



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ISABELLE DE FÁTIMA VIEIRA CAMELO MAIA**

**ESTUDO TRANSLACIONAL DA EXPRESSÃO DE IL-33 E SEU PAPEL  
PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO: POLARIZAÇÃO  
DE MACRÓFAGOS M1**

**FORTALEZA**

**2025**

ISABELLE DE FÁTIMA VIEIRA CAMELO MAIA

ESTUDO TRANSLACIONAL DA EXPRESSÃO DE IL-33 E SEU PAPEL PROGNÓSTICO  
NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO: POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

FORTALEZA  
2025

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)

---

M186e Maia, Isabelle de Fátima Vieira Camelo.

Estudo translacional da expressão de IL-33 e seu papel prognóstico no câncer de mama triplo negativo: polarização de macrófagos M1 / Isabelle de Fátima Vieira Camelo Maia. – 2025.  
132 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong.

1. IL-33. 2. ST2. 3. câncer de mama triplo negativo. 4. macrófagos. I. Título.

CDD 615.1

---

ISABELLE DE FÁTIMA VIEIRA CAMELO MAIA

ESTUDO TRANSLACIONAL DA EXPRESSÃO DE IL-33 E SEU PAPEL PROGNÓSTICO  
NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO: POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS M1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: 07/03/2025.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Markus Andret Cavalcante Gifoni  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus por toda honra e glória.

Aos meus pais, Valder e Cleonilda, pelo carinho, amor e cuidado ao longo da vida.

Ao meu esposo, Amilton Cardoso, pelo companheirismo e amor.

Aos meus irmãos, pela amizade e parceria de sempre.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, coragem, dom da vida, e por guiado e iluminado todos os meus passos até aqui. E, principalmente, por não ter deixado desistir dos meus sonhos.

Aos meus queridos pais, **Cleonilda** e **Valder**, por todo apoio e amor incondicional durante a vida. Agradeço imensamente por todo esforço e toda dedicação ao longo dos anos, vocês moldaram quem eu sou hoje. Não consigo mensurar o tamanho da minha gratidão e admiração por vocês. Vocês são a minha fortaleza!

Ao meu esposo, **Amilton Cardoso (meu amor)**, companheiro fiel de todos os dias. Muito obrigada por todos os incentivos e conselhos diários durante essa jornada. Agradeço por não ter soltado minha mão em nenhum momento, e por não ter me deixado desistir nos momentos mais difíceis. Seu amor e carinho me fizeram perseverar e acreditar que era possível. Sem o seu apoio, nada disso teria sido possível. Você é o meu porto seguro!

Aos meus irmãos, **Valder Filho (Dinho)** e **Válcler Manoel (Clinho)**, que desde pequena me ensinaram o verdadeiro significado da amizade, e por todas as brincadeiras e momentos descontraídos ao longo da minha vida.

À minha avó, **Mariinha** (*in memoriam*), por ter vibrado junto comigo desde o ingresso ao ingressar no curso de Farmácia e por apoiar a minha decisão de cuidar das pessoas.

À minha querida orientadora e mãe científica, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deysi Viviana Tenazoa Wong**, exemplo de ser humano. Tenho uma profunda admiração pela sua força e coragem, e também por essa pesquisadora fenomenal. Agradeço por ter me acolhido desde a iniciação científica e por acreditar no meu potencial. Obrigada por todos os incentivos e ensinamentos repassados ao longo desses anos. Agradeço por confiar em mim desde o início e por essa orientadora tão humana e acolhedora.

Ao meu pai científico, **Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roberto César Pereira Lima Júnior**, que sempre esteve presente quando precisei de um 'helppp!!!'. Mesmo nos momentos mais ocupados, ele estava sempre disposto a ajudar, com um sorriso no rosto, demonstrando dedicação e carinho.

A minha *best friend* **Bianca Elen (casca de bala)**, companheira fiel de laboratório. Você foi um dos presentes que Deus me deu nessa jornada científica. Agradeço imensamente pelos conselhos sinceros, e por ter me apoiado em todos os momentos, não só no mestrado, mas também na vida. Muito obrigada pela dedicação aos experimentos, pela parceria incansável e pela amizade verdadeira. Sua presença fez toda a diferença, obrigada por alegrar nossos dias. Você é um ser humano iluminado!

A minha amiga **Ariana Soares**, que sempre se mostrou disposta a ajudar. Agradeço a paciência e atenção ao longo desses anos. Muito obrigada por ter compartilhado o seu conhecimento de cultura de células (*in vitro*) comigo, e ter confiado no meu potencial. Foi graças aos seus ensinamentos que pude caminhar com as minhas próprias pernas na cultura de células. Você é incrível!

À minha amiga **Nilza Moura**, que, apesar de tê-la conhecido recentemente, se entregou por completo aos meus experimentos e se doou de maneira significativa. Agradeço pela empatia e pelo zelo. Este é apenas o início de uma bela amizade.

À minha amiga **Maria Ariane**, por ser sempre tão prestativa e disposta a ajudar. Agradeço imensamente por ter me auxiliado na tabulação dos dados quando mais precisei. Tenho certeza de que você será uma grande profissional.

À família do **LAFICA**, em especial, Jussara Rodrigues e Gisely Lima, por terem colaborado na construção deste trabalho. Agradeço também aos demais que compartilharam conversas e momentos divertidos: profa. Delane, Anamaria, Débora, João, Raiza, David e Cecília.

À **Profª. Drª. Mariana de Lima Vale**, por sempre ser tão prestativa, por me socorrer e me aconselhar em todos os momentos que precisei de ajuda.

À minha amiga e querida, **Profª. Drª. Vilma de Lima**, pela amizade, carinho e confiança. Agradeço por todos os conselhos e palavras amigas, e por ter aberto as portas do **Laboratório de Odonto Farmacologia (LOF)**. Ganhamos mais uma casa!

Ao **Prof. Drº. Diego Veras Wilke**, por sempre se mostrar tão atencioso e humano. Agradeço a sua generosidade e prontidão em sempre ajudar! Muito obrigada por abrir as portas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LABBMAR), local este que pude iniciar o meu treinamento em cultivo celular, tenho muito carinho e apreço por todos vocês!

À **Profª. Drª. Nylane Maria Nunes de Alencar**, por me acolher no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica (LFB), onde pude realizar toda a cultura celular deste estudo, tornando este trabalho possível.

À médica patologista, **Dra. Drª. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha**, mais conhecida como Dra. Patty, por sua valiosa ajuda com os escores de Imunohistoquímica. Agradeço pela atenção dedicada e pelo tempo investido neste trabalho.

A equipe do Hospital Albert Sabin, em especial, **Marianne, Natan e Dani**, que me acolheram e ajudaram no que foi necessário para a realização deste trabalho

Ao **Laboratório de Odonto Farmacologia (LOF)**, especialmente, para os meus amigos Rafael e Adália, pelas conversas e amizade.

Ao **Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LABBMAR)**, em especial à Katharine Gurgel, Thais e Yuri, por sempre me ajudarem e esclarecerem minhas dúvidas em cultura celular.

Ao **Laboratório de Neuropsicologia Farmacologia (LABNEURO)**, em especial para meus amigos (Hilda, Fran, Cássia Cid, Dila) e **Profª. Drª. Daniele Macedo**, por sempre estarem de prontidão em ajudar. Agradeço pelas tardes divertidas do nosso cafezinho. Muito obrigada pela amizade e parceria de sempre.

Aos professores, **Profª. Drª. Nylane Nunes, Prof. Drº. Diego Wilke e Profª. Drª. Lilia Câmara**, por participar da banca examinadora da qualificação e terem contribuído nesta dissertação.

Aos professores, **Profª. Drª. Izabel Guedes e Drº. Markus Gifoni**, por participar da banca examinadora de defesa de mestrado e terem contribuído nesta dissertação.

Aos meus amigos, **Fernanda, Renata Mano, Igor, Livinha, Luana, Raíssa, Samyia, Stephanie e Thaís**, por todas as conversas, risadas e brincadeiras, as quais tornaram o processo mais leve.

Aos funcionários do NPDM, em especial, a **Ivaneide, Mauro, Carlinhos, Marcelo, Marquinhos, Gleiciano, Servílio, Fabiano e Hugo**.

A todos os professores e colaboradores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, por todos os ensinamentos compartilhados.

Ao CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma.

Perseverar... É não desistir, é insistir mesmo que tudo seja contrário. Só persevera quem tem fé, só tem fé quem tem Deus e quem tem Deus não luta sozinho [...] (Yla Fernandes)

