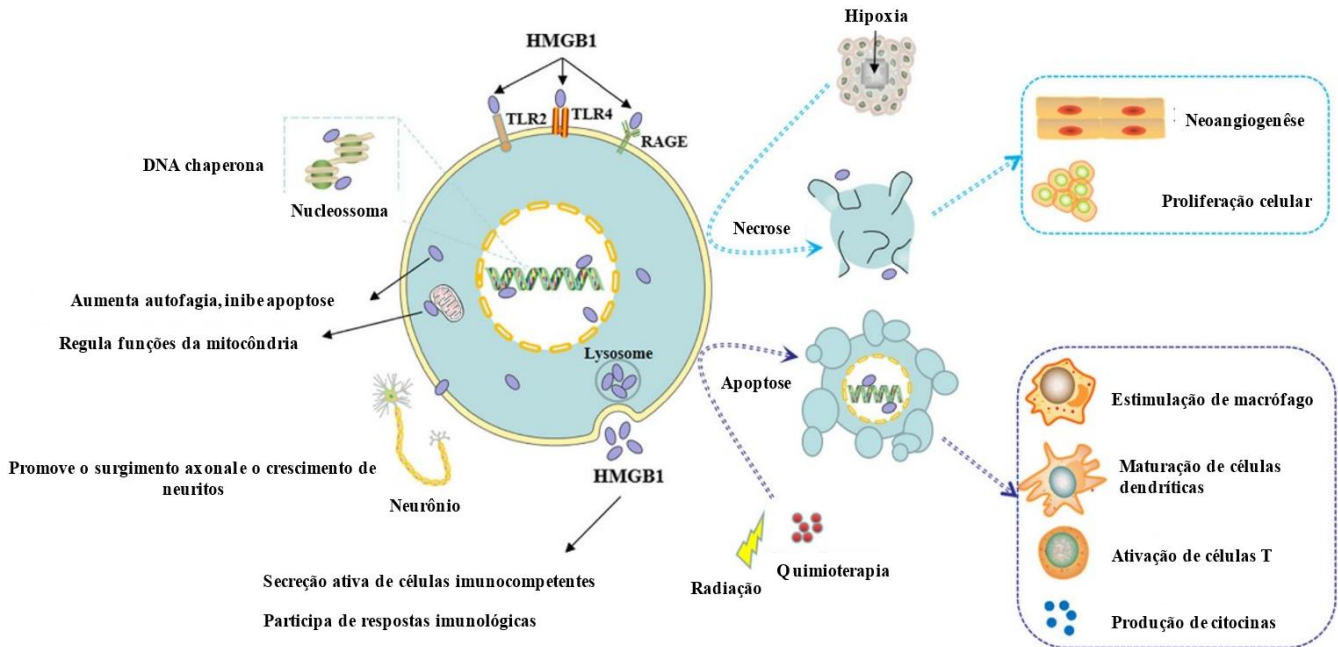
A inflamação desencadeada por DAMPs é uma proteção do organismo contra estímulos prejudiciais, com tudo, se desregulada ou não resolvida a tempo, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes, cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (MEDZHITOV, 2010).

### **1.3.1 HMGB1**

A proteína do Grupo de Alta Mobilidade 1 conhecida como HMGB1 ou anfoterina está entre os DAMPs mais estudados e foi evidenciada pela primeira vez em 1973 como uma proteína cromossômica não histona e nomeada por sua alta mobilidade eletroforética (KLUNE et al., 2008). Pode ser secretada ativamente após estimulação ou de forma passiva por células danificadas ou que estejam em processo de morte (JUBE et al., 2012). O HMGB1 extracelular contribui para várias patologias, incluindo sepse, isquemia-reperfusão, aterosclerose, artrite, neurodegeneração, meningite e câncer. Muitos grupos de pesquisa exploraram opções terapêuticas para regular o HMGB1 em modelos pré-clínicos produzindo dados promissores (XUE et al., 2020).



Como uma proteína multifuncional, o HMGB1 exerce diferentes efeitos biológicos desempenhando um importante papel na regulação da resposta imune inata e adaptativa, como exemplificado na **Figura 1**.



**Figura 1:** As multifunções do HMGB1. No núcleo regula o reparo de danos ao DNA e a estabilidade do genoma como uma proteína associada à cromatina não-histona e um acompanhante de DNA. No citoplasma ou nas mitocôndrias, o HMGB1 aumenta a autofagia, inibe a apoptose e regula as funções das mitocôndrias. Na membrana, HMGB1 promove brotamento axonal e crescimento de neuritos. O HMGB1 pode ser transferido para o meio extracelular por duas vias: secreção ativa de células imunocompetentes ou liberação passiva de células apoptóticas ou necróticas, participando de respostas imunes (WANG, ZHANG, 2020)

Agentes quimioterápicos como doxorrubicina, oxaliplatina, ciclofosfamida, bortezomibe e paclitaxel exercem seus efeitos antitumorais induzindo a morte celular imunogênica (MCI). A MCI induz imunidade antitumoral por meio da liberação de DAMPs, incluindo HMGB1, calreticulina, trifosfato de adenosina (ATP) e proteínas de choque térmico (ZHAY et al., 2023). O HMGB1 pode combinar-se com o receptor Toll-like 4 (TLR4) transmitindo sinais para estimular a maturação de células, mediando assim a estimulação imunológica (APETOH et al., 2007).

Entre os DAMPs, o HMGB1 é o mais associado ao câncer. Apresenta papel dual no contexto do microambiente tumoral, ora pode desencadear uma atividade antitumoral ou ora

uma capacidade de promover a imunotolerância, aumentando as células T reguladoras da produção de IL-10 (TANG et al., 2010). (LIU; FALO; YOU, 2011).

HMGB1 é o membro mais estudado da família HMGB e está associado à patogênese de diferentes tumores incluindo Câncer Colorretal, Carcinoma Hepatocelular e câncer de pulmão (LI et al., 2017a) (WU; YANG, 2018)(CHENG et al., 2020). A secreção ativa de HMGB1 pode promover a expressão de receptores induzindo a angiogênese assim como sua ligação a fatores específicos pode promover o desenvolvimento de metastases (NIU et al., 2020)

HMGB1 parece atuar de forma paradoxal durante o desenvolvimento e terapia do câncer. A produção excessiva de HMGB1 causada por resposta inflamatória crônica parece estar associada à tumorigênese. Combinando com RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), HMGB1 desempenha um papel importante na regulação da ativação de células ovais do fígado e assim contribuir com a carcinogênese hepática associada à inflamação em camundongos (PUSTERLA et al., 2013).

Um estudo de Yang e colaboradores (2020) em seus resultados forneceu evidências em que o HMGB1 acetilado pode interagir com GPX4 (Glutationa Peroxidase 4), levando ao estresse oxidativo e inflamação via NF- $\kappa$ B em células de câncer de cólon. Esses achados podem identificar um novo mecanismo para terapia deste tipo de câncer (YANG et al., 2020).

Wang et al (2020) em seu estudo demonstrou que os neutrófilos dimCD62L aceleraram a metástase pulmonar e que as intervenções direcionadas ao eixo "neutrófilos dim HMGB1-CD62L -NETs" poderiam inibir este processo. Os resultados deste estudo sugerem ainda que a combinação de neutrófilos CD62Ldim e HMGB1 como um potencial marcador para metástase pulmonar de câncer de mama e um novo alvo para prevenção e terapia futuras (WANG et al., 2020).

### 1.3.2 IL-33 (Interleucina-33)

A interleucina-33 é um membro da família de citocinas IL-1 que inclui diversas citocinas (SCHMITZ et al., 2005). A família da IL-1 é composta de 11 membros, tais como a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-18, IL-33, IL-36RA, IL-36  $\alpha$ , IL-36  $\beta$ , IL-36  $\gamma$ , IL-37 e IL-38 participantes como mediadores inflamatórios, estimulam a expressão de integrinas em leucócitos e células endoteliais, por exemplo (DINARELLO, 2011) (SHEN et al 2018). A citocina IL-33 é considerada uma alarmina liberada após dano celular e está relacionada a imunidade inata do tipo 2, imunidade adaptativa e inflamação, modulando ILC2 (Linfócitos semelhantes ao inato), Th2 e a resposta dos macrófagos M2 que são responsáveis pelo controle de infecções e reparo tecidual, assim como respostas alérgicas (MANTOVANI et al., 2019).

O efeito de citocina da IL-33 é exercido após sua ligação com seu receptor, conhecido como ST2, que forma um heterodímero com o co-receptor de proteína acessória da IL-1 (IL-1RAcP). Assim, com a ligação IL-33/ST2 é possibilitada a ativação da via intracelular de sinalização. Dessa maneira, o sinal é transduzido a partir da ativação de mediadores intracelulares, principalmente a proteína adaptadora MYD88, IRAK1, IRAK4 e TRAF6, resultando na ativação à jusante de vias como a da MAPK e do fator de transcrição NF $\kappa$ B, classicamente envolvidas com a carcinogênese e com a inflamação indutora de tumor. (LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016)

A liberação da IL-33 pode estar associada com estresse oxidativo e necrose tecidual (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013). Considerando que a inflamação é um componente importante nas malignidades, isto tem levado ao desenvolvimento de estudos sobre como a IL-33 desempenha papéis na melhoria da vigilância do câncer e da imunidade contra o tumor. Atualmente, os estudos sobre o papel da IL-33 em cânceres tem seu foco voltado para o microambiente tumoral, tumorigênese e respostas inflamatórias associadas ao tumor (SHEN; LIU; ZHANG, 2018).

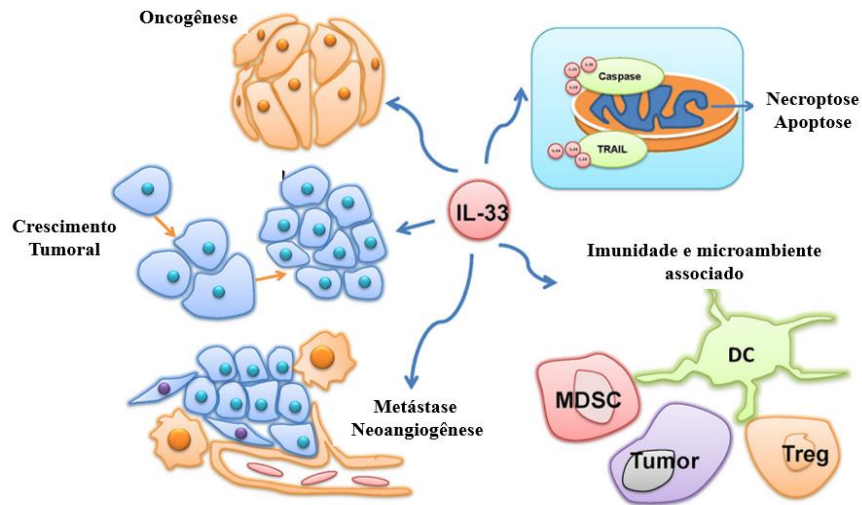
Ademais, a IL-33 participa de respostas imunológicas adaptativa, em particular de linfócitos auxiliares Th2, a partir da modulação de células Treg, T CD4 + , ILC2 ,entre outras. Tendo potencial devido ao estímulo à resposta imune Th2 de polarizar macrófagos teciduais para sua ativação alternativa ou também conhecidas como macrófago do tipo 2 (M2) (CHAN et al., 2019). Embora a IL-33 tenha sido inicialmente estudada no contexto da alergia, infecção e inflamação, na última década essa citocina ganhou muita atenção na imunologia do câncer (AFFERNI et al., 2018).

A IL-33 desempenha papéis pró-tumorigênicos, ou mesmo anti-tumorigênicos, cujo efeito dual ou pleiotrópico está associado à modulação do microambiente tumoral (LARSEN et al., 2018). Em pacientes portadoras de câncer de mama foi observada uma maior expressão de IL-33 e sST2 séricos quando comparadas ao controle,além de estarem correlacionados a um pior prognóstico (YANG et al., 2015).

No câncer de mama, o pulmão é um dos locais mais comuns no desenvolvimento de metastase. Shani et al. (2020) demonstraram que a expressão de IL-33 foi significativamente maior na metástase pulmonar em comparação com outros locais neste tipo de câncer. Onde a IL-33 derivada de FAC (Fibroblastos associados ao câncer) modifica o microambiente imune metastático conduzindo a inflamação do tipo 2 (SHANI et al., 2020).

Em outro estudo foi demonstrado que níveis de IL-33 estão positivamente correlacionados com a expressão de LPIN1 (enzima que converte o ácido fosfatídico em diacilglicerol) em células de câncer de mama humano. A inibição de JNK1/2 diminuiu a expressão de LPIN1 induzida por IL-33 reduzindo a proliferação celular e a formação de colônias em células, demonstrando claramente que IL-33 é um potente indutor da expressão de LPIN1 através da via COT-JNK1/2 podendo desempenhar importante papel na tumorigênese da mama (KIM et al., 2021).

**Figura 2. Os múltiplos papéis da IL-33 em malignidades**



A IL-33 foi relatada como envolvida em diferentes características do câncer, como oncogênese, crescimento tumoral, metástase, neoangiogênese e evasão da morte celular programada. No entanto, como um fator imuno-associado, a IL-33 também demonstrou afetar a imunidade e o microambiente associado do câncer por meio de células imunes, como células supressoras derivadas de mieloides (MDSC), células dendríticas (DC) e células T reguladoras (Treg) (SHEN; LIU; ZHANG, 2018)

## 2. JUSTIFICATIVA

O Câncer de mama triplo negativo (CTNM) é um tipo de câncer altamente agressivo e sua complexidade e características muito heterogêneas fazem com que suas possibilidades terapêuticas sejam limitadas (YIN et al., 2020). O tratamento primário estabelecido para pacientes com CMTN é a quimioterapia, tanto nos estágios iniciais como avançado da doença. O mau prognóstico dos pacientes e a falta de terapias específicas desenvolveram interesse na busca por alvos moleculares, que poderiam ser utilizados (BIANCHINI et al., 2016).

Adicionalmente, com o desenvolvimento atual de terapias antitumorais experimentais almejando a modulação de componentes do microambiente tumoral e do sistema imunológico, reforça-se a importância de produzir um conhecimento mais aprofundado quanto a relação dos diversos componentes da inflamação/imunidade com a carcinogênese e progressão tumoral no câncer de mama triplo negativo, um subtipo tumoral que apresenta mau prognóstico (CRUSZ et al., 2015).

A busca por biomarcadores que possam direcionar ou prever o prognóstico do paciente com CMTN são relevantes. Assim, estudos sobre a proteína HMGB1 em diversos tumores tem mostrado resultados interessantes, alguns com potencial de inovação propondo terapias a base de inibidores de HMGB1. Wang e colaboradores mostraram que o aumento da expressão de HMGB1 em CMTN está positivamente relacionado com desenvolvimento de metástase a distância neste tipo de câncer (WANG et al., 2020).

Assim como o HMGB1 a IL-33 é uma alarmina cuja atividade vai além do seu potencial de induzir a resposta imune, mas tem demonstrado também sua potência na inflamação crônica e ativação de malignidades (SHEN; LIU; ZHANG, 2018). Neste contexto, a proteína HMGB1 e IL-33 surgem como potenciais marcadores para metástases em CMTN, com possibilidade de se tornarem novos alvos para prevenção e uso em terapias futuras.

## **3.OBJETIVOS**

### **3.1 Geral**

Avaliar a expressão das proteínas HMGB1 e IL-33 em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN) correlacionando com o prognóstico da doença.

### **3.2 Específicos**

- Descrever os dados clínicos-patológicos das pacientes incluídas no estudo;
- Avaliar de forma semi-quantitativa a intensidade de expressão, assim como o percentual da expressão citoplasmática e nuclear de HMGB1 e expressão de IL-33 em amostras de biopsias de pacientes com CMTN;
- Associar a expressão de HMGB1 e IL-33 com parâmetros clínicos de agressividade tumoral como tamanho do tumor, presença de metástase e recidiva;
- Associar a expressão de HMGB1 com a sobrevida global dos pacientes.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional, longitudinal.

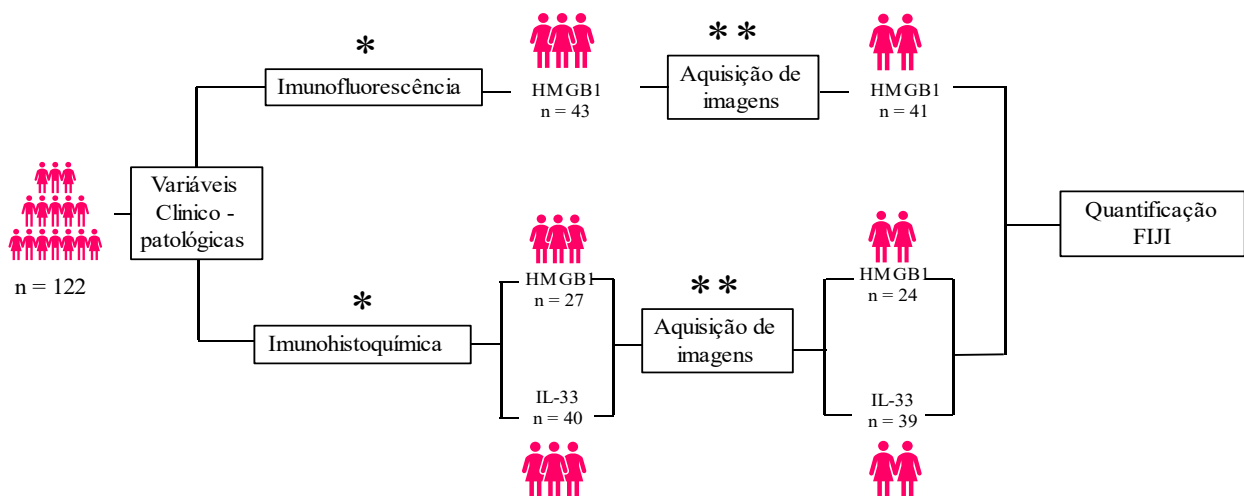
### 4.2 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo CEP - Comitê de Ética em Pesquisa - do Hospital Haroldo Juaçaba/ Instituto do Câncer do Ceará (Número CAAE: 18946313.3.0000.5528, versão 4). Os pacientes incluídos foram mantidos e garantidos o sigilo das informações e identidades. Este estudo realizou-se de acordo com os padrões de aconselhamento de pesquisas em seres humanos, seguindo as recomendações de Boas Práticas Clínicas (BPC).

### 4.3 População e amostra

A população estudada foi de pacientes com diagnóstico de Câncer de Mama Triplo Negativo. Foram incluídos no estudo 122 pacientes com CMTN atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará durante os anos de 2011 a 2020.

**Figura 3.** Fluxograma da coleta de amostras e delineamento experimental



\* Foram excluídas as amostras que não possuíam material fixado em lâmina

\*\* Foram excluídas as amostras com material insuficiente, tecido não cancerígeno ou outro tipo de tecido



## **4.4 Elegibilidade**

### **4.4.1 Critérios de inclusão**

Pacientes com diagnóstico de câncer de mama triplo negativo (CMTN):

- Com dados clínicos no prontuário com informações suficientes para o adequado preenchimento da ficha de coleta de dados;

### **4.4.2 Critérios de exclusão**

- Com amostras sem material suficiente, dimensões inadequadas e fixadas de modo inadequado;
- Sem estudo prévio imunohistoquímico de Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2. C-erbB2 (HER2/neu).

## **4.5 Variáveis do estudo:**

As variáveis estudadas foram: idade, estadiamento, tipo de tratamento realizado (cirúrgico, radioterápico, quimioterápico), acometimento de metástase, recidiva e sobrevida global.

## **4.6 Montagem do Tissue Microarray (TMA)**

Os blocos de parafina contendo excisões cirúrgicas de CMTN proveniente do setor de patologia do Instituto do Câncer do Ceará, e suas respectivas lâminas, foram analisadas para marcação de duas áreas contendo os maiores percentuais de células tumorais pelo patologista. A agulha de 2 mm (Quick Ray, UNITMA®) foi inserida na área previamente selecionada do bloco doador para retirada do tecido. Em seguida, realizou-se a transferência para o bloco

receptor de 60 poços organizados da seguinte sequência: 4 casos de controles positivos nos vértices, compostos por fígado, pulmão, placenta e pele; adicionados de 28 casos, em duplicata, de câncer de mama triplo negativo. Os controles positivos foram utilizados como forma de garantir a especificidade dos marcadores utilizados no ensaio. Em conclusão, obtivemos a confecção de 2 blocos de TMA contendo as amostras incluídas na pesquisa.

#### **4.7 Avaliação da expressão de HMGB1 por imunofluorescência**

Foi realizada a microtomia com cortes histológicos de 2  $\mu\text{m}$  de espessura em lâminas silanizadas do bloco de TMA previamente construído. A imunofluorescência foi iniciada pela desparafinização, e posterior permeabilização com Triton X-100 0,2% em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As lâminas foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-HMGB1 mouse (diluição 1:200) durante 12 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com um anticorpo secundário conjugado alexa rabbit 633 anti-mouse durante 45 minutos à temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram visualizadas usando microscópio de imunofluorescência (Cytation, Biotec da Central Multiusuários do NPDM). Em seguida, foi realizada a quantificação citoplasmática da expressão por imunofluorescência para HMGB1, utilizando o software FIJI, versão 1.53.

#### **4.8 Imunoistoquímica para HMGB1 e IL-33**

Foi realizada a microtomia com cortes histológicos de 2  $\mu\text{m}$  de espessura em lâminas silanizadas. A imunoistoquímica foi efetuada através da técnica de EnVision automatizado da Dako (Livre de biotina) com recuperação antigênica pelo calor. Foram usados anticorpos monoclonais primários para as proteínas HMGB1 (Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Clone GT348, Massachusetts, Estados Unidos) e IL-33 (Invitrogen/Thermo Fischer Scientific, Massachusetts,

Estados Unidos). Foi utilizada o sistema de detecção universal de alta sensibilidade, incluindo bloqueador pré-diluído, anticorpo secundário Dako Envision + Dual Link System – HRP (Agilent Dako, California, Estados Unidos) além do tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Agilent Dako, California, Estados Unidos) como cromógeno. Foram utilizados controles positivos (pele) e negativos da reação. As lâminas foram visualizadas usando o microscópio optico (NIKON, Modelo Eclipse EI).