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é um subtipo agressivo, que afeta principalmente mulheres com menos de 50 anos. Caracterizado pela ausência de receptores de estrogênio e progesterona e pouca/ausência da superexpressão do gene do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). A interleucina 33 (IL-33) é uma citocina pleiotrópica que sinaliza via receptor ST2. A identificação de novos marcadores prognósticos é essencial para melhorar os resultados terapêuticos. **Objetivo:** Avaliar a associação da expressão de IL-33/ST2 com parâmetros clínico-patológicos no CMTN e seu significado prognóstico, além de investigar *in vitro* a polarização de macrófagos após exposição a células tumorais incubadas com quimioterápicos. **Metodologia:** O estudo foi dividido em clínico e experimental. O estudo clínico foi retrospectivo e transversal, com dados clínico-patológicos de 73 pacientes atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba. A expressão de IL-33 e ST2 foi analisada por Imunofluorescência Indireta (IFI) e Imuno-histoquímica (IHQ) nas amostras de *core-biopsy*. Na parte experimental, investigou-se a via IL-33/ST2 em linhagens tumorais de CMTN (MDA-MB-231) e luminais (MCF-7), incubadas ou não com doxorrubicina (DOX) e/ou paclitaxel (PTX) por IFI. Para avaliar os macrófagos, a linhagem RAW 264.7 foi exposta por 24h ao sobrenadante das células tumorais, incubadas ou não com quimioterápicos. O sobrenadante foi coletado para a dosagem das citocinas (IL-33, TNF-alfa, IL-10 e IL-18). Também foi dosada a IL-33 nas linhagens tumorais. Adicionalmente, investigou-se a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) (fenótipo M1) e Arginase-1 (fenótipo M2) por IFI, e a expressão gênica para o fenótipo M1 (*Tnf-alfa*, *inos*, *Il-18* e *Tgf-beta*) e M2 (*Mmp9*, *Cd206*, *Arg1*) por qPCR, além da dosagem de nitrito pelo ensaio de Griess. **Resultados:** A maioria das pacientes tinha  $\geq 50$  anos (63,01%), com média de  $53,27 \pm 11,86$  anos. A história familiar de câncer da mama foi relatada em 41,10% dos casos. O índice de proliferação Ki-67 ( $>20\%$ ) foi o mais prevalente (84,93%). A expressão baixa de IL-33 foi encontrada em 56,45% das amostras ( $p=0,0068$  vs. expressão alta), Ki-67 $>20\%$  ( $p=0,0068$ ) e recidiva tumoral ( $p=0,0440$ ) com CMTN. Não houve diferença significativa na sobrevida global entre os pacientes com baixa e alta expressão de IL-33 ( $p=0,84$ ). Não houve associações significativas com ST2 ( $p>0,05$ ). Nos ensaios *in vitro*, houve um aumento da expressão da IL-33 nas linhagens tumorais, especialmente nos grupos incubados com DOX ou DOX/PTX ( $p<0,05$ ). Na RAW 264.7 ativada com LPS, houve maior produção de óxido nítrico (NO) após incubação com o sobrenadante das células tumorais. Nos outros grupos, mesmo sem estímulo com LPS, também foi observada produção de NO. Houve aumento nos níveis de TNF-alfa ( $p<0,05$ ) e na expressão gênica de *Tnf-alfa*, *Il-18* e *inos*,

sugerindo polarização para M1. **Conclusão:** A baixa expressão de IL-33 está associada a um índice de proliferação Ki-67 elevado e à recorrência do tumor ( $p < 0,05$ ). Sua presença no microambiente tumoral CMTN pode regular negativamente a biologia do tumor. O meio condicionado das células tumorais incubadas com quimioterápicos induz a polarização de macrófagos para o fenótipo M1, o que pode influenciar a resposta imunológica tumoral.

**Palavras-chave:** IL-33; ST2; câncer de mama triplo negativo; macrófagos.

## ABSTRACT

### TRANSLATIONAL STUDY OF IL-33 EXPRESSION AND ITS PROGNOSTIC ROLE IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER: M1 MACROPHAGE POLARIZATION

**Introduction:** Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive subtype that primarily affects women under the age of 50. It is characterized by the absence of estrogen and progesterone receptors and little to no overexpression of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) gene. Interleukin 33 (IL-33) is a pleiotropic cytokine that signals through the ST2 receptor. The identification of new prognostic markers is essential for improving therapeutic outcomes. **Objective:** To evaluate the association between IL-33/ST2 expression and clinicopathological parameters in TNBC and its prognostic significance, as well as to investigate in vitro macrophage polarization after exposure to tumor cells incubated with chemotherapeutics. **Methodology:** The study was divided into clinical and experimental components. The clinical study was retrospective and cross-sectional, using clinicopathological data from 73 patients treated at the Haroldo Juaçaba Hospital. IL-33 and ST2 expression was analyzed by Indirect Immunofluorescence (IFI) and Immunohistochemistry (IHC) in core biopsy samples. In the experimental part, the IL-33/ST2 pathway was investigated in TNBC cell lines (MDA-MB-231) and luminal cell lines (MCF-7), incubated with or without doxorubicin (DOX) and/or paclitaxel (PTX) by IFI. To evaluate macrophages, the RAW 264.7 cell line was exposed to the supernatant of tumor cells, incubated or not with chemotherapeutics, for 24 hours. The supernatant was collected for cytokine measurement (IL-33, TNF-alpha, IL-10, and IL-18). IL-33 levels were also measured in tumor cell lines. Additionally, the expression of iNOS (inducible nitric oxide synthase, M1 phenotype) and Arginase-1 (M2 phenotype) was investigated by IFI, and gene expression for M1 (Tnf-alpha, inos, Il-18, and Tgf-beta) and M2 (Mmp9, Cd206, Arg1) was analyzed by qPCR. Nitrite levels were measured by the Griess assay. **Results:** Most patients were  $\geq 50$  years old (63.01%), with a mean age of  $53.27 \pm 11.86$  years. A family history of breast cancer was reported in 41.10% of the cases. The Ki-67 proliferation index ( $>20\%$ ) was the most prevalent (84.93%). Low IL-33 expression was found in 56.45% of the samples ( $p=0.0068$  vs. high expression), with Ki-67 $>20\%$  ( $p=0.0068$ ) and tumor recurrence ( $p=0.0440$ ) associated with TNBC. No significant difference in overall survival was observed between patients with low and high IL-33 expression ( $p=0.84$ ). No significant associations were found with ST2 ( $p>0.05$ ). In vitro assays showed an increase in IL-33 expression in tumor cell lines, especially in groups incubated with DOX or DOX/PTX ( $p<0.05$ ). In LPS-activated RAW 264.7 cells, increased nitric oxide (NO) production was observed after

incubation with the tumor cell supernatant. NO production was also observed in other groups, even without LPS stimulation. TNF-alpha levels ( $p < 0.05$ ) and gene expression of Tnf-alpha, Il-18, and inos were increased, suggesting polarization toward the M1 phenotype. **Conclusion:** Low IL-33 expression is associated with a high Ki-67 proliferation index and tumor recurrence ( $p < 0.05$ ). Its presence in the TNBC tumor microenvironment may negatively regulate tumor biology. The conditioned medium from tumor cells incubated with chemotherapeutics induces macrophage polarization toward the M1 phenotype, which may influence the tumor immune response.

**Keywords:** IL-33; ST2 receptor; triple-negative breast cancer; macrophage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Incidência de casos de câncer em mulheres para cada ano do triênio 2023-2025 no Brasil.....	27
Figura 2	- Representação gráfica da anatomia da mama em corte sagital.....	28
Figura 3	- Sintomas do Câncer de Mama.....	30
Figura 4	-Subtipos do câncer de mama triplo negativo, com as principais características histológicas, marcadores e vias de sinalização.....	34
Figura 5	- Vias de sinalização da IL-33/ST2.....	39
Figura 6	- Esquema geral do protocolo experimental adotado no estudo.....	44
Figura 7	- Resumo do protocolo experimental 1.....	45
Figura 8	- Técnica do <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	47
Figura 9	- Fluxograma resumido da metodologia de imunofluorescência.....	49
Figura 10	- Fluxograma resumido da metodologia de imunohistoquímica.....	52
Figura 11	- Resumo do protocolo experimental 2.....	53
Figura 12	- Células MDA-MB-231, MCF-7 e RAW 264.7.....	57
Figura 13	- Resumo da concentração inibitória média (CI50) obtida pelo ensaio de sulforodamina B.....	58
Figura 14	- Desenho da placa de 6 poços para o tratamento com PTX e/ou DOX e seus respectivos IC50 das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.....	59
Figura 15	- Resumo do protocolo experimental 3.....	60
Figura 16	- Resumo do protocolo experimental 4.....	63
Figura 17	- Distribuição da área fluorescente das pacientes Câncer de Mama Triplo Negativo com ponto de corte ( <i>cut-off</i> ) definido pela mediana.....	70
Figura 18	- Expressão de IL-33 por imunofluorescência das amostras em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN) .....	71
Figura 19	- Expressão de ST2 por imunofluorescência das amostras em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN).....	72
Figura 20	-Fotomicrografias representativas da expressão de IL-33 por imunohistoquímica das amostras de <i>core-biopsy</i> em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN).....	83
Figura 21	-Fotomicrografias representativas da expressão de ST2 por imunohistoquímica das amostras de <i>core-biopsy</i> em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN).....	84

Figura 22	- Análise de sobrevida global dos pacientes com alta e baixa expressão de IL-33.....	85
Figura 23	- Grupos experimentais da linhagem MCF-7 na placa de 6 poços.....	86
Figura 24	- Grupos experimentais da linhagem MDA-MB-231 na placa de 6 poços.....	87
Figura 25	- Quantificação da área fluorescente do eixo IL-33/ST2 da linhagem tumoral MCF-7.....	89
Figura 26	- Quantificação da área fluorescente do eixo IL-33/ST2 da linhagem tumoral MDA-MB-231.....	90
Figura 27a	- Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral de CMTN (MDA-MB-231) incubadas com DMEM, PBS, DMSO.....	91
Figura 27b	- Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral de CMTN (MDA-MB-231) incubadas com LPS, DOX, PTX e DOX/PTX.....	92
Figura 28a	- Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral MCF-7 incubadas com DMEM, PBS e DMSO.....	93
Figura 28b	- Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral MCF-7 incubadas com LPS, DOX, PTX e DOX/PTX.....	94
Figura 29	- Dosagem de níveis de IL-33 no sobrenadante das células de macrófagos previamente estimuladas com a quimioterapia nas células tumorais.....	95
Figura 30	- Produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da RAW 264.7 estimulados com diferentes concentrações (10, 100 e 1000 ng/mL) de LPS...	96
Figura 31	- Níveis de produção de óxido nítrico do sobrenadante da MDA-MB-231 incubados em macrófagos RAW 264.7 durante 24 horas.....	98
Figura 32	- Níveis de produção de óxido nítrico do sobrenadante da MCF-7 incubados em macrófagos RAW 264.7 durante 24 horas.....	99
Figura 33	- Quantificação da área fluorescente de iNOS da linhagem tumoral MCF-7.....	101
Figura 34	- Quantificação da área fluorescente de iNOS da linhagem tumoral MDA-MB-231.....	102
Figura 35a	- Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (continua).....	103
Figura 35b	- Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (final).....	104