#### **4.9 Análise por Escore**

A coloração por imunohistoquímica foi avaliada por profissional patologista, que categorizou por escore as amostras baseadas na intensidade de expressão de HMGB1 e IL-33, sendo classificadas em quatro categorias: 0 = ausência de imunoreatividade ou raras células marcadas (< 5%); 1 = coloração discreta (>5% de células coradas) ou células moderadamente coradas; 2 = coloração moderada (>50% de células coradas) ou menos de 50% das células intensamente coradas e 3 = coloração intensa (>50%) das células coradas. A classificação por escores foi adaptada a partir da publicação de Buskens et al, 2003 (BUSKENS et al, 2003).

#### **4.10 Análise estatística**

A análise estatística, realizada com o software SPSS versão 23.0 e GraphPad Prism®, versão 8.01. As análises de associação foram realizadas utilizando o teste de Qui-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher. Para análises de sobrevida foram realizados o teste de Log Rank Mantel x nas curvas de sobrevida de Kaplan Meier. Os resultados foram expressos como mediana (mínimo-máximo) para categorizar alta e baixa expressão, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5.RESULTADOS

### *5.1 Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo*

Conforme ilustrado na **Tabela 2**, dos 122 pacientes que fizeram parte do estudo 96 (79%) possuíam idade igual ou superior a 40 anos e 26 (21%) possuíam idade inferior a 40 anos. Em relação aos dados patológicos, foram analisados a presença ou ausência de invasão linfovascular, o tipo histológico do tumor e o seu grau histológico, sendo excluídos do universo amostral dessa análise em particular os pacientes cujos dados não foram encontrados. A invasão linfática estava presente em 35% (36) dos pacientes analisados. Em relação ao grau histológico do tumor, na amostra analisada, predominaram tumores grau III, presentes em cerca de 61 % (67) dos pacientes. Foram mais prevalentes também na amostra estudadas as neoplasias malignas ductais, representando 85% (104) dos pacientes. Dentre os participantes, 36 (36%) apresentaram tumor primário de classificação T3, o que representa um tumor maior que 5cm de acordo com a classificação TMN. 46 (45%) não apresentaram metástase em linfonodos regionais; 99 (98%) não apresentaram metástase a distância.

Em relação à modalidade terapêutica adotada, percebeu-se uma nítida presença da quimioterapia neoadjuvante. Dentre os pacientes 64 (53%) não realizaram quimioterapia neoadjuvante e 68 (57%) realizaram tratamento quimioterápico adjuvante, ou seja, após a cirurgia. No grupo de pacientes que realizaram quimioterapia neoadjuvante 46% (18) apresentaram resposta completa e 36% (14) apresentaram resposta parcial. Dentre todos os pacientes 74% (83) não apresentaram recidiva local do tumor (**Tabela 2**).

**Tabela 2 – Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo**

<b>Variáveis analisadas</b>	<b>Número de pacientes (%)</b> <b>n: 122</b>
<b>Idade (anos)</b>	
< 40	26 (21%)
≥ 40	96 (79%)
<b>Histórico familiar</b>	
Sim	62 (54%)
Não	52 (46%)
<b>Tipo histológico</b>	
Ductal	104 (85%)
Outros	18 (15%)
<b>Grau histológico</b>	
I	4 (4%)
II	38 (35%)
III	67 (61%)
<b>Tumor primário</b>	
T0	0 (0%)
T1	12 (12%)
T2	32 (32%)
T3 e T4	57 (56%)
<b>Linfonodo</b>	
N0	46 (45%)
N1	28 (27%)
N2	26 (26%)
N3	2 (2%)
<b>Metastase</b>	
M0	99 (98%)
M1	2 (2%)
<b>Invasão Linfovascular</b>	
Ausente	67 (65%)
Presente	36 (35%)
<b>Quimioterapia Neoadjuvante</b>	
Não	64 (53%)
Sim	56 (47%)
<b>Quimioterapia Adjuvante</b>	
Sim	68 (57%)
Não	51 (43%)
<b>Resposta a Quimioterapia Neoadjuvante</b>	
Progressão da doença	7 (18%)
Resposta parcial	14 (36%)
Resposta completa	18 (46%)
<b>Recidiva do Tumor</b>	
Não	83 (74%)
Sim	30 (26%)

**Classificação TNM:** T0, não há evidência de tumor primário; T1, tumor ≤ 2cm; T2 tumor >2cm e <5cm; T3, tumor >5cm; T4, tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou a pele. N0, ausência de metástase em linfonodos regionais; N1, metástase em linfonos axilares homolaterais móveis; N2, metástase em linfonodos axilares homolaterais fixos ou metástase clinicamente aparente; N3, metástase em linfonodos intraclaviculares homolaterais com ou sem linfonos axilares. M0, ausência de metástase a distância; M1, metástase a distância.

### ***5.2 Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo segundo a intensidade de expressão do HMGB1.***

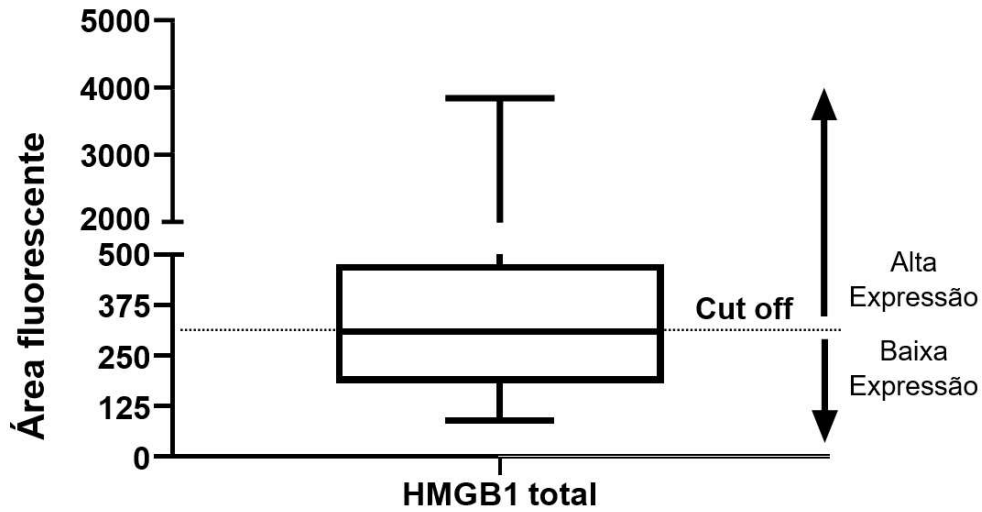
Na **figura 3** está representado a área fluorescente em  $\mu\text{m}^2$  indicando a positividade para a expressão de HMGB1 (intervalo de 100 – 4000) realizado pela imunofluorescência em 41 amostras contidas no TMA. O ponto de corte usado foi a mediana ( $309 \mu\text{m}^2$ ) para classificar a expressão de HMGB1 como alta ou baixa foi escolhido.

De acordo com os dados da **Tabela 3**, não houve associação entre as variáveis clínico-patológicas avaliadas (histórico familiar, faixa etária, invasão linfovascular, grau histológico, estadiamento clínico e metástase) com a intensidade de expressão de HMGB1 ( $p>0,05$ ).

A associação entre a expressão de HMGB1 e as variáveis de tratamento (**Tabela 4**) evidenciaram que 67% dos pacientes que realizaram quimioterapia adjuvante tinham baixa expressão de HMGB1 de forma significativa ( $P=0,024$ ) quando comparado com os de alta expressão de HMGB1 (33% dos pacientes). As outras variáveis não apresentaram significância estatística ( $P> 0,05$ ).

A taxa de sobrevida global corresponde ao percentual de pacientes que ainda estão vivos em um determinado período após o diagnóstico ou início de tratamento da doença. A sobrevida global em pacientes com alta expressão de HMGB1 foi de 4,72 anos e para pacientes com baixa expressão de HMGB1 este valor não foi determinado. A análise estatística evidenciou que não houve significância estatística na sobrevida geral segundo a intensidade de expressão do HMGB1 ( $p>0,05$ ) (**Figura 4**).

**Figura 4.** Determinação do Cut off da quantificação pela intensidade de expressão de HMGB1 nuclear e citoplasmática, em biopsias de câncer de mama triplo negativo.



A intensidade de área fluorescente é representada para cada caso de câncer. A linha pontilhada indica a fluorescência de HMGB1 detectada nas amostras analisadas. O ponto de corte usado foi a mediana ( $309 \mu\text{m}^2$ ). HMGB1: High Mobility Group Box 1; Cut-off: Ponte de coorte.

**Tabela 3:** Associação entre a expressão de HMGB1 e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

	Baixa expressão	Alta expressão	p*
<b><i>Histórico Familiar</i></b>			
Sim	13 (60%)	6 (50%)	0,724
Não	9 (40%)	6 (50%)	
<b><i>Faixa etária</i></b>			
>40	13(81%)	18 (78%)	0,999
<40	3 (19%)	5 (22%)	
<b><i>Invasão Linfovascular</i></b>			
Presente	7 (39%)	4 (36%)	0,999
Ausente	11 (61%)	7 (64%)	
<b><i>Grau histológico</i></b>			
Bem diferenciado	0 (0,0%)	2 (22%)	0,999
Moderadamente	4 (20%)	1 (11%)	
Indiferenciado	16 (80%)	6 (67%)	
<b><i>Estadiamento clínico</i></b>			
I	3 (17%)	1 (13%)	0,641
II - III	15 (83%)	7 (87%)	
<b><i>T</i></b>			
T1-T2	10 (56%)	3 (38%)	0,672
T3-T4	8 (44%)	5 (62%)	
<b><i>N</i></b>			
N0-N1	14 (78%)	5 (62%)	0,635
N2-N3	4 (22%)	3 (38%)	
<b><i>Metástase</i></b>			
M0	16 (89%)	7 (87%)	0,999
M1	2 (11%)	1 (13%)	

Para a análise comparativa das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui Quadrado de Pearson, exceto nos casos em que os valores de frequência esperada foram < 5, nos quais o teste exato de Fisher foi adotado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

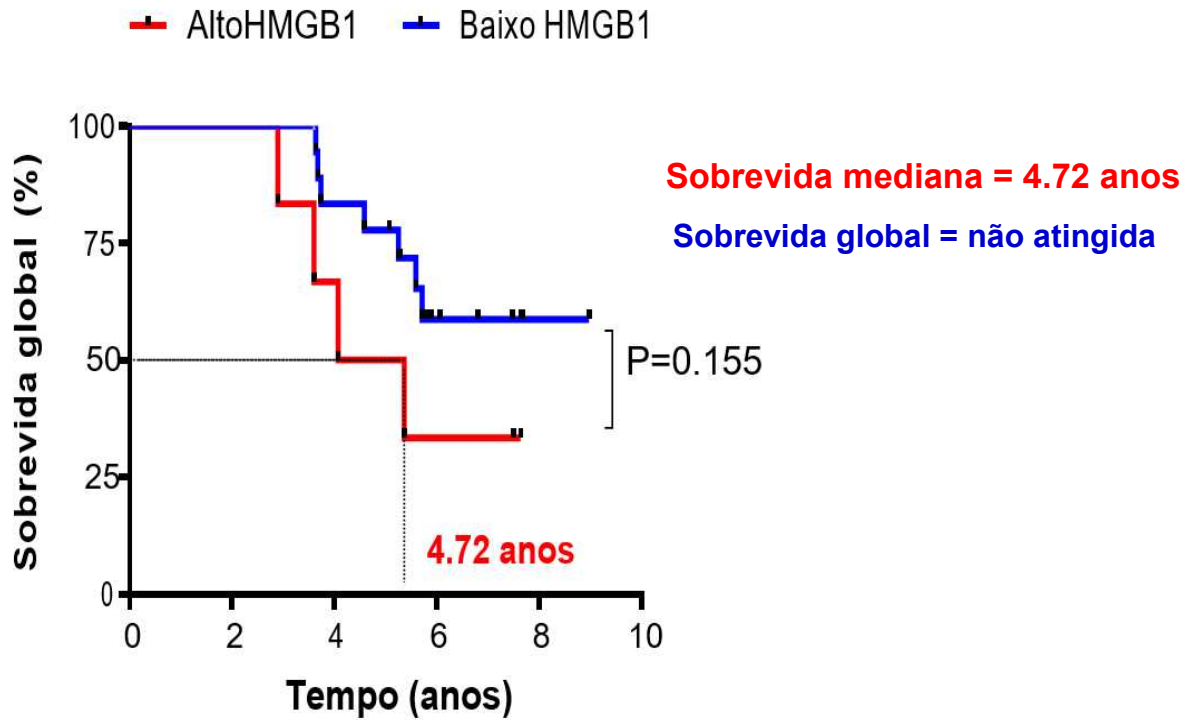


**Tabela 4:** Associação entre a expressão de HMGB1 e as variáveis de tratamento e recidiva em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

Variável	HMGB1 (área fluorescente)		Significância p*
	Baixa expressão	Alta expressão	
<b><i>QT neoadjuvante</i></b>			
Sim	7 (33%)	5 (42%)	0,716
Não	14 (67%)	7 (58%)	
<b><i>Resposta a QT neo</i></b>			
DE/RC/RP	5 (83%)	4 (80%)	0,999
Progressão	1 (17%)	1 (20%)	
<b><i>QT adjuvante</i></b>			
Sim	16 (100%)	8 (67%)	<b>*0,024</b>
Não	0 (0,0%)	4 (33%)	
<b><i>Radioterapia</i></b>			
Sim	17 (81%)	10 (83%)	0,999
Não	4 (19%)	2 (17%)	
<b><i>Tipo de cirurgia</i></b>			
Quadrantectomia	11 (50%)	3 (25%)	0,274
Mastectomia	11 (50%)	9 (75%)	
<b><i>Recidiva</i></b>			
Sim	4 (19%)	5 (45%)	0,213
Não	17 (81%)	6 (55%)	

Para a análise comparativa das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui Quadrado de Pearson, exceto nos casos em que os valores de frequência esperada foram  $< 5$ , nos quais o teste exato de Fisher foi adotado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. DE: Doença estável, RC: Resposta completa. RP: Resposta parcial. \* $p < 0,05$  - Teste Exato de Fisher

**Figura 5:** Sobrevida mediana estratificada pela intensidade de expressão de HMGB1 em pacientes com câncer de mama Triplo Negativo.



A análise de Kaplan-Meier mostra que não há diferença na sobrevida mediana de cinco anos nos subgrupos de câncer de mama triplo-negativo de pacientes que apresentam expressão de HMGB1 alta ou baixa. O valor P foi obtido pelo teste de log-rank das curvas de Kaplan-Meier. IC = intervalo de confiança; HR = razão de risco.

**5.2 Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo segundo a localização da expressão do HMGB1 (citoplasmática).**

Os resultados apresentados na **Tabela 5** mostraram que não houve associação ( $P > 0,05$ ) entre a expressão de HMGB1 citoplasmática e as variáveis clínico-patológicas (histórico familiar, invasão linfovascular, grau histológico, estadiamento clínico e metástase) nos pacientes com CMTN.

Por outro lado, a associação entre a expressão de HMGB1 citoplasmática e as variáveis de tratamento e recidiva (**Tabela 6**) indicaram que entre os pacientes que apresentam recidiva, 77,8% apresentam baixa expressão de HMGB1 citoplasmática e 22,2% apresentam alta expressão de HMGB1 citoplasmática ( $P = 0,046$ ).

A análise da sobrevida global estratificada pela expressão de HMGB1 citoplasmática (**Figura 5**) mostrou que não há diferença na sobrevida global de pacientes que apresentaram alta ou baixa expressão de HMGB1 citoplasmática ( $p = 0,155$ ). A sobrevida mediana de pacientes com baixa expressão de HMGB1 citoplasmática foi de 4,76 anos, o mesmo parâmetro não foi calculado para pacientes com alta expressão.

**Tabela 5:** Associação entre a expressão de HMGB1 citoplasmática e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

Variável	HMGB1 (citoplasmática)		Significância p*
	Baixa expressão	Alta expressão	
<b><i>Histórico Familiar</i></b>			
Sim	10 (67%)	10 (50%)	0,491
Não	5 (33%)	10 (50%)	
<b><i>Faixa etária</i></b>			
>40	15 (71%)	21 (91%)	0,125
<40	6 (29%)	2 (9%)	
<b><i>Invasão Linfovascular</i></b>			
Presente	3 (27%)	8 (42%)	0,466
Ausente	8 (73%)	11 (58%)	
<b><i>Grau histológico</i></b>			
Bem diferenciado	1 (7%)	1 (5%)	0,957
Moderadamente	3 (21%)	4 (20%)	
Indiferenciado	10 (72%)	15 (75%)	
<b><i>Estadiamento clínico</i></b>			
I	3 (21%)	1 (7%)	0,595
II - III	11 (79%)	13 (93%)	
<b><i>T</i></b>			
T1-T2	6 (46%)	7 (54%)	0,999
T3-T4	7 (54%)	6 (46%)	
<b><i>N</i></b>			
N0-N1	8 (62%)	11 (85%)	0,378
N2-N3	5 (38%)	2 (15%)	
<b><i>Metástase</i></b>			
M0	10 (77%)	13 (100%)	0,220
M1	3 (23%)	0 (0,0%)	

Para a análise comparativa das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui Quadrado de Pearson, exceto nos casos em que os valores de frequência esperada foram  $< 5$ , nos quais o teste exato de Fisher foi adotado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

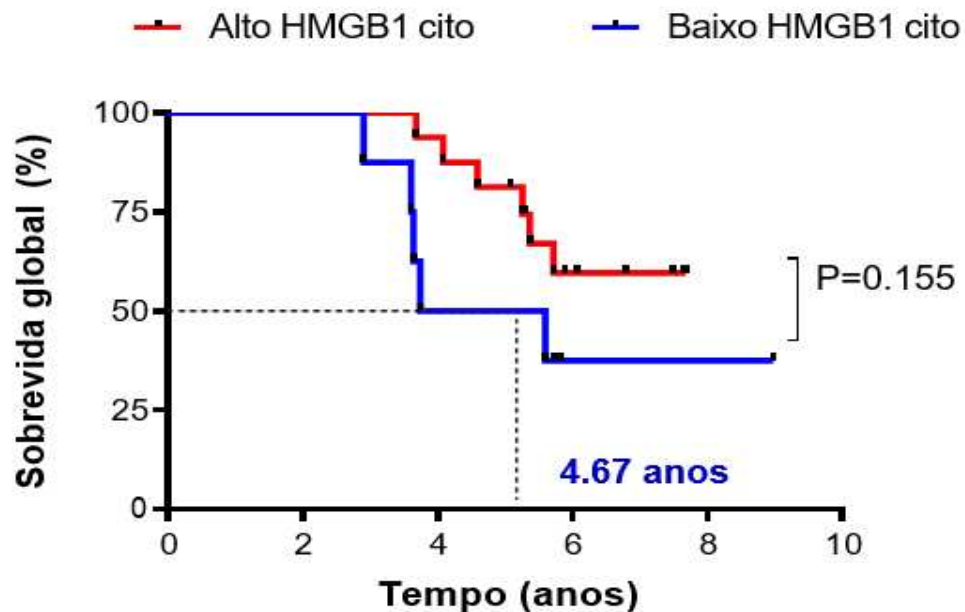
**Tabela 6:** Associação entre a expressão de HMGB1 citoplasmática (cHMGB1) e as variáveis de tratamento e recidiva em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

Variável	cHMGB1		Significância p*
	Baixa expressão	Alta expressão	
<b><i>QT neoadjuvante</i></b>			
Sim	7 (50%)	5 (25%)	0,163
Não	7 (50%)	15 (75%)	
<b><i>Resposta a QT neo</i></b>			
DE/RC/RP	6 (100%)	3 (60%)	0,181
Progressão	0 (0,0%)	2 (40%)	
<b><i>QT adjuvante</i></b>			
Sim	11 (73%)	14 (70%)	0,999
Não	4 (27%)	6 (30%)	
<b><i>Radioterapia</i></b>			
Sim	13 (87%)	15 (79%)	0,672
Não	2 (13%)	4 (21%)	
<b><i>Tipo de cirurgia</i></b>			
Quadrantectomia	6 (40%)	8 (40%)	0,999
Mastectomia	9 (60%)	12 (60%)	
<b><i>Recidiva</i></b>			
Sim	7 (47%)	2 (11%)	<b>*0,046</b>
Não	8 (53%)	16 (89%)	

DE: Doença estável, RC: Resposta completa. RP: Resposta parcial.

\* p<0,05 - Teste Exato de Fisher.