Figura 36a	- Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (continua).....	105
Figura 36b	- Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (final).....	106
Figura 37a	- Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (continua).....	107
Figura 37b	- Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (conclusão).....	108
Figura 38a	- Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (continua).....	109
Figura 38b	- Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (final).....	110
Figura 39	- Dosagem de citocinas (TNF-alfa, IL-18 e IL-10) da RAW 264.7 com o meio condicionado das linhagens tumorais triplo negativo e não triplo negativo.....	112
Figura 40	- Expressão gênica de <i>inos</i> , <i>Tnf-alfa</i> , <i>Il-18</i> e <i>Tgf-beta</i> nas células RAW 264,7 incubadas com o sobrenadante da célula tumoral triplo negativo ou não triplo negativo.....	114
Figura 41	- Expressão gênica de <i>cd206</i> , <i>mmp9</i> e <i>arg1</i> nas células RAW 264,7 incubadas com o sobrenadante da célula tumoral triplo negativo ou não triplo negativo.	116

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação dos subtipos moleculares de aproximação baseados pela expressão de biomarcadores pela técnica de imuno-histoquímica segundo ST Gallen 2013.....	32
Quadro 2 - Descrição do esquema de quimioterapia (neoadjuvante e adjuvante) em pacientes com câncer de mama.....	35
Quadro 3 - Intensidade de expressão da marcação por imunohistoquímica.....	51
Quadro 4 - Drogas e seus respectivos códigos.....	57
Quadro 5 - Sequência de primers utilizados no qRT-PCR.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo-negativo.....	68
Tabela 2	- Associação dos parâmetros clínicos-patológicos com a expressão de IL-33 e ST-2 por imunofluorescência.....	74
Tabela 3	- Associação entre os escores de imunohistoquímica para IL-33 e as variáveis clínicas patológicas em pacientes com CMTN.....	79
Tabela 4	- Associação entre os escores de imunohistoquímica para ST2 e as variáveis clínicas patológicas em pacientes com CMTN.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC-T	Doxorrubicina + Ciclofosfamida seguido de Taxano
Arg1	Arginase-1
AKT	Proteína quinase B
BSA	Albumina Sérica Bovina
CA	Câncer
CD206	<i>Cluster of Differentiation 206</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMF	Ciclofosfamida + Metotrexato + 5-Fluorouracil
CID 10	Classificação Internacional de Doenças e Problemas
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
DAB	3,3-diaminobenzidina
DCIS	Carcinomas ductais in situ
ddAC	Esquema AC em dose densa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Cloridrato de doxorrubicina
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimático
ER	Receptores de Estrogênio
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FOXP3	<i>Forkhead Box P3</i>
GCO	Observatório Global do Câncer
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-Eosina
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano
HHJ	Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC50	Concentração Inibitória Média
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
IDC	Carcinomas ductais invasivos
IF	Imunofluorescência
IHQ	Imunohistoquímica
IL-1RAcP	Receptor acessório da interleucina-1
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33
ILC	Carcinomas lobulares invasivos
ILC2	Células linfoides inatas do tipo 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRAK1/4	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4</i>
LCIS	Carcinomas lobulares <i>in situ</i>
LPS	Lipopolissacarídeos de <i>Escherichia coli</i> O111:B4
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7	Linhagem de câncer mama luminal
MDA-MB-231	Linhagem de câncer de mama triplo negativo
MMP9	Metaloproteinase de matriz 9
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NDPM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
NEED	N-(1-naftil)-etilenodiamina
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>

NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCb	Paclitaxel + Carboplatina
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PR	<i>Progesterone receptor</i>
PTX	Paclitaxel
QTneo	Quimioterapia Neoadjuvante
RM	Ressonância Magnética
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos murinos imortalizados
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SIGIRR	<i>Single Ig IL-1-related receptor</i>
sST2	“ <i>suppressor of tumorigenicity</i> ” 2 na forma solúvel
ST2	Receptor celular da IL-33
SUS	Sistema Único de Saúde
TAMs	<i>Tumor-Associated Macrophages</i>
TC	Docetaxel + Ciclofosfamida
TGF-beta	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th2	Células T auxiliares do tipo 2
TILs	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TME	Microambiente Tumoral
TN	Triplo Negativo
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
Tregs	Linfócitos T reguladoras
UFC	Universidade Federal do Ceará
US	Ultrassonografia

USP38	<i>Ubiquitin-specific peptidase 38</i>
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g	Grama
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μl	Microlitro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>1.1</b>	<b>Câncer de mama</b> .....	27
<i>1.1.1</i>	<i>Subtipos moleculares</i> .....	32
<i>1.1.2</i>	<i>Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN)</i> .....	33
<b>1.2</b>	<b>Inflamação e câncer: um elo crucial na carcinogênese</b> .....	37
<i>1.2.1</i>	<i>Eixo IL-33/ST2</i> .....	38
<i>1.2.2</i>	<i>Macrófagos associados ao tumor e o microambiente tumoral</i>	40
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	43
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
<b>3.1</b>	<b>Estudo Clínico</b> .....	44
<i>3.1.1</i>	<i>Protocolo 1: Investigar a expressão dos marcadores IL-33 e ST2 por imunohistoquímica e imunofluorescência no tumor primário de paciente com CMTN</i> .....	45
<i>3.1.1.1</i>	<i>Delineamento e local da pesquisa</i> .....	45
<i>3.1.1.2</i>	<i>Seleção dos pacientes</i> .....	45
<i>3.1.1.3</i>	<i>Procedimento de coleta das amostras clínicas</i> .....	46
<i>3.1.1.4</i>	<i>Análise anatomopatológico das pacientes</i> .....	46
<i>3.1.1.4.1</i>	<i>Montagem de Tissue Microarray (TMA)</i> .....	46
<i>3.1.1.5</i>	<i>Avaliação da expressão dos marcadores IL-33/ST2</i> .....	47
<i>3.1.1.5.1</i>	<i>Imunofluorescência</i> .....	48
<i>3.1.1.5.2</i>	<i>Imunohistoquímica</i> .....	49
<i>3.1.2</i>	<i>Protocolo 2: Dosar a interleucina 33 no plasma das pacientes com câncer de mama Luminais e Triplo-negativo</i> .....	52
<i>3.1.2.1</i>	<i>Delineamento e local da pesquisa</i> .....	53
<i>3.1.2.2</i>	<i>Seleção dos pacientes</i> .....	53
<i>3.1.2.3</i>	<i>Procedimento de coleta das amostras clínicas</i> .....	54
<i>3.1.2.4</i>	<i>Análise por ImunoEnsaio Enzimático (ELISA)</i> .....	54
<i>3.1.6</i>	<i>Análise Estatística</i> .....	55
<i>3.1.7</i>	<i>Aspectos Éticos</i> .....	55

<b>3.2</b>	<b>Estudo <i>in vitro</i></b> .....	56
<b>3.2.1</b>	<b><i>Linhagens celulares</i></b> .....	56
<b>3.2.2</b>	<b><i>Reagente e fármacos</i></b> .....	56
<b>3.2.3</b>	<b><i>Planejamentos experimentais</i></b> .....	58
3.2.3.1	<i>Protocolo 1: Dados de experimentos anteriores do grupo</i> .....	58
3.2.3.2	<i>Protocolo 2: Quantificação da citocina IL-33 por ELISA das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7</i> .....	58
3.2.3.3	<i>Protocolo 3: Avaliar da co-marcação de IL-33/ST2 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 por Imunofluorescência Indireta</i> .....	60
3.2.2.3.1	<i>Imunofluorescência de células</i> .....	60
3.2.3.4	<i>Protocolo 4: Avaliação do perfil da polarização de macrófagos (M1 e M2) na linhagem RAW 264.7, estimulados com o sobrenadante das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, e a expressão gênica de IL-33 por qPCR na RAW 264.7</i> .....	62
3.2.3.4.1	<i>Expressão gênica por qPCR</i> .....	64
3.2.3.4.2	<i>Dosagem de Nitrito</i> .....	65
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	66
<b>4.1</b>	<b>Estudo Clínico</b> .....	65
4.1.1.	<i>Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo</i> .....	65
4.1.2.	<i>Imunofluorescência do eixo IL-33/ST2 e as associações com os parâmetros patológicos e clínicos de pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo</i> .....	70
4.1.3.	<i>Imuno-histoquímica de IL-33 e ST-2 em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo</i> .....	78
<b>4.2</b>	<b>Estudo <i>in vitro</i></b> .....	86
4.2.1.	<i>Fotomicrografias das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 após o tratamento com quimioterápicos</i> .....	86
4.2.2	<i>Imunofluorescência do eixo IL-33/ST2 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7</i> .....	88
4.2.3	<i>Avaliação da ativação da linhagem celular RAW 264.7</i> .....	96
4.2.4	<i>Dosagem de Óxido Nítrico</i> .....	97
4.2.5	<i>Imunofluorescência de iNOS e Arginase-1 em RAW 264.7 estimulados com o sobrenadante da MDA-MB-231 e MCF-7</i> .....	100

4.2.6	<i>Dosagem de citocinas para avaliação do perfil de polarização de macrófagos (M1 ou M2) e IL-33 em macrófagos (RAW 264.7) e linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231).....</i>	111
4.2.7	<i>Expressão gênica por RT-PCR do perfil de polarização de macrófagos (M1) em macrófagos (RAW 264.7) após incubar com os sobrenadantes das linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231).....</i>	113
4.2.8	<i>Expressão gênica por RT-PCR do perfil de polarização de macrófagos (M2) em macrófagos (RAW 264.7) após incubar com os sobrenadantes das linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231).....</i>	115
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	117
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	125
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	126

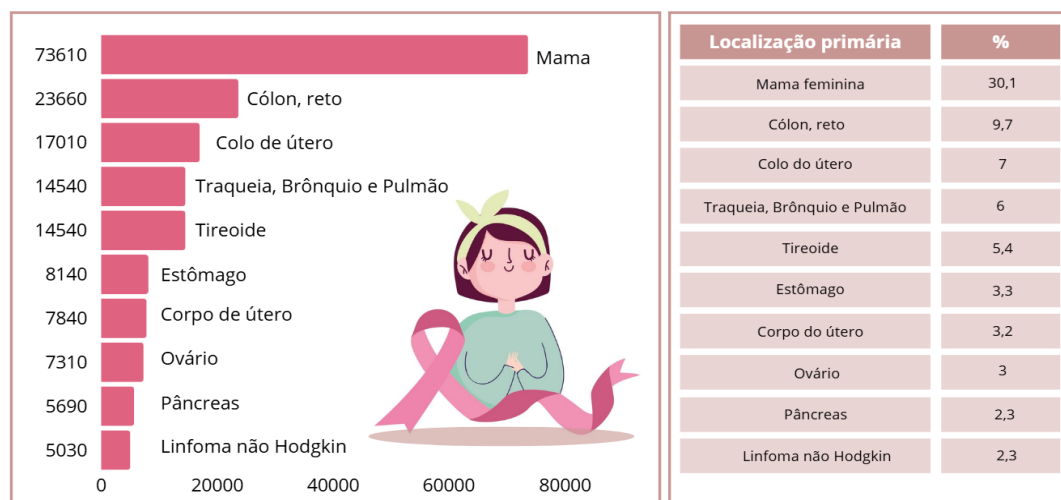
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer de mama

O câncer é uma doença multifatorial que apresenta do ponto de vista celular uma rápida proliferação e habilidade de invadir outros tecidos (INCA, 2023). De acordo com o Observatório Global do Câncer (GCO) (do inglês, *Global Cancer Observatory*) da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) foram registradas 9.743.832 mortes por câncer em todo o mundo em 2022, evidenciando o impacto negativo da doença. (Ferlay *et al.*, 2024). Além disso, dez de 36 tipos de câncer identificados representaram, juntos, aproximadamente dois terços dos novos de câncer em todo o mundo, dentre eles, o câncer de mama contribuiu para esses dados (Ferlay *et al.*, 2024). No Brasil, o cenário é igualmente preocupante, com uma estimativa de mais de 3 milhões de novos casos de câncer de mama em mulheres entre os anos de 2022 e 2050 (GCO, 2022).

O câncer de mama é uma das neoplasias mais prevalentes entre as mulheres, contribuindo para uma significativa taxa de morbidade e mortalidade. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se mais de 70 mil novos casos de câncer de mama em mulheres, representando 30,1% do total de câncer, no triênio de 2023 a 2025 (**Figura 1**) (INCA, 2023). Dessa forma, são utilizados cerca de 60 bilhões de dólares anualmente de recursos públicos devido ao aumento dos casos de câncer (Barros *et al.*, 2024).

**Figura 1** – Incidência estimada de casos de câncer em mulheres para cada ano do triênio 2023-2025 no Brasil.

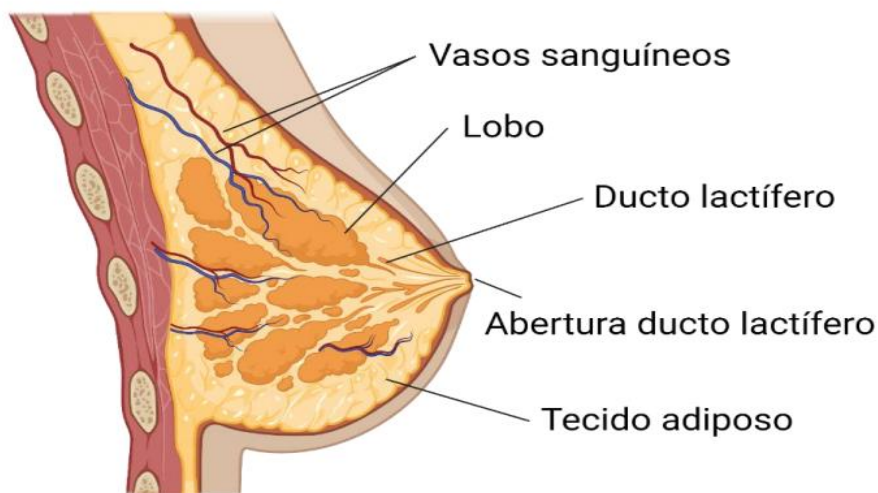


Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Adaptado de Amorim *et al.*, 2024.

Portanto, os números de casos e suas respectivas taxas brutas de incidência estimada para 100 mil mulheres, nas regiões do Brasil, são: Norte (2.410 casos; 24,99/100 mil), Nordeste (15.690 casos; 52,20/100 mil), Centro-Oeste (4.950 casos; 57,28/100 mil), Sudeste (39.330 casos; 84,46/100 mil) e Sul (11.230 casos; 71,44/100 mil). Em resumo, no País, estima-se um total de 73.610 novos casos, com taxa bruta de 66,54/100 mil. Este tipo de câncer apresenta incidência maior a partir dos 50 anos (faixa etária de maior risco variando de 50 a 69 anos). Por sua vez, dados do estudo realizado no AC Camargo Cancer Center demonstram uma incidência de 11,9% em mulheres jovens (Zhao *et al.*, 2023). No estado do Ceará, considerando o mapa dinâmico do INCA, a faixa etária compreende os valores médios entre 48,4 a 74,8 anos (INCA, 2024; Zhao *et al.*, 2023).

Segundo Brito *et al.* (2024) o câncer (CA) de mama consiste na multiplicação maligna de células localizadas nas áreas ao redor dos ductos e/ou lóbulos mamários. De maneira geral, as neoplasias mamárias são majoritariamente adenocarcinomas que se desenvolvem a partir das células que compõem as glândulas responsáveis pela produção do leite (lóbulos) ou nos ductos lactíferos. Por isso, a localização anatômica dos carcinomas de mama é nomeada em “ductal” e “lobular” (**Figura 2**). Ademais, os carcinomas ductais e lobulares são classificados quanto ao grau de invasividade, como: carcinomas ductais *in situ* (em inglês, DCIS), carcinomas ductais invasivos (em inglês, IDC), carcinomas lobulares *in situ* (em inglês, LCIS) e carcinomas lobulares invasivos (em inglês, ILC) (Oliveira, 2024).

**Figura 2** - Representação gráfica da anatomia da mama em corte sagital.



Fonte: Oliveira, 2024, modificado pela autora.

Esta neoplasia que afeta principalmente mulheres, sendo em homens considerada rara, e acomete <1% da população do total de casos (INCA, 2024). Tendo em vista a Classificação Internacional de Doenças e Problemas relacionados à saúde – décima revisão (CID 10), o câncer de mama feminina é classificado como C50. A etiologia dessa doença é multifatorial, e envolve a participação de diversos fatores, tais como, genéticos, ambientais, endócrinos e fisiopatológicos (Lima, Silva e Oliveira, 2024).

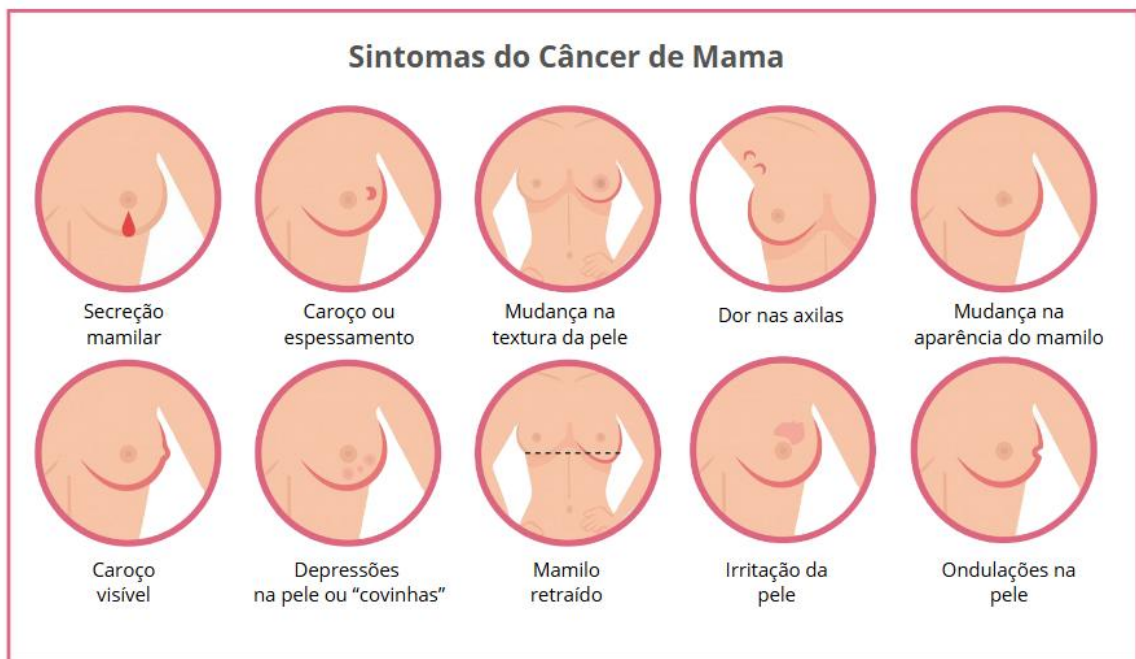
Segundo o estudo de Silva *et al.* (2024), em que foram considerados os dados Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no período de 2005 a 2019, foi observado uma tendência de aumento da taxa de mortalidade padronizada por câncer de mama no Brasil. Nesta pesquisa, as regiões Norte e Nordeste mostraram um maior aumento nas taxas de mortalidade enquanto as regiões Sul e Sudeste demonstraram uma tendência decrescente das taxas. Assim, em consonância com tais dados, o último relatório emitido pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) divulgado em 2023 apontou o câncer de mama como o mais incidente em mulheres em todas as regiões no País, sendo mais prevalente nas regiões Sul e Sudeste. A maior incidência do câncer de mama nas regiões Sul e Sudeste podem ser explicadas pelas características sócio-demográficas da população, como a maior expectativa de vida, a gestação tardia e o menor número de filhos (Barros *et al.*, 2024).

Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) observou que o número de novos casos de câncer de mama ultrapassou o câncer de pulmão, excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma, representando 11,7% dos cânceres em mulheres (Dias *et al.*, 2024). Nesse sentido, em 2021, a OMS definiu como objetivo reduzir a mortalidade global por câncer de mama para 2,5% ao ano entre 2020 e 2040. Apesar disso, no Brasil, algumas estatísticas, como os números de casos apontados pelo INCA, indicam um aumento percentual, ao contrário da meta estabelecida pela OMS (WHO, 2023a). Tal cenário é presente sobretudo em países de média e baixa renda, em decorrência da dificuldade de diagnósticos e tratamentos (WHO, 2023b).

Em relação à taxa de mortalidade, no Brasil, o CA de mama é a principal causa de morte por câncer, com taxas distintas entre as regiões, e ocupa elevada incidência e prevalência na população (INCA, 2023). Portanto, considerando a taxa de mortalidade para cada 100 mil mulheres, as regiões Sudeste e Sul apresentam as maiores taxas (12,43 e 12,69 óbitos/100 mil, respectivamente), seguidas do Nordeste (10,75 óbitos/100 mil), Centro-Oeste (10,90 óbitos/100 mil) e Norte (8,59 óbitos//100 mil (INCA, 2020). Por isso, torna-se importante o diagnóstico precoce, bem como o rastreamento do câncer de mama na atenção primária da saúde.

O principal exame para a detecção precoce do câncer de mama é a mamografia, uma vez que é possível encontrar lesões não-palpáveis, como é o caso de microcalcificações, que podem evoluir para carcinoma ductal *in situ*, por exemplo. Além disso, a ultrassonografia (US) e ressonância magnética (RM) são exames complementares para o diagnóstico. Pois, a US e a RM são importantes para detecção da lesão nodular que pode ser cística ou sólida (Oliveira *et al.*, 2024). Os exames de imagem estão associados ao exame físico, por um profissional médico ou enfermeiro, para detectar nódulos e/ou tumores palpáveis ou até mesmo alterações no aspecto da pele (**Figura 3**).

**Figura 3** - Sintomas do Câncer de Mama.



Fonte: Adaptado de Freepik, 2024.

De forma complementar ainda existem os exames confirmatórios que podem incluir a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), exame citológico da secreção mamilar e a biópsia de fragmento (*core biopsy*) (Oliveira *et al.*, 2024). Quanto às opções de tratamento do câncer de mama podem ser categorizadas em local e sistêmica. O tratamento local (não medicamentoso) consiste na cirurgia e radioterapia. Já o sistêmico (medicamentoso) consiste na quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica (INCA, 2024). Para a escolha do tipo de tratamento o oncologista realiza a avaliação das características clínicas-patológicas individuais de cada paciente.

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) oferece tratamento para o câncer de mama em hospitais especializados. Portanto, o tratamento medicamentoso que será discutido adiante faz parte do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Câncer de Mama, da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), o qual foi baseado na literatura científica (Brasil, 2024). De forma geral, a quimioterapia pode ser administrada de duas formas: neoadjuvante (antes da cirurgia) ou adjuvante (pós-cirurgia).

A quimioterapia neoadjuvante (QTneo) consiste na administração de terapias sistêmicas antes da cirurgia, possibilitando a redução tumoral e aumentando as chances para uma cirurgia conservadora da mama, tornando o tumor operável (Vasconcelos *et al.*, 2024). A quimioterapia adjuvante desempenha um papel importante na redução da mortalidade do CA de mama na grande maioria dos países ocidentais. Isso se torna evidente ao analisar a sobrevida livre de doenças e a sobrevida global após 15 anos de acompanhamento. A quimioterapia adjuvante é recomendada para pacientes com alto risco de recidiva, que comumente apresentam tumores maiores, linfonodos positivos ou subtipo molecular mais agressivo. Para potencializar o efeito desse tratamento é realizada uma combinação de quimioterápicos para aumentar os efeitos sinérgicos e minimizar a resistência tumoral (Santos *et al.*, 2024).

Os grupos farmacológicos usados nos esquemas de quimioterapia em pacientes com câncer de mama envolvem as antraciclinas (doxorrubicina e epirrubicina), taxanos (docetaxel e paclitaxel), agentes alquilantes (ciclofosfamida), antimetabólitos (5-fluorouracil; metotrexato), platina (carboplatina), dentre outros. Dentre esses fármacos, os mais utilizados para a QT seriam as antraciclinas e os taxanos (Brasil, 2024).

Para a escolha do melhor esquema de quimioterapia os aspectos moleculares são considerados. Por isso, existem diversas formas de classificar o subtipo de CA de mama com base nas variáveis clínico-patológicas, como, origem, tipo histológico, estado linfonodal regional (invasão vascular linfática), estadiamento (TNM) (*tumor, nodes, metastasis classification*) e Índice de proliferação Ki67 (Lima, Silva e Oliveira, 2024). A estratificação molecular do câncer de mama é baseada na presença ou ausência dos marcadores para receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e fator de crescimento epidérmico humano (HER2) observados utilizando-se a técnica de imunohistoquímica (IHQ). Além disso, por esta mesma técnica é possível investigar indicadores de prognósticos, como é o caso do índice de Ki67 (antígeno nuclear de células em proliferação) (Oliveira, 2024).

Diante desse cenário, torna-se imprescindível pesquisas voltadas o câncer de mama, uma vez que se trata de uma doença complexa, caracterizada pela heterogeneidade, com

diferentes morfologias, características moleculares e biológicas, cursos clínicos e prognósticos (Zhang *et al.*, 2023).

### 1.1.1 Subtipos moleculares

Historicamente, os subtipos moleculares começaram a ser classificados a partir do estudo de Perou *et al.* (2000), que utilizaram microarranjos de DNA para avaliar amostras de pacientes com câncer de mama. Neste estudo, foram propostos quatro subtipos moleculares, sendo estes: estrógeno (ER)+/luminal-like, basal-like, também chamado de triplo negativo (o (ER- / PR- / HER-), HER+ e mama normal (Perou *et al.*, 2000). Em estudos posteriores, o luminal like foi subdividido em luminal A e luminal B (Sorlie *et al.*, 2003).

Tais subtipos apresentam diferenças na expressão desses marcadores moleculares, além de padrões histológicos, características clínico-patológicas e prognósticos variados, e consequentemente, possuem respostas ao tratamento diferentes. Por isso, a investigação de cada subtipo é uma ferramenta útil para o direcionamento do tratamento (Zhang *et al.*, 2023). Essas divergências entre as características clínico-patológicas, bem como os prognósticos entre os subtipos moleculares são explicadas pelas peculiaridades a nível molecular. De forma resumida, a classificação dos diferentes subtipos moleculares está sintetizada no **Quadro 1**.

**Quadro 1** - Classificação dos subtipos moleculares de aproximação baseados pela expressão de biomarcadores pela técnica de imuno-histoquímica segundo *ST Gallen* 2013.

Subtipo molecular	Receptor de Estrogênio (ER)	Receptor de Progesterona (PR)	HER2
Luminal A	Positivo e/ou	Positivo	Negativo
Luminal B	Positivo e/ou	Positivo ou negativo <sup>a</sup>	Negativo
Luminal B / HER2	Positivo e/ou	Positivo ou negativo <sup>a</sup>	Positivo
HER 2-enriquecido	Negativo	Negativo	Positivo
Triplo negativo (TPN)	Negativo	Negativo	Negativo

**Fonte:** adaptado de GOLDBIRSCHE *et al.*, 2013. Legenda: <sup>a</sup>: PR<20% e Ki-67>14%; <sup>b</sup>: qualquer valor de PR e Ki-67. Legenda: ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2).

Os tumores luminais A apresentam um melhor prognóstico, por apresentar características clínico-patológicas mais favoráveis (exemplo, menor tamanho tumoral, baixo grau histológico, estágios iniciais, além de menor índice de metástase linfonodal e à distância), com taxas de sobrevivência elevadas e índices de recorrência reduzidos. Este subtipo é caracterizado por possuir receptores hormonais positivos (estrogênio e progesterona), o que possibilita o uso de terapia hormonal. Além disso, apresentam negatividade para a expressão de HER2, e baixos níveis de Ki67 (Lima, Silva e Oliveira *et al.*, 2024). Já o subtipo luminal B é positivo para os receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e expressa HER2. Este subtipo apresenta características clínico-patológicas favoráveis, porém, inferior ao luminal A, por mostrar um alto índice de metástase linfonodal, com um comportamento mais agressivo e proliferativo (Lima, Silva e Oliveira *et al.*, 2024).

O subtipo superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) possui elevada expressão da oncoproteína HER2. Este subtipo está associado ao segundo pior prognóstico em comparação aos outros subtipos, por apresentar um alto potencial metastático. Contudo, o uso de terapia alvo-específica, como o trastuzumabe, tem melhorado o prognóstico dos pacientes (Cirqueira *et al.*, 2011). Por fim, o último subtipo molecular é o triplo negativo (TN), é considerado de pior prognóstico e com taxa de sobrevida reduzida, por ser extremamente invasivo. O TN é caracterizado pela ausência dos receptores de estrógeno, de progesterona e da molécula HER2 por imunohistoquímica, e o seu tratamento ainda permanece limitado. Apesar dos avanços, ainda não existe um tratamento específico para esse tipo. Dessa forma, estudar os mecanismos moleculares envolvidos neste subtipo é fundamental para contribuir com o avanço no desenvolvimento de novas alternativas de tratamento e de marcadores prognósticos (Fragomeni, Sciallis e Jeruss, 2018).

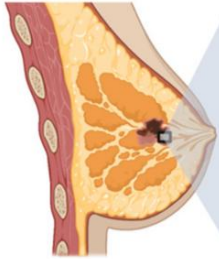

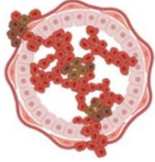

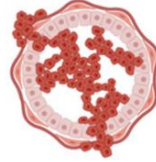
### ***1.1.2 Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN)***

O Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN), também chamado de *basal-like*, é considerado o subtipo com as piores características clínico-patológicas, por apresentar maior tamanho tumoral, elevado grau histológico e estágios mais avançados (Oliveira, 2024). No Brasil, o CA de mama representa 29,5% do número total de cânceres entre mulheres. Deste total, o CMTN representa 15% dos casos. Este subtipo apresenta uma maior incidência em mulheres negras, bem como um pior prognóstico quando comparado a mulheres brancas com CMTN (INCA, 2024).