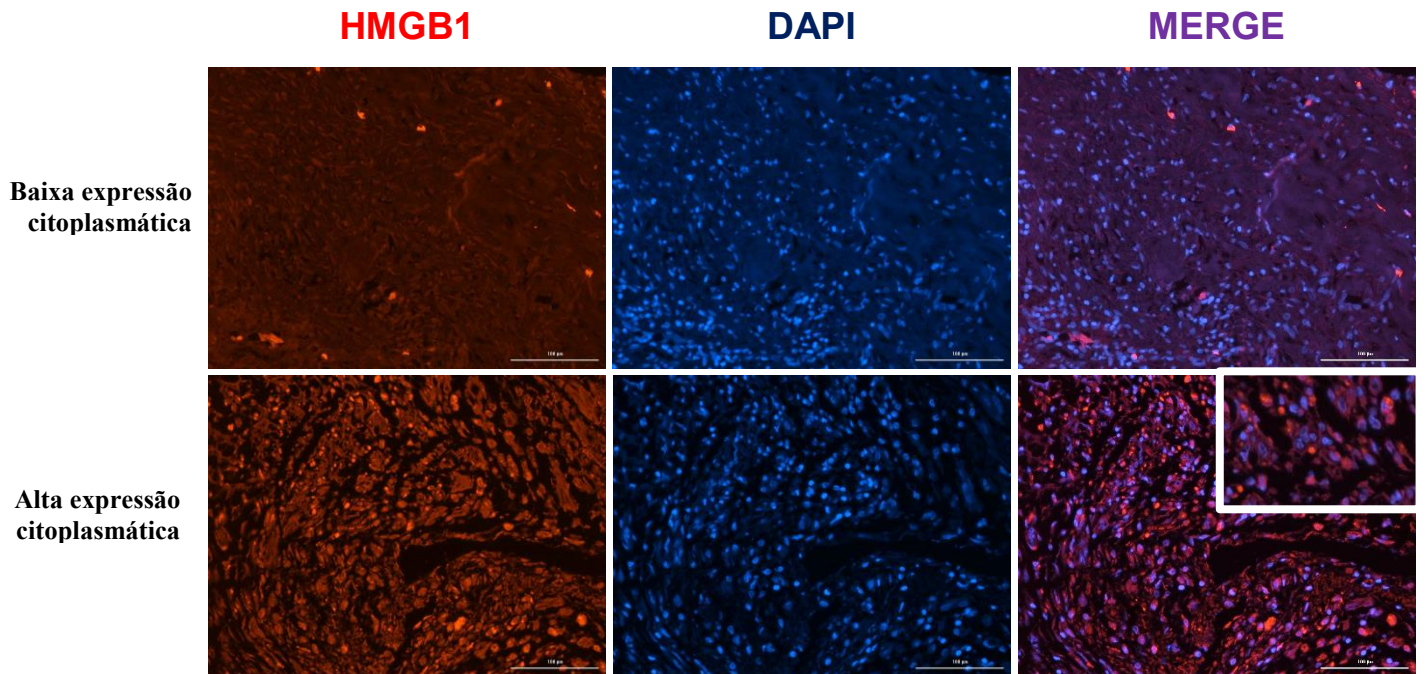
**Figura 6:** Sobrevida global estratificada pela expressão citoplasmática de HMGB1 em pacientes com câncer de mama Triplo Negativo.



HMGB1 citoplasmático	N	Sobrevida Mediana	P
Alto	16	-	0.155
Baixo	8	4.67	

A análise de Kaplan-Meier mostra que não há diferença na sobrevida global em pacientes com câncer de mama triplo-negativo que apresentam expressão citoplasmática alta e baixa de HMGB1. O valor P ( $p=0,155$ ) foi obtido pelo teste de log-rank das curvas de Kaplan-Meier.

**Figura 7:** Fotomicrografias da expressão citoplasmática de HMGB1 por imunofluorescência nos pacientes com câncer de mama triplo negativo.



Fotomicrografias representativas da expressão de HMGB1 por imunofluorescência na escala de 100 µm capturadas no microscópio de imunofluorescência CYTATION (Central multiusuários do NPDM). HMGB1: High Mobility Group Box 1  
DAPI: marcador de núcleo. MERGE: co-marcação do DAPI e HMGB1.

#### ***5.4 Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo segundo a expressão do HMGB1 pela imunohistoquímica.***

De acordo com os resultados obtidos entre a associação das variáveis clínico-patológicas (histórico familiar, faixa etária, invasão linfovascular, grau histológico, estadiamento clínico e metástase) e a avaliação por escores de HMGB1 dos pacientes com CMTN, não foram encontrados valores significativos ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 7**).

Pelos valores encontrados na **Tabela 8**, que avalia a associação entre as variáveis de tratamento e recidiva e os Escores de HMGB1, encontramos associação significativa ( $p = 0,037$ ) entre a quimioterapia neoadjuvante dos pacientes com CMTN e os valores de HMGB1. Dos pacientes que realizaram QT neoadjuvante 5 (100%) apresentaram valores escores de HMGB1 entre 1 -2. E dos pacientes que não realizaram quimioterapia neoadjuvante 11 (61,1%) apresentaram valores de escore 0 (zero) de HMGB1.



**Tabela 7:** Associação entre os escores de imunohistoquímica para HMGB1 e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

Variável	HMGB1 (escores IHQ)		Significância
	Escore 0	Escore 1 -2	p*
<b><i>Histórico Familiar</i></b>			
Sim	6 (55%)	6 (46%)	0,999
Não	5 (45%)	7 (54%)	
<b>Faixa etária</b>			
>40	12 (100%)	10 (83%)	0,478
<40	0 (0%)	2 (17%)	
<b><i>Invasão Linfovascular</i></b>			
Presente	6 (60%)	4 (33%)	0,33913
Ausente	4 (40%)	8 (67%)	
<b><i>Grau histológico</i></b>			
Bem diferenciado	0 (0%)	1 (8%)	0,590
Moderadamente	2 (17%)	2 (17%)	
Indiferenciado	10 (83%)	9 (75%)	
<b><i>Estadiamento clínico</i></b>			
I	4 (40%)	0 (0%)	0,086
II - III	6 (60%)	10 (100%)	
<b><i>T</i></b>			
T1-T2	7 (88%)	4 (44%)	0,131
T3-T4	1 (12%)	5 (56%)	
<b><i>N</i></b>			
N0-N1	7 (100%)	7 (78%)	0,475
N2-N3	0 (0%)	2 (22%)	
<b><i>Metástase</i></b>			
M0	8 (100%)	9 (100%)	0,999
M1	0 (0%)	0 (0%)	

Para a análise comparativa das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui Quadrado de Pearson, exceto nos casos em que os valores de frequência esperada foram  $< 5$ , nos quais o teste exato de Fisher foi adotado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**Tabela 8:** Associação entre a expressão de HMGB1 e as variáveis de tratamento e recidiva em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

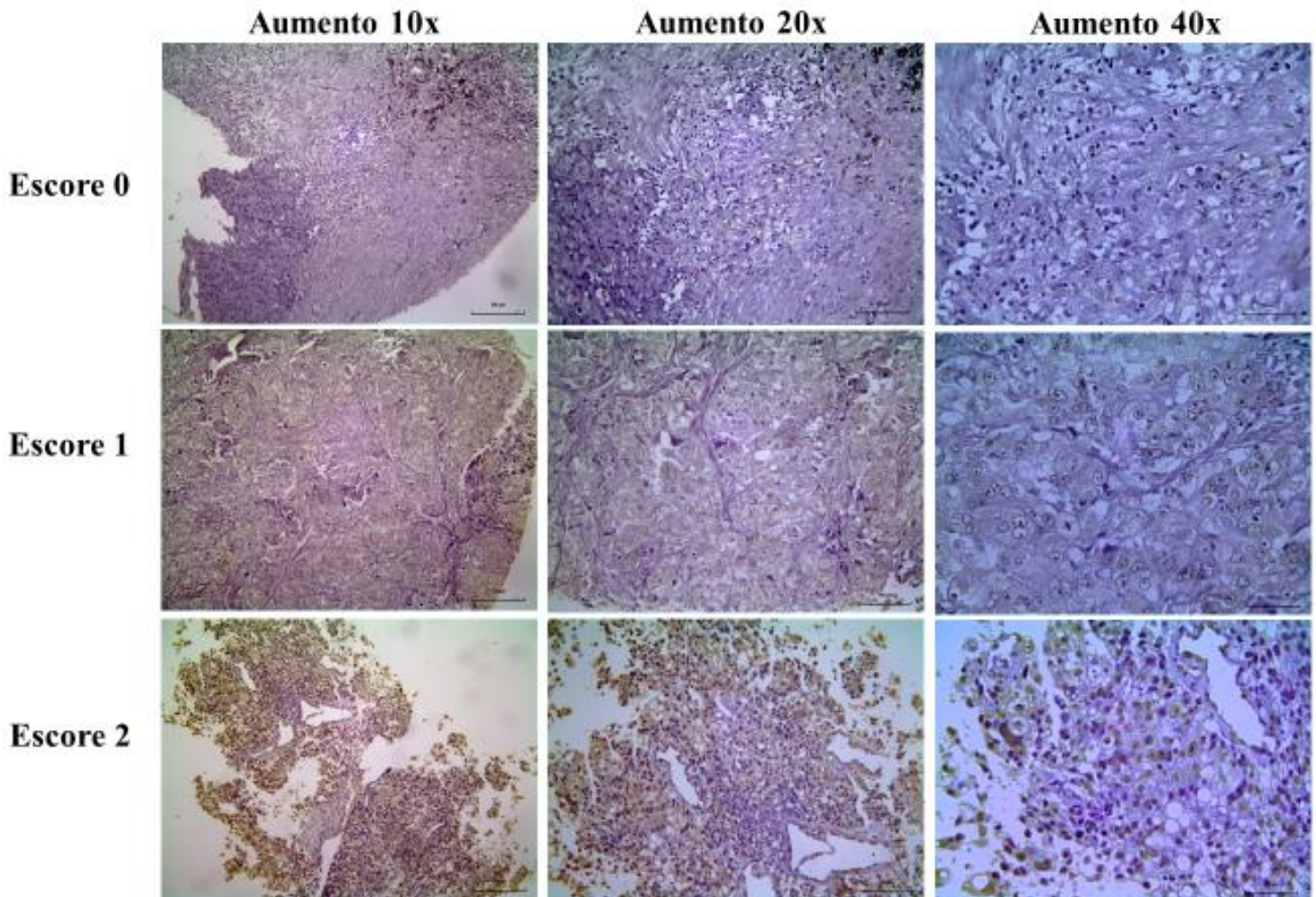
Variável	HMGB1 (escores IHQ)		Significância p*
	Escore 0	Escore 1-2	
<b><i>QT neoadjuvante</i></b>			
Sim	0 (0%)	5 (42%)	<b>0,037*</b>
Não	11 (100%)	7 (58%)	
<b><i>QT adjuvante</i></b>			
Sim	11 (92%)	8 (67%)	0,316
Não	1 (8%)	4 (33%)	
<b><i>Radioterapia</i></b>			
Sim	9 (82%)	11 (92%)	0,590
Não	2 (18%)	1 (8%)	
<b><i>Tipo de cirurgia</i></b>			
Quadrantectomia	6 (50%)	5 (42%)	0,999
Mastectomia	6 (50%)	7 (58%)	
<b><i>Recidiva</i></b>			
Sim	2 (17%)	5 (50%)	0,171
Não	10 (83%)	5 (50%)	

DE: Doença estável, RC: Resposta completa. RP: Resposta parcial.

\*p<0,05 - Teste Exato de Fisher.

Para a análise comparativa das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui Quadrado de Pearson, exceto nos casos em que os valores de frequência esperada foram < 5, nos quais o teste exato de Fisher foi adotado. O valor de p<0,05 foi considerado significativo.

**Figura 8:** Fotomicrografias da expressão de HMGB1 por imunohistoquímica nos pacientes através da análise de escores de intensidade de marcação.



Fotomicrografias representativas da expressão de HMGB1 por imunohistoquímica na escala de 100  $\mu$ m capturadas no microscópio óptico.

HMGB1: High Mobility Group Box 1.