Os pacientes diagnosticados com este subtipo apresentam uma taxa de sobrevida reduzida, com uma taxa de mortalidade de 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. Embora, este subtipo apresenta baixa disseminação metástase linfonodal (Lima, Silva e Oliveira, 2024; Oliveira, 2024). Em razão do perfil molecular (ER-/PR-/HER2-), esse subtipo não responde aos tratamentos hormonais e as terapias moleculares.

Com o avanço das pesquisas, foi possível estabelecer por meio da análise genômica e epigenômica, a classificação em quatro variações, sendo estes: *basal-like 1*, *basal-like 2*, mesenquimal e andrógeno luminal, apresentando variações de acordo com a expressão de diferentes genes, os quais estão ilustrados na **Figura 4** (Mahmoud, Ordóñez-Morán e Allegrucci, 2022).

**Figura 4** - Subtipos do câncer de mama triplo negativo, com as principais características histológicas, marcadores e vias de sinalização.

<b>Heterogeneidade do Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN)</b>				
	<b>Subtipo 1 Basal-Like (BL-1)</b>	<b>Subtipo 2 Basal-Like (BL-2)</b>	<b>Subtipo Mesenquimal (M)</b>	<b>Subtipo de receptor de androgenio luminal (LAR)</b>
				
<b>Histopatologia principal</b>	Carcinoma Medular	Carcinoma Metaplásico	Filódios malignos	Lobular invasivo
<b>Marcadores e vias</b>	Citoqueratinas basais (KRT5, 6A, 6B, 14, 16, 17, 23 e 81) Sinalização de NOTCH1/1/2	Citoqueratinas basais, sinalização metabólica e sinalização de fatores de crescimento (MET, EGFR, etc.)	Elevados genes associados à EMT e às células estaminais (Wnt/B-catenina, TGFb, etc.) e genes de fatores de crescimento	Citoqueratinas luminais (KRT7, 8, 18 e 19) e marcadores luminais (XBP1 e FOXA1)

Fonte: Mahmoud, Ordóñez-Morán e Allegrucci, 2022.

A partir desses subtipos é evidente a heterogeneidade a nível transcricional de cada subtipo. Tais características irão impactar no desfecho clínico e patológico do paciente. Contudo, na rotina laboratorial ainda não é possível identificar esses subtipos do Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN) nas biópsias dos pacientes. Entretanto, nas linhagens celulares utilizadas em estudos *in vitro* é possível classificar em dois subtipos, *basal-like A* e *basal-like B*. Exemplo disso, seria a linhagem MDA-MB-231, considerada do tipo basal-like B. Apesar dos esforços,

o CMTN não possui um tratamento específico. Apesar disso, em decorrência da alta taxa de renovação celular, representado pelo alto índice de proliferação de Ki67, alguns pacientes apresentam uma alta taxa de resposta à quimioterapia. Diante disso, é imprescindível dar continuidade a pesquisa de marcadores moleculares.

Dentre os subtipos moleculares, sabe-se que o câncer de mama triplo negativo apresenta um difícil manejo clínico em decorrência da ausência dos receptores hormonais e da proteína HER2, as opções de tratamento ficam limitadas. Os esquemas de terapia utilizados nesses pacientes são baseados em antraciclinas, como AC-T, outra opção é o esquema AC em dose densa (ddAC). Além disso, os esquemas de quimioterapia neoadjuvante e adjuvante com carboplatina melhoraram a sobrevida global e a sobrevida livre de doença nos pacientes com câncer de mama triplo negativo inicial (Mason *et al.*, 2023) sendo mais indicados para pacientes com axila positiva (Brasil, 2024) e tumores triplo negativos com mutação germinativa no gene de reparo *BRCA*. Contudo, os regimes à base de carboplatina estão relacionadas a uma maior toxicidade hematológica e neuropática, frequentemente resultando em redução da dose e atrasos no tratamento quimioterápico (Mason *et al.*, 2023).

Diante disso, os possíveis esquemas terapêuticos disponibilizados pelo SUS através do PCDT para quimioterapia (neoadjuvante e adjuvante) em pacientes com câncer de mama inicial ou localmente avançado triplo-negativo estão organizados no **Quadro 2**, abaixo.

**Quadro 2** - Descrição do esquema de quimioterapia (neoadjuvante e adjuvante) em pacientes com câncer de mama (continua).

<b>Sigla</b>	<b>Descrição do esquema de quimioterapia</b>
AC	doxorubicina + ciclofosfamida
AC-T	(doxorubicina + ciclofosfamida) com ou sem fatores estimuladores de colônias de macrófagos/granulócitos seguido de docetaxel ou paclitaxel
AC em dose densa (ddAC)	(doxorubicina + ciclofosfamida) seguido por paclitaxel (semanal ou a cada 2 semanas) (podendo-se alterar a sequência)
CMF	(ciclofosfamida + metotrexato + 5-fluorouracil)

**Quadro 2** - Descrição do esquema de quimioterapia (neoadjuvante e adjuvante) em pacientes com câncer de mama (conclusão).

Sigla	Descrição do esquema de quimioterapia
TC	(docetaxel + ciclofosfamida)
-	Capecitabina (doença residual)
T seguido de AC	C (paclitaxel seguido de doxorubicina + ciclofosfamida)
CMF	(ciclofosfamida associada ao metotrexato + 5-fluorouracil) (pacientes idosas)
PCb	(paclitaxel associado à carboplatina)
-	Docetaxel + carboplatina

Fonte: Adaptado de CONITEC, 2024.

Observa-se que as antraciclina (doxorubicina, epirubicina) e os taxanos (paclitaxel, docetaxel) estão presentes em grande parte dos esquemas de quimioterapia (neoadjuvante e adjuvante). Esses antineoplásicos são fármacos citotóxicos, que não afetam apenas as células cancerígenas, e por isso, possuem diversos efeitos colaterais observados na clínica, além da quimiorresistência e toxicidade a longo prazo. Nesse contexto, a resposta imunológica do paciente tem uma relação direta com a progressão da doença e com o seu desfecho clínico. Atualmente, no laudo anatomopatológico, a quantidade de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) nas amostras de *core-biopsy* das pacientes com CMTN é utilizada como fator preditivo e prognóstico de resposta a QTneo (Bense *et al.*, 2017).

Nesse sentido, após anos de pesquisa voltado para a modulação do sistema imunológico surgiu o quinto pilar terapêutico no câncer: a imunoterapia (Schadendorf *et al.*, 2015). Dessa maneira, foi lançada como nova perspectiva terapêutica os anticorpos monoclonais. Nos últimos anos a incorporação de fármacos imunoterápicos inibidores de ponto de checagem imunológica (*checkpoint inhibitors*) aumentaram a sobrevida dos pacientes em diversos tipos de cânceres (Tavares *et al.*, 2021).

A imunoterapia surgiu para revolucionar o tratamento do câncer, uma vez que modula o sistema imunológico para combater a doença. Os tumores conseguem evadir o sistema

imunológico ao expressar marcadores de superfície, como o PD-L1 (ligante do *programmed cell death receptor-1*). Quando o PDL-1 se liga ao seu receptor PD-1 (presente nas células T) ocorre uma contrarregulação da ativação de células T, levando à sua inibição e morte, permitindo a manutenção das células tumorais. Dessa forma, os inibidores de PD-1 (pembrolizumabe e nivolumabe) e PDL-1 (atezolizumabe, avelumabe e durvalumabe) revolucionaram o tratamento dos pacientes com câncer. Estudos clínicos mostraram uma melhora significativa na sobrevida livre da progressão da doença e na sobrevida global das pacientes com CMTN, especialmente quando combinados à quimioterapia citotóxica. Diante disso, tem-se intensificado os ensaios clínicos voltados para a combinação dos imunoterápicos com quimioterápicos citotóxicos, visando buscar novas abordagens terapêuticas para o CMTN (Schmid *et al.*, 2018).

## **1.2 Inflamação e câncer: um elo crucial na carcinogênese**

No contexto do câncer de mama, a detecção de níveis séricos de várias citocinas está sendo estudada para seu uso como biomarcadores de prognóstico de doenças, uma vez que, diversas citocinas estão sendo relacionadas com progressão tumoral (França, Lacerda e Lacerda *et al.*, 2024). Portanto, se sabe que as citocinas são importantes mediadores na comunicação das células neoplásicas com o microambiente tumoral, tornando-se imprescindível estudá-las.

O estudo de marcadores moleculares tornou-se imprescindível no contexto do câncer, uma vez que permite a compreensão dos mecanismos biológicos de desenvolvimento tumoral, bem como realizar a busca de novos biomarcadores prognósticos para serem incorporados na clínica (Freitas *et al.*, 2024). Assim, investigar as populações celulares e o papel de citocinas moduladoras envolvidas no microambiente tumoral é fundamental para compreender a evolução da doença.

A citocina IL-33, que, nos últimos anos, ganhou destaque por seu papel ambíguo no câncer ora pró-tumoral e ora anti-tumoral, a depender do cenário. A via de sinalização citocinas/receptor, IL-33/ST2, desempenha um papel importante em diversas condições, como por exemplo, em alergias, obesidade, doenças de Alzheimer e câncer (Yi, Lian e Li *et al.*, 2022). Tal citocina vem sendo estudada em diferentes tipos de câncer, tais como, câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de mama e câncer de cólon, visando compreender o seu papel na biologia tumoral. Na literatura algumas pesquisas já demonstraram que o sinal de IL-33/ST2 facilita a progressão do câncer e remodela o microambiente tumoral (TME) imunossupressor,

participando assim do desenvolvimento e da manutenção de células imunossupressoras (Nan *et al.*, 2024).

No contexto do câncer de mama tem-se estudado a contribuição da IL 33 na progressão e metástase, assim como sua influência no microambiente e metabolismo tumoral. Na literatura, já existem estudos que buscam investigar as implicações da IL-33/sST2 (receptor da IL-33 na forma solúvel). Curiosamente, foram encontradas concentrações séricas de IL-33 e sST2 aumentadas em pacientes com CA de mama. Além disso, foi encontrado uma correlação forte dessas concentrações com o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), uma proteína importante para o processo de angiogênese, contribuindo para o crescimento e progressão tumoral (Stojanovic *et al.*, 2023). Esses achados evidenciaram o papel desse eixo IL-33/sST2 nesse contexto. Nos tópicos seguintes serão esclarecidas as principais características desse eixo (IL-33/ST2), bem como os achados na literatura no cenário do CMTN.

### **1.2.1 Eixo IL-33/ST2**

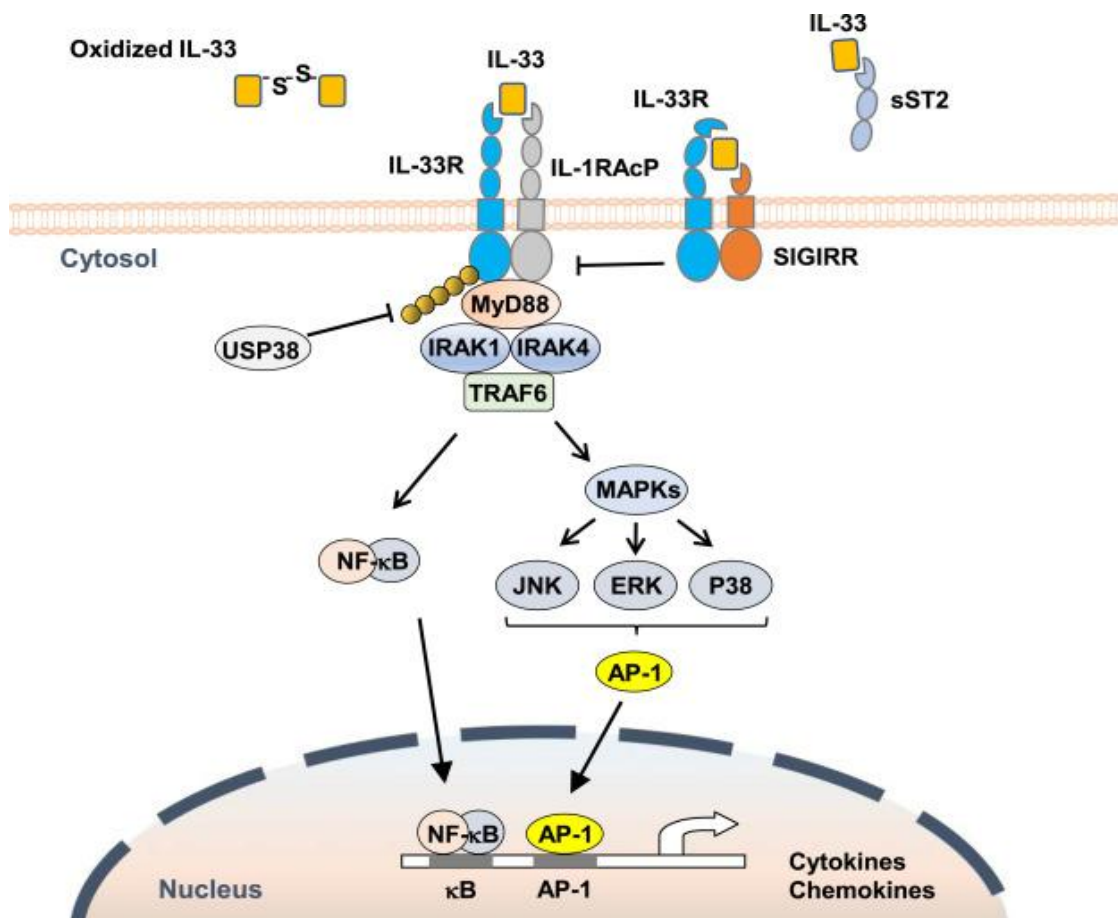
A interleucina-33 (IL-33), também conhecida como IL-1F11, faz parte da família das citocinas IL-1, essa é liberada ativamente para o meio extracelular como alarmina após um dano celular ou estresse, e por isso é conhecida por participar da resposta imune inata (Haghbin *et al.*, 2023). A família de genes IL-1 é conhecida pelo seu papel na resposta inflamatória (Silva, 2021). Essa família é composta por 11 membros, sendo eles: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-18, IL-33, IL-36 RA, IL-36  $\alpha$ , IL-36  $\beta$ , IL-36  $\gamma$ , IL-37 e IL-38. A IL-33 é expressa constitutivamente em células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, adipócitos, cardiomiócitos, e em algumas células do sistema imune, como, macrófagos, mastócitos e natural killer. Já em órgãos, pode ser detectada em órgãos linfoides, cérebro, pulmão, tecidos de barreira epiteliais e tecidos inflamados (Yi, Lian e Li, 2022).

O receptor celular da IL-33 (IL-33R), também conhecido como ST-2 (do inglês, *suppression of tumorigenicity 2*), possui quatro isoformas, sendo elas: IL-33R de comprimento total, sST2, ST2V e ST2LV. Dessa forma, cada isoforma possui características distintas, quanto a sua ligação a IL-33. A IL-33R de comprimento total refere-se a forma transmembrânica, a qual possui um domínio intracelular e transmembrana. Este tipo está expresso em várias células imunes, como macrófagos, natural killer (NK) (Yi, Lian e Li, 2022). Já a forma solúvel (sST2) não apresenta domínios intracelulares e transmembranares, apenas uma sequência C-terminal de nove aminoácidos. Neste contexto, o sST2, sendo um receptor solúvel, impede a transdução de sinal induzida pela IL-33 dentro da célula, e assim evitando a ativação de respostas celulares.

Normalmente, em condições fisiológicas, o sST2 é encontrado na forma glicosilada. Já o ST2V é encontrado na superfície celular do estômago humano, intestino delgado e cólon, e por último, a isoforma ST2LV foi encontrada apenas em frangos (Yi, Lian e Li, 2022).

Quanto às vias de sinalização, sabe-se que essa citocina atua como uma alarmina, ou um DAMP (padrão molecular associado ao dano), e é secretada após lesão celular ou infecção. O processo de sinalização da IL-33 é iniciado pela mudança conformacional desencadeada pela IL-33 ao se ligar com o IL-33R transmembranar (ST-2), seguida do recrutamento de IL-1RAcP. Este complexo recruta a sinalização de proteínas, como MyD88 e TRAF6, e em seguida ativa quinases associadas à IL-1R, como IRAK1 e 4. Essas quinases, NF- $\kappa$ B e MAP quinase (MAPK), que resultam em sinais biológicos que colaboram na transcrição de diversas citocinas e quimiocinas (Pisani *et al.*, 2021; Yi, Lian e Li, 2022). Por outro lado, o receptor solúvel (sST2) compete com o IL-33R pela ligação com o ligante (IL-33) (Figura 5).

**Figura 5** – Vias de sinalização da IL-33/ST2.



Fonte: Yi, Lian e Li, 2022. Notas: SIGIRR: interrompe a ligação do IL-33R e IL-1RAcP. USP38: atua como regulador negativo da sinalização da IL33, promovendo uma regulação negativa da IL-33R.

Diferentemente de outras citocinas da família IL-1, a IL-33 é capaz de induzir respostas imunes do tipo Th2, uma vez que o seu receptor (ST2) está expresso seletivamente nas células T do tipo 2, Treg e células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2). Sua interação com o seu receptor ST2 estimula a ativação de mastócitos e linfócitos T auxiliares Th2 nos tecidos em processos inflamatórios agudos e crônicos. (Pedrosa, 2017). No trabalho de Rank e colaboradores, foi demonstrado a influência da IL-33 através da ativação de células dendríticas murinas na polarização das células T NAIVE para o fenótipo Th2 (Rank *et al.*, 2009).

Em um estudo com câncer de pulmão pré-clínico foi observado que o bloqueio da IL-33 inibiu o crescimento tumoral, além de revogar a polarização de macrófagos associados a tumores (TAMs) M2, inibindo a expressão de genes relacionados ao M2 (arginase-1, IL-10 e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)) e reduzir o acúmulo de células T reguladoras (Tregs) no microambiente tumoral (TME) (Wang *et al.*, 2017). Em um estudo clínico, Sun e colaboradores (2011) avaliaram pacientes com câncer gástrico e relacionaram o aumento da IL-33 plasmática a estadiamentos mais avançados (Sun *et al.*, 2011).

Nos estudos de correlação da IL-33 e os cânceres de mama, foram observadas concentrações séricas aumentadas de IL-33 e sST2 (receptor solúvel) no soro dos pacientes em comparação com indivíduos saudáveis. Outro achado importante encontrado foi a correlação do VEGF, fator este importante para o processo de angiogênese, com as concentrações séricas de IL-33 e sST2 (Larsen *et al.*, 2018).

Nos estudos do Câncer de Mama Triplo Negativo, a interleucina-33 está ganhando notoriedade, principalmente, pela sua associação com a proteína FOXP3 (do inglês, *Forkhead Box P3*) presentes células T reguladoras (Tregs), um subtipo de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs).

Apesar disso, os mecanismos de regulação da IL-33 no microambiente tumoral em humanos não são bem compreendidos (Gorbacheva, Kuprash e Mitkin, 2021). Por isso, é importante dar continuidade aos estudos dessa citocina.

### **1.2.2 Macrófagos associados ao tumor e o microambiente tumoral**

Uma das células imunológicas mais bem documentadas presentes no microambiente tumoral e associadas a diferentes estágios na progressão neoplásica é o macrófago (Noy e Pollard, 2014). Os macrófagos são células com habilidades fagocitárias que desempenham um papel dual, em decorrência da sua alta plasticidade fenotípica. Existem dois subtipos de macrófagos que se distinguem entre si, desde a expressão de receptores de

superfície até a liberação de citocinas, são eles: o macrófago M1 e o macrófago M2 (Boutillier e Elsawa, 2021).