### ***5.5 Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo segundo a expressão do IL-33 por imunohistoquímica.***

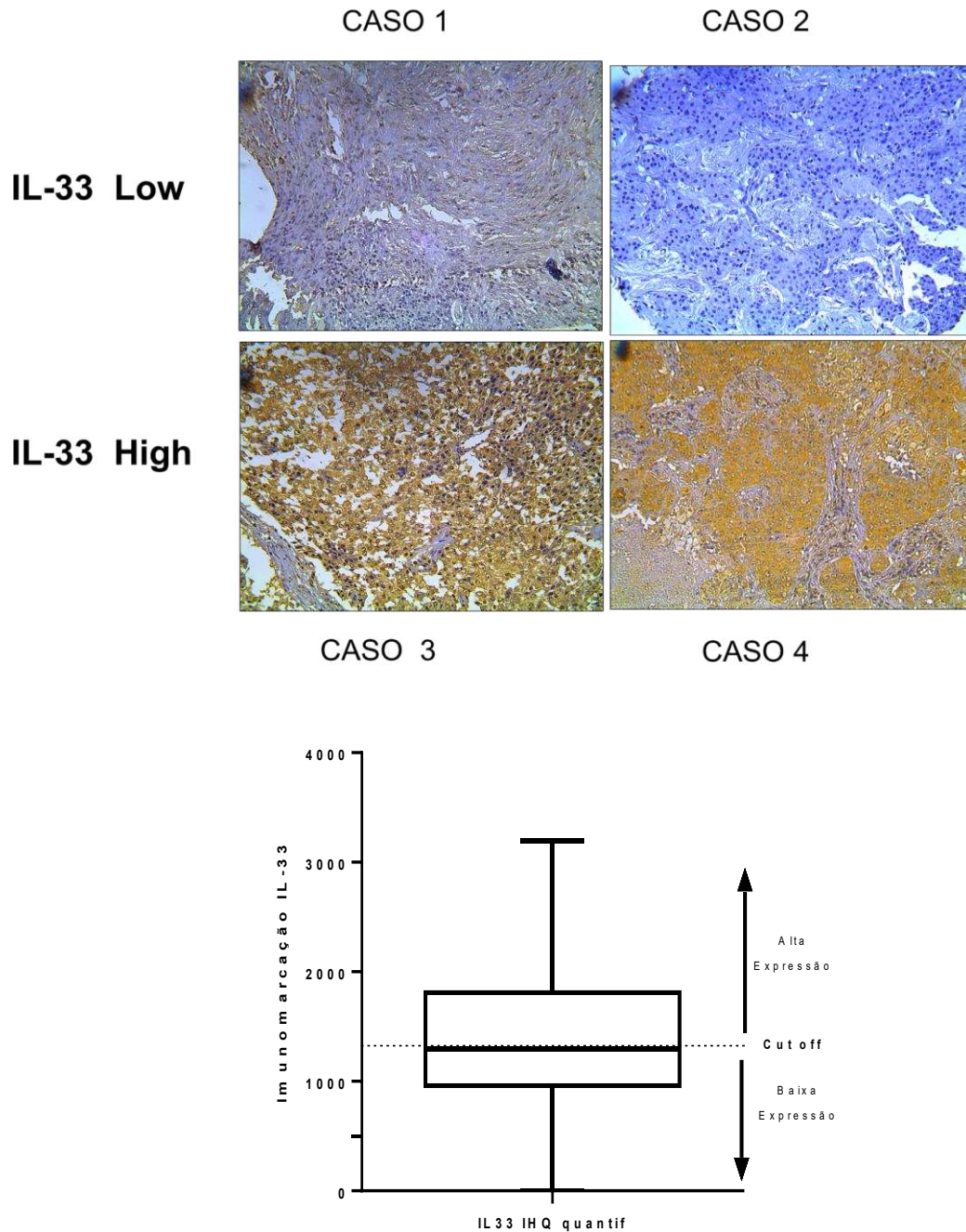
Foram analisadas as lâminas de TMA oriundos de 40 dos 122 pacientes incluídos na pesquisa, sendo processadas por imuno-histoquímica (IHQ) e quantificadas quanto à expressão da IL-33 a partir da contagem de células coradas pelo método. Foi calculada a mediana dos valores da quantificação e determinada como ponto de corte ou “cut-off”, sendo as amostras com valor de quantificação acima desse ponto agrupadas como “high” (grupo com maior expressão da IL-33) e as amostras com valor abaixo, agrupadas como “low” (grupo com menor expressão da IL-33), como ilustrado na **Figura 9**

De acordo com dados expressos na **Tabela 9**, a relação entre a expressão alta ou baixa de IL-33 e as variáveis de histórico familiar, invasão linfática e vascular, grau de diferenciação, estadiamento e metástase não apresentaram significância estatística.

Quando analisados a presença de invasão vascular e linfática a partir do exame anatomopatológico da peça cirúrgica, percebeu-se uma leve tendência de maior presença desses fatores no grupo de menor expressão da IL-33, sendo que cerca de 54 % dos pacientes que as apresentaram faziam parte do grupo low. Em relação ao estadiamento no momento do diagnóstico, observou-se uma pequena tendência na categoria de menor expressão da IL-33 de diagnósticos já em estágios mais avançados da doença, havendo uma exígua diferença quanto aos pacientes no estágio III nesse grupo. A avaliação comparativa entre a expressão de IL-33 High e Low e os dados de recidiva do tumor, não apresentou significância estatística ( $p > 0,05$ ), conforme a **Figura 10**.

Adicionalmente, o gráfico da sobrevida global versus a expressão de HMGB1 e IL-33, mostrou que não há relação significativa entre a sobrevida global e a expressão HMGB1 High/IL-33 High e HMGB1 Low/IL-33 Low ( $p = 0,83$ ), como mostrado na **Figura 11**.

**Figura 9.** Fotomicrografias da expressão de IL-33 na IHQ, demonstrando o grupo High e Low



A expressão da imunomarcção de IL-33 é representada para cada caso de câncer. A linha pontilhada indica o número de células marcadas nas amostras analisadas. O ponto de corte usado foi a mediana (1.297 células).

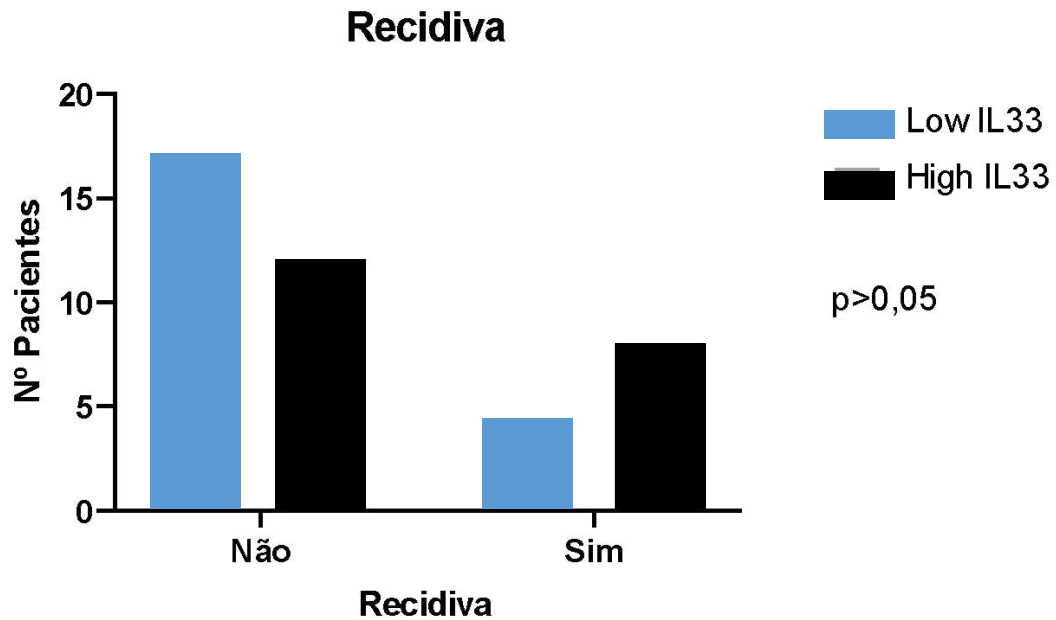
IL-33: interleucina-33; Cut-off: Ponte de coorte.

**Tabela 9:** Associação entre a expressão de IL-33 e as variáveis clínico-patológicas de pacientes com câncer de mama triplo negativo por imunohistoquímica.

Variável	IL-33 (expressão IHQ)		Significância p*
	Baixa expressão (0-1)	Alta expressão (2-3)	
<b><i>Histórico Familiar</i></b>			
Não	7 (33%)	7 (35%)	0,999
Sim	14 (67%)	13 (65%)	
<b><i>Invasão Linfática</i></b>			
Ausente	13 (68%)	11 (65%)	0,999
Presente	6 (32%)	6 (35%)	
<b><i>Invasão Vascular</i></b>			
Ausente	13 (65%)	11 (61%)	0,999
Presente	7 (35%)	7 (39%)	
<b><i>Grau diferenciação</i></b>			
Bem diferenciado	0 (0,0%)	1 (6%)	0,053
Moderadamente	6 (40%)	1 (6%)	
Indiferenciado	9 (60%)	14 (88%)	
<b><i>Estadiamento clínico</i></b>			
I	3 (18%)	3 (18%)	0,930
II	7 (41%)	8 (47%)	
III	7 (41%)	6 (35%)	
<b><i>T</i></b>			
pT1	6 (33%)	5 (26%)	0,737
pT2	10 (56%)	10 (53%)	
pT3	2 (11%)	3 (16%)	
pT4	0 (0%)	1 (5%)	
<b><i>N</i></b>			
pN0	10 (50%)	15 (75%)	0,217
pN1	5 (25%)	4 (20%)	
pN2	3 (15%)	0 (0%)	
pN3	2 (10%)	1 (5%)	
<b><i>Metástase</i></b>			
M0	15 (100%)	15 (94%)	0,999
M1	0 (0%)	1 (6%)	

Para a análise comparativa das variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui Quadrado de Pearson, exceto nos casos em que os valores de frequência esperada foram  $< 5$ , nos quais o teste exato de Fisher foi adotado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

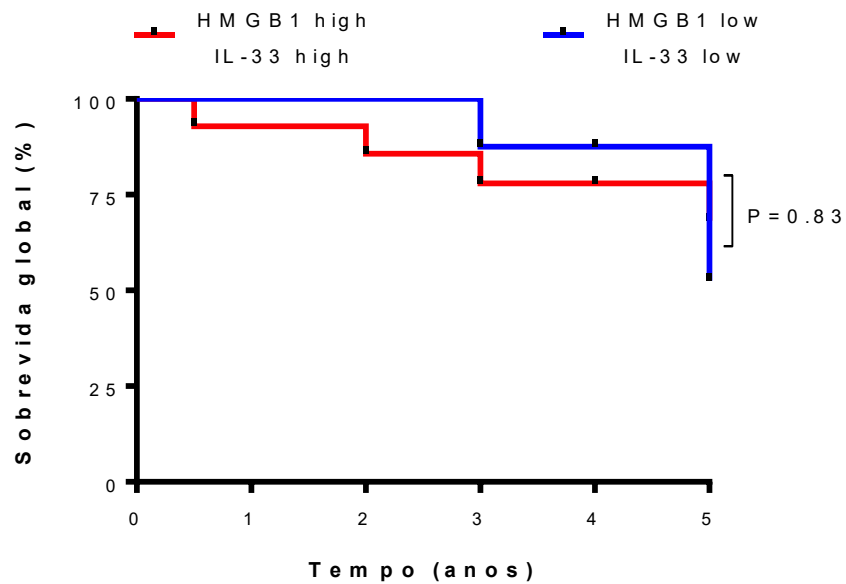
**Figura 10.** Gráfico comparativo entre os pacientes que apresentaram recidiva da doença estratificados entre IL-33 High e IL-33 Low



Para a análise comparativa da recidiva utilizou-se o teste Qui Quadrado de Pearson. O valor de  $p > 0,05$  foi considerado não significativo

Dos pacientes analisados, aqueles que não apresentaram recidiva 18 (44%) tiveram expressão Low IL-33 e 11 (27%) expressão High IL-33. Dentre os que apresentaram recidiva, 4 (10%) tiveram expressão Low IL-33 e 8 (19%) expressão High IL-33.

**Figura 11.** Sobrevida global estratificada pela expressão High e Low de HMGB1 e 1 IL-33 em pacientes com Câncer De mama Triplo Negativo



HMGB1 IL-33	N	Sobrevida em 5 anos (%)	P
Duplo positivo	14	60,0	0.83
Duplo negativo	9	40,0	

A análise de Kaplan-Meier mostra que não há diferença na sobrevida global estratificada em pacientes com câncer de mama triplo-negativo que apresentaram expressão HMGB1 e IL-33 high e HMGB1 e IL-33 low. O valor P ( $p=0,83$ ) foi obtido pelo teste de log-rank das curvas de Kaplan-Meier



## 6. DISCUSSÃO

Alarminas, ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), são elementos críticos da resposta imunológica ao sofrimento tecidual. Em muitas condições inflamatórias, as alarminas são liberadas no meio extracelular e se ligam a receptores específicos para estimular a ativação de células imunológicas inatas, diferenciação celular, morte celular e secreção de mediadores inflamatórios (BOTEANU et al., 2017). No presente trabalho, avaliamos duas alarminas, o HMGB1 (High Mobility Group Box 1) e a IL-33 (Interleucina-33), conhecidas como biomarcadores de prognóstico em pacientes com CTNM.

Cerca de 6% das pacientes diagnosticadas com câncer de mama são mulheres jovens e embora represente uma proporção pequena, isso não diminui seu impacto na saúde pública. O câncer de mama em mulheres jovens (<40 anos) é diferente do câncer de mama em mulheres com mais de 40 anos, tendo como características receptor de estrogênio negativo, posição multicêntrica, maior grau histológico, tumores triplo negativos e Ki-67 elevado (ERIC et al., 2018). Dos pacientes incluídos no presente estudo, 21% foi de mulheres jovens. Esse perfil nos permitiu avaliar com maior acurácia os dois perfis populacionais relativamente à expressão dos marcadores em estudo. Contudo, não se observou diferença destes marcadores em relação à idade das pacientes.

Por outro lado, a expressão de HMGB1 citoplasmática baixa apresenta associação significativa com a recidiva dos pacientes com câncer de mama triplo negativo. Adicionalmente, outra alarmina, como a Il-33, apresentou resultados importantes evidenciando o papel de biomarcador como preditores do prognóstico nesses pacientes.

O HMGB1 é altamente secretado por células de câncer de mama triplo negativo e sua imunorreatividade citoplasmática está associada tanto à infiltração de células T (Treg) reguladoras no estroma tumoral quanto ao mau prognóstico (HUBERT et al., 2021). No

presente estudo, foi evidenciada uma associação significativa entre a expressão de HMGB1 e recidiva dos pacientes, onde a baixa expressão citoplasmática desta alarmina se associou com o aumento de recidiva da doença. Contudo, o papel do HMGB1 parece controverso (HUBERT et al., 2021; SUN et al.; 2015). Um estudo avaliou pacientes com câncer de mama basal-símile, os quais, ao exibirem uma expressão citoplasmática de HMGB1 em 0%-10% ou >10% de células tumorais, apresentaram uma pior sobrevida livre de doença (HUBERT et al., 2021). Esse mesmo estudo, demonstrou que a neutralização de HMGB1 em modelos murinos gera um aumento da eficácia da imunoterapia anti-PD1 (HUBERT et al., 2021). Outro estudo comparou pacientes com câncer de mama versus lesões benignas da mama versus tecidos adjacentes tumorais quanto aos níveis séricos de HMGB1. De forma interessante, o grupo câncer apresentou HMGB1 sérico significativamente elevado (SUN et al, 2015) . A presença sérica do marcados indica uma liberação a partir de fontes de lesão celular, como em tumores, sugerindo seu envolvimento no desenvolvimento e progressão do câncer de mama. É lícito salientar que nosso estudo avaliou exclusivamente amostras tumorais de pacientes com CTNM. Assim, possivelmente, a contribuição do HMGB1 na patogênese do câncer de mama pode diferir quando se observam tumores de tipos moleculares diferentes.

Esse perfil de expressão citoplasmática de HMGB1 não é, contudo, específico em câncer de mama. A coloração imunohistoquímica em carcinoma ovariano, por exemplo, apresenta-se como positiva para a proteína HMGB1 identificada principalmente no citoplasma (LI; WEI, 2018). As taxas de expressão positiva de HMGB1 em carcinoma ovariano e tecidos normais paracarcinoma foram 61,67% (37/60) e 13,33% (8/60), respectivamente (LI; WEI, 2018). Portanto, a identificação do HMGB1 apresenta-se com um potencial prognóstico, somente, e não diagnóstico.

O tratamento do câncer engloba vários pilares desde a cirurgia, passando pela radioterapia, quimioterapia, terapia alvo dirigida e mais recentemente a imunoterapia. Vale

destacar que o tratamento à base de antineoplásicos quimioterápicos trouxe um ganho no controle sistêmico da doença, aumentando a sobrevida livre de doença e a sobrevida global dos pacientes com câncer de mama (TESHOME; HUNT, 2014). Devido à ausência de receptores hormonais e expressão de HER2, o CMTN é normalmente caracterizado como de mau prognóstico (PRAT et al, 2014). Comparando o CMTN com outros subtipos de câncer de mama, tanto a sobrevida global quanto a livre de doença são substancialmente menores, apresentando uma taxa de mortalidade de 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico (DENT et al., 2007). Ao analisarmos os 122 pacientes com CMTN incluídos no nosso estudo, foi verificado que 46% e 36% dos pacientes apresentaram resposta completa e parcial à quimioterapia neoadjuvante, respectivamente. Adicionalmente, nossos achados evidenciaram que os escores de imunomarcção de HMGB1 por imuno-histoquímica foi maior no grupo que receberam a quimioterapia neoadjuvante. Provavelmente, a quimioterapia atua, ao gerar um estresse sobre as células tumorais, como um potencializador da expressão deste DAMP. Quando da análise pormenorizada da localização nos compartimentos celulares por imunofluorescência, percebeu-se que a este ensaio permite uma melhor compreensão de seu papel de alarmina. Desta forma, é lúcido sugerir a implementação de ambos os ensaios para se permitir uma melhor análise do papel desse marcador no câncer.

Um aspecto importante é a heterogeneidade celular do microambiente tumoral dos CMTN. Sabe-se que o microambiente tumoral (MAT) dos CMTN em tumores metastáticos difere quando comparados àqueles em estágios precoces ou iniciais, tendendo a haver menor infiltração de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL's), Linfócitos CD8+ e células dendríticas e menor expressão de genes imunomoduladores, como àqueles relacionados ao interferon em pacientes metastáticos. (BIANCHINI et al., 2022)

Li e colaboradores (2016) analisaram 237 pacientes com câncer de mama que receberam a quimioterapia neoadjuvante. Destes, apenas 34% dos pacientes eram do subtipo triplo

negativo. Os autores verificaram que o aumento do percentual de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) apresentam uma melhor resposta a quimioterapia neoadjuvante e melhor sobrevida em pacientes com CMTN (LI et al., 2016). Assim, a avaliação de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) pode se tornar um marcador importante nos tumores de mama triplo negativo.

Lee e colaboradores (2016) demonstraram que a expressão nuclear de HMGB1 não se associada ao grau histológico ou aos níveis de TIL. Adicionalmente, verificaram que nem a expressão citoplasmática nem nuclear de HMGB1 mostrou significado prognóstico em CMTN. Por outro lado, observaram que a expressão citoplasmática de HMGB1 está associada aos níveis de TIL no câncer de mama em geral (LEE et al.; 2016). Esses achados são alinhados aos nossos, uma vez que verificamos que a baixa expressão de HMGB1 citoplasmática contribui para uma maior recidiva. Contudo, não avaliamos essa variável em relação ao perfil de TILs no presente estudo.

Cabe salientar que o CMTN apresenta pior sobrevida global quando comparado aos pacientes não-triplo negativo (LI et al., 2017b). Ao analisarmos a sobrevida global dos nossos pacientes, observamos que não houve diferença significativa na sobrevida global em função de expressão alta e baixa de HMGB1. Nossos achados vão ao encontro com os apresentados pelo estudo de Hubert e colaboradores (2021). Os pesquisadores mostraram que não houve diferença significativa na taxa de sobrevida de pacientes em 5 anos de acordo com a expressão da proteína de HMGB1 (HUBERT et al., 2021). Nossos resultados mostraram que não houve impacto na sobrevida global do HMGB1 nos pacientes incluídos no estudo.

Em nosso estudo avaliamos o papel de outra alarmina, a IL-33. Em estudo de Yang e colaboradores (2015) foi observado que a concentração sérica de IL-33 e ST2 é respectivamente 12x e 4x maior em pacientes com câncer de mama do que em voluntários saudáveis, indicando que as mudanças na expressão de IL-33/ST2 podem estar associadas ao câncer de mama (YANG et al., 2015). Outro estudo realizado também em pacientes acometidas por câncer de

mama, foi verificada uma maior expressão de IL-33 sérica em pacientes com câncer quando comparadas àquelas com doenças mamárias benignas, assim como maior expressão de IL-33 em tecidos estritamente neoplásicos em comparação aos tecidos adjacentes não tumoral (LIU et al., 2014).

No presente trabalho foram avaliadas 39 amostras de pacientes com CMTN onde, embora não tenhamos encontrado resultados significativos estatisticamente relacionando a expressão alta ou baixa de IL-33 e as variáveis clínicas, podemos observar que existe um aumento de pacientes que apresentaram alta expressão de IL-33 no grupo daquelas que recidivaram. Porém, tal achado não apresentou significância estatística. Assim, faz-se necessário o aumento do número de amostras de pacientes incluídos no estudo e estratificados entre os dois grupos e aliar a outros métodos investigativos, como a imunofluorescência e o histoescor.

Dentre os tumores de mama, existe um subtipo que expressão receptores hormonais, conhecidos como tumores Luminais. Os pacientes que apresentam esse subtipo molecular são tratados, na sua grande maioria, com o Tamoxifeno apresentando boas taxas de resposta. Contudo, existe um percentual de pacientes que são resistentes ao tratamento com o tamoxifeno. Nesse sentido, Hu e colaboradores (2017) demonstra que o aumento da expressão de IL-33 em células de câncer de mama resulta em resistência à inibição do crescimento tumoral na vigência do tratamento com tamoxifeno (HU et al., 2017). Curiosamente, nossos resultados não mostraram significância estatística quanto à expressão da IL-33 versus as variáveis de tratamento nos pacientes CMTN.

Em um outro estudo, os pesquisadores quantificaram pela técnica de imunoensaio de ELISA os níveis das citocinas HMGB1, RAGE e IL-33 no soro de 50 pacientes com câncer de mama. Os autores evidenciaram que os níveis de HMGB1 foi 3,4x superior ao grupo de indivíduos saudáveis. Esse aumento sérico de HMGB1 teve associação com o tamanho tumoral

T4 quando comparado com os T1-T2. Em adição, os autores mostraram que os níveis de IL-33 estão aumentados no grupo de pacientes com câncer de mama versus o grupo não câncer. Quando verificado a associação com o estágio tumoral, houve aumento de IL-33 em tumores T4 quando comparado aos estágios 1 e 2 (HANTOOSH; KADHIM, 2022). Esses dados mostram o papel importante dessas alarminas no câncer de mama, sem especificar o subtipo molecular. No presente trabalho, foi observado que o aumento na expressão de HMGB1 se associou de forma limítrofe com o estadiamento ( $p=0,08$ ). Novamente, o número de amostras pode ter relação com este resultado.

## **7. CONCLUSÃO**

Em nosso estudo concluímos que a expressão de HMGB1 citoplasmática está associada com a recidiva e a quimioterapia adjuvante em pacientes com CMTN. Não foi encontrada relação significativa entre a expressão de HMGB1 e a sobrevida global dos pacientes. A alarmina IL-33 não apresentou valor prognóstico no pacientes com câncer de mama triplo negativo.

## 8. REFERENCIAS

AFFERNI, C. et al. The pleiotropic immunomodulatory functions of IL-33 and its implications in tumor immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 1–17, 2018.

APETOH, L. et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nature Medicine**, v. 13, n. 9, p. 1050–1059, 2007.

BARRETO-NETO, N. J. DE S. et al. Perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal da mama em população de pacientes em Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 24, n. 4, p. 98–102, 2014.

BIANCHINI, G. et al. TNBC: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016.

BIÈCHE, I. et al. CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 14, n. 4, p. 1039–1052, 2007.

BOTEANU, R. M. et al. Alarmins in chronic noncommunicable diseases: Atherosclerosis, diabetes and cancer. **Journal of Proteomics**, v. 153, p. 21–29, 2017.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BUSKENS, C. J. et al. Comparison of cyclooxygenase 2 expression in adenocarcinomas of the gastric cardia and distal oesophagus. **Gut**, v. 52, n. 12, p. 1678–1683, 2003.

CANDIDO, J.; HAGEMANN, T. Cancer-related inflammation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. SUPPL.1, 2013

CHAN, B. C. L. et al. IL33: Roles in allergic inflammation and therapeutic perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–11, 2019.



CHENG, K. J. et al. HMGB1: an overview of its versatile roles in the pathogenesis of colorectal cancer. **Cellular Oncology**, v. 43, n. 2, p. 177–193, 2020.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 5, p. 303–313, 2009.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early breast cancer. **Oncologist**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 99–110, 2004.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 2007.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 2011.

ERIC, I. et al. Breast cancer in young women: Pathologic and immunohistochemical features. **Acta Clinica Croatica**, v. 57, n. 3, p. 497–502, 2018.

FANG, W. BIN et al. CCL2/CCR2 chemokine signaling coordinates survival and motility of breast cancer cells through Smad3 protein- and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 43, p. 36593–36608, 2012

FELDMAN, N.; ROTTER-MASKOWITZ, A.; OKUN, E. DAMPs as mediators of sterileinflammation in aging-related pathologies. **Ageing Research Reviews**, v. 24, p. 29–39, 2015.

FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S. Triple-Negative Breast Cancer. **TheNew England Journal of Medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938–1948, 2010.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The Interleukin-1 Family: Back

to the Future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003–1018, 2013.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010

HANTOOSH, M. H.; KADHIM, M. M. Detection of HMGB1 , RAGE and IL-33 Proinflammatory Cytokines in Serum of Breast Cancer Patients. v. 45, n. 01, p. 3425–3439, 2022.

HU, H. et al. IL-33 facilitates endocrine resistance of breast cancer by inducing cancer stem cell properties. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 485, n. 3, p. 643–650, 2017.

HUBERT, P. et al. Extracellular HMGB1 blockade inhibits tumor growth through profoundly remodeling immune microenvironment and enhances checkpoint inhibitor-based immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 9, n. 3, p. 1–18, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, Brasil. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2022.

JÉZÉQUEL, P. et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: Importance of immune response. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2015.

JOVANOVIC, I. P. et al. Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 7, p. 1669–1682, 2014

JUBE, S. et al. Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. **Cancer Research**, v. 72, n. 13, p. 3290–

3301, 2012.

KIM, J. Y. et al. Il-33-induced transcriptional activation of Ipin1 accelerates breast tumorigenesis. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 1–16, 2021.

KIM, J. H. et al. Expression profiling after induction of demethylation in MCF-7 breast cancer cells identifies involvement of TNF- $\alpha$  mediated cancer pathways. **Molecules and Cells**, v. 33, n. 2, p. 127–133, 2012

KLUNE, J. R. et al. HMGB1: Endogenous danger signaling. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 7–8, p. 476–484, 2008.

KOBOLDT, D. C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012.

LARSEN, K. M. et al. The role of IL-33/ST2 pathway in tumorigenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1–28, 2018.

LEE, H. J. et al. Cytoplasmic expression of high mobility group B1 (HMGB1) is associated with tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer. **Pathology International**, v. 66, n. 4, p. 202–209, 2016.

LI, S. et al. The long non-coding RNA TP73-AS1 modulates HCC cell proliferation through miR-200a-dependent HMGB1/RAGE regulation. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 2017a.

LI, S.; WEI, Y. Association of HMGB1, BRCA1 and P2 expression in ovarian cancer and chemotherapy sensitivity. **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 9572–9576, 2018.

LI, X. et al. Biomarkers Predicting pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 6, p. 871–878, 2016.

- LI, X. et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 161, n. 2, p. 279–287, 2017b.
- LIEW, F. Y.; GIRARD, J. P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 11, p. 676–689, 2016.
- LIU, Z.; FALO, L. D.; YOU, Z. Knockdown of HMGB1 in Tumor Cells Attenuates Their Ability To Induce Regulatory T Cells and Uncovers Naturally Acquired CD8 T Cell-Dependent Antitumor Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 118–125, 2011.
- LUO, S. P. et al. Validation of the Prognostic Significance of the Prognostic Stage Group According to the Eighth Edition of American Cancer Joint Committee on Cancer Staging System in Triple-Negative Breast Cancer: An Analysis From Surveillance, Epidemiology, and End Resu. **Journal of Surgical Research**, v. 247, p. 211–219, 2020.
- MANTOVANI, A. et al. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 778–795, 2019.
- MARRA, A. et al. Practical classification of triple-negative breast cancer: intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. **npj Breast Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2020.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010
- NIU, L. et al. Biological functions and theranostic potential of HMGB family members in human cancers. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 12, p. 1–23, 2020.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.
- PRAT, A. et al. Predicting response and survival in chemotherapy-treated triple-negative

breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 8, p. 1532–1541, 2014

PUSTERLA, T. et al. RAGE is a key regulator of oval cell activation and inflammation-associated liver carcinogenesis in mice. **Hepatology**, v. 58, p. 1–48, 2013.

RYU, D. W. et al. Clinical significance of morphologic characteristics in triple negative breast cancer. **Journal of the Korean Surgical Society**, v. 80, n. 5, p. 301–306, 2011.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005.

SHAH, S. P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 395–399, 2012.

SHANI, O. et al. Fibroblast-derived IL33 facilitates breast cancer metastasis by modifying the immune microenvironment and driving type 2 immunity. **Cancer Research**, v. 80, n. 23, p. 5317–5329, 2020.

SHEN, J. X.; LIU, J.; ZHANG, G. J. Interleukin-33 in Malignancies: Friends or Foes? **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. December, p. 1–7, 2018.

SORLIE T, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001

SØRLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

SOTIRIOU C, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003

SUN, Y. et al. HMGB1 expression patterns during the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 280, p. 29–35, 2015.

TANG, D. et al. High-mobility group box 1 and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 1–2, p. 131–140, 2010.

TESHOME, M.; HUNT, K. K. Neoadjuvant therapy in the treatment of breast cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 505–523, 2014.

WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–10, 2014.

WANG, S.; ZHANG, Y. **HMGB1 in inflammation and cancer** *Journal of Hematology and Oncology* *Journal of Hematology & Oncology*, , 2020

WANG, Z. et al. Tumor-derived HMGB1 induces CD62L dim neutrophil polarization and promotes lung metastasis in triple-negative breast cancer. **Oncogenesis**, v. 9, 2020.

WU, L.; YANG, L. The function and mechanism of HMGB1 in lung cancer and its potential therapeutic implications. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 6799–6805, 2018.

XUE, J. et al. HMGB1 as a therapeutic target in disease. **Journal of Cellular Physiology**, n. September, p. 1–14, 2020.

YANG, Y. et al. HMGB1 mediates lipopolysaccharide-induced inflammation via interacting with GPX4 in colon cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020.

YANG, Z. P. et al. The association of serum IL-33 and sST2 with breast cancer. **Disease Markers**, v. 2015, 2015

YIN, L. et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 1–13, 2020.

ZHAI, J. et al. Chemotherapeutic and targeted drugs-induced immunogenic cell death in cancer models and antitumor therapy: An update review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, n. April, p. 1–15, 2023.

## ANEXO 1 – FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP-ICC



Continuação do Parecer: 4.394.410

### Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado desse CEP acompanha o parecer do relator aprovando-o como se apresenta.

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1246748_É2.pdf	21/10/2020 15:32:09		Aceito
Outros	Correcao_pendencias.pdf	23/11/2016 12:17:29	Marcelo Gurgel Carlos da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOUTORADO FERNANDO.MELO[1].pdf	19/07/2013 11:37:08		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto Dr. Fernando Melo.jpg	18/07/2013 16:46:57		Aceito

### Situação do Parecer:

Aprovado

### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 12 de Novembro de 2020

---

**Assinado por:**  
**Marcelo Gurgel Carlos da Silva**  
**(Coordenador(a))**



# CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

**HMGB1 EXPRESSION IN PATIENTS WITH TRIPLE-NEGATIVE  
BREAST CANCER: IS A GOOD MARKER FOR PROGNOSIS?**

dos autores: DAVID BARBOSA DUARTE VIDAL; FRANCISCA JANICE  
LOPES SALES; LANDRA FREIRE DE OLIVEIRA; ROBERTO CÉSAR  
PEREIRA LIMA-JÚNIOR; DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG, foi  
apresentado na modalidade Tema Livre Oral, no evento XXIV  
Congresso Brasileiro de Mastologia ocorrido de 20 a 23 de abril de  
2022.

Salvador, 23 de abril de 2022



**XXIV  
CONGRESSO  
BRASILEIRO DE  
MASTOLOGIA**  
20 a 23 de abril de 2022  
Centro de Convenções Salvador

REALIZAÇÃO



Sociedade Brasileira de  
Mastologia



Sociedade Brasileira de  
Mastologia  
Regional Bahia

  
Augusto Tufi Hassan  
Presidente do Congresso

  
Marcos Nolasco  
Presidente da SBM - Regional Bahia