A dualidade intrínseca do macrófago confere uma plasticidade significativa no contexto das diferentes doenças, especialmente, no câncer, visto que sua patogênese envolve um perfil inflamatório com diversos fatores, estímulos e moléculas envolvidas (Pan *et al.*, 2020). Os macrófagos possuem uma participação ativa na inflamação, resposta imune e manutenção da homeostase tecidual. Portanto, dependendo dos estímulos ou condições do TME, os macrófagos irão polarizar para M1 ou M2 (Pan *et al.*, 2020).

Os macrófagos com perfil M1 são células pró-inflamatórias, que possuem resposta imediata na imunidade inata contra invasão patogênica e são capazes de orquestrar respostas citotóxicas nas células neoplásicas, além de produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina 1 e 12 (IL1, IL-12) (Boutillier e Elsawa, 2021). Portanto, o fenótipo M1 exerce um papel anti-tumoral, e promovendo uma resposta imune do tipo I. Já os macrófagos com perfil M2 são células anti-inflamatórias e regulam a remodelação tecidual, angiogênese e cicatrização de feridas, e por isso são considerados pró-tumorais (Noy e Pollard, 2014). Esses macrófagos possuem como perfil de secreção de citocinas a IL-4 e a IL-13, que são envolvidas em processos anti-inflamatórios.

Boutillier e Elsawa (2021) postulam que as condições do TME que estimulam a polarização do macrófago envolvem inflamação e hipóxia. Nesse sentido, já é sabido que o principal de macrófagos associados aos tumores (TAMs) é o M2. Os TAMs representam mais da metade da população no microambiente tumoral, facilitando o estabelecimento e o desenvolvimento do tumor (Aras e Zaidi, 2017). Nesse aspecto, Rahal e colaboradores (2018), por meio de seus achados, acreditam que é possível levantar questionamentos sobre a contribuição dos TAMs às respostas refratárias ao tratamento quimioterápico. Dessa forma, dar continuidade aos estudos que investigam sobre esse papel é fundamental.

Nos últimos anos, o estudo sobre o papel dos TAMs no câncer triplo negativo vem ganhando destaque, uma vez que, se intensificou a busca de novas abordagens terapêuticas. Nesse sentido, as pesquisas voltadas para o tratamento que abrange as células imunes presentes no microambiente tumoral, tem se intensificado pela facilidade dessas células acessares a arquitetura do tumor (Xiao e Yu, 2021).

Como não é possível discorrer sobre câncer e microambiente tumoral sem envolver uma cascata inflamatória inerente a eles, hipotetizou-se, neste trabalho, um protagonismo dos macrófagos na produção e liberação de IL-33 como potencializador da evolução agressiva dos tumores triplo-negativos. A expressão de IL-33 pode ser pesquisada

com associação aos macrófagos, pois já está bem documentado que eles são capazes de produzi-la ativamente e liberá-la em resposta a lesões e danos no ambiente em que se encontram, especialmente, por meio da resposta imune anti-tumoral (Gao *et al.*, 2015). Ou ainda, elas podem ser liberadas pelas células neoplásicas e interferirem nas respostas dos macrófagos no sítio adjacente ao tumor. Fang Min e colaboradores (2017) observaram que a IL-33 foi capaz de recrutar macrófagos para o TME e estimular a produção de prostaglandina E2, contribuindo com a estaminalidade do câncer de cólon e o desenvolvimento tumoral.

Diferentes estudos têm focado na presença de macrófagos no TME, na IL33 como influenciadora na doença e até mesmo no curso patológico do CMTN. No entanto, este trabalho se torna inovador porque busca investigar a expressão de IL-33 no carcinoma triplo-negativo, a partir de amostras teciduais de pacientes e em células de macrófagos (RAW 264.7).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão de IL-33 e ST2 em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo e sua correlação com parâmetros clínicos-patológicos, assim como a sua modulação em linhagens de macrófagos.

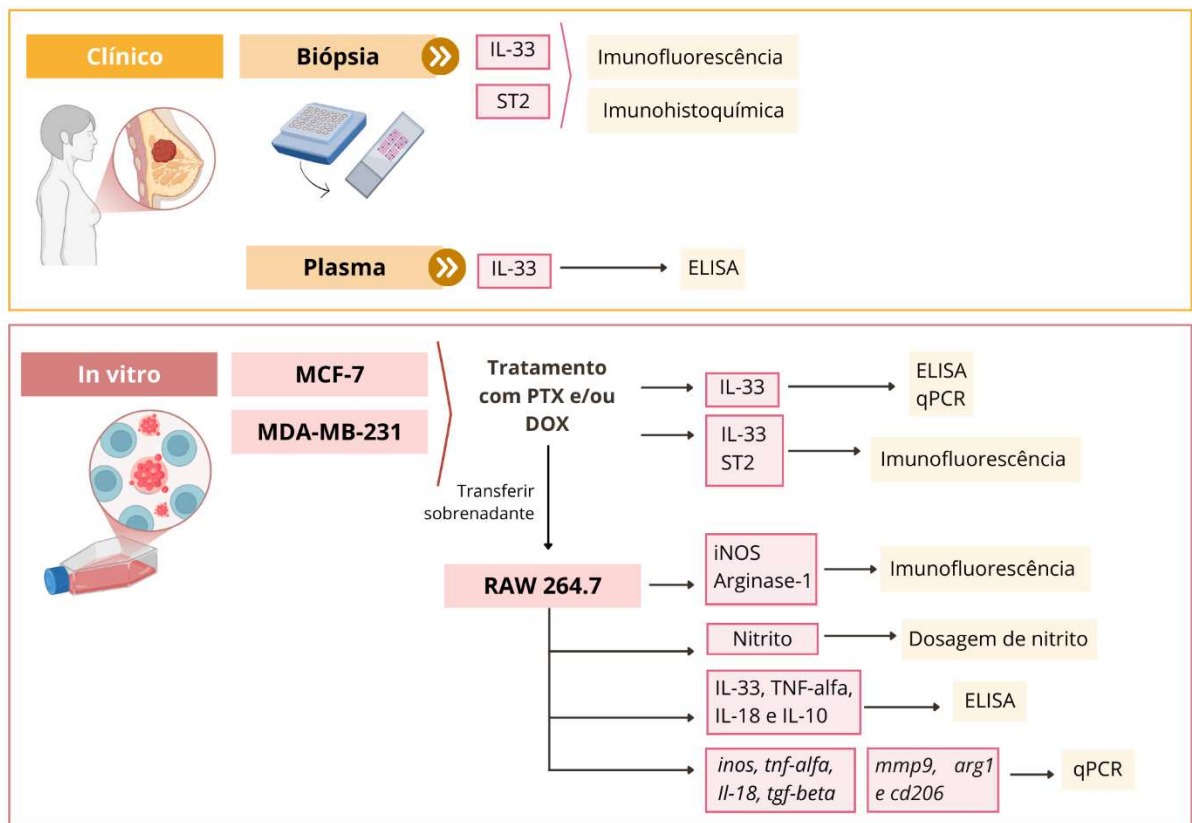
### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil dos pacientes de acordo com as variáveis incluídas no estudo;
- Avaliar a expressão intracelular de IL-33 e ST2 por imuno-histoquímica e imunofluorescência em biopsias de pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN);
- Associar os parâmetros clínicos-patológicos com a intensidade de expressão de IL-33 e ST2;
- Analisar a curva de sobrevida global dos pacientes com CMTN de acordo com a expressão de IL-33
- Avaliar o nível de expressão intracelular de IL-33 e ST2 em linhagens celulares de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) e não triplo negativo (MCF-7) incubadas com doxorubicina e paclitaxel;
- Analisar o fenótipo de macrófago M1 ou M2 em linhagens de macrófago incubadas com sobrenadante das células tumorais triplo negativo e não triplo negativo previamente estimulados com doxorubicina ou paclitaxel.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em duas vertentes: a pesquisa clínica e experimental (*in vitro*). O fluxograma geral para a execução deste estudo está esquematizado na **Figura 6**.

**Figura 6** - Esquema geral do protocolo experimental adotado no estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: IL-33: Interleucina 33. ST2: receptor 1 do fator de necrose tumoral. MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal. MDA-MB-231: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo triplo negativo. RAW 264.7: Linhagem celular de macrófagos murinos. iNOS: óxido nítrico sintase induzível. TNF-alfa: Fator de necrose tumoral alfa. IL-18: Interleucina 18. IL-10: Interleucina 10. TGF-beta: do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*. MMP9: Metaloproteinase de matriz 9. Arg1: arginase-1. CD206: do inglês, *Cluster of Differentiation 206*.

#### 3.1 Estudo Clínico

A parte clínica envolvendo o recrutamento dos pacientes foi dividido em dois estudos independentes: estudo retrospectivo (utilizando as biopsias de mama para imunofluorescência) e prospectivo (utilizando amostras de plasma para dosagem de citocinas). Portanto, para fins de organização a metodologia experimental será comentada de forma separada:

## ESTUDO RETROSPECTIVO

### 3.1.1 Protocolo 1: Investigar a expressão dos marcadores IL-33 e ST2 por imunohistoquímica e imunofluorescência no tumor primário de paciente com CMTN

A avaliação da expressão dos marcadores IL-33 e ST2 foi feita pelas técnicas de Imunofluorescência (IF) e Imunohistoquímica (IHQ), ambas qualitativas. O esquema de trabalho para o protocolo 1 está disponível na **Figura 7** abaixo.

**Figura 7** – Resumo do protocolo experimental 1.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: IF: imunofluorescência. IHQ: Imunohistoquímica.

#### 3.1.1.1 Delineamento e local da pesquisa

Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional realizado com 73 pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo atendidos no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), localizado na cidade de Fortaleza - CE, no período de 2012 a 2020.

#### 3.1.1.2 Seleção dos pacientes

Para este protocolo, foram adotados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

- 1) Critérios de Inclusão:
  - a) Diagnóstico de Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN);
  - b) Presença do material de *core-biopsy* arquivado e conservado em bloco de parafina (em inglês, *Formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE));

- c) Idade igual ou superior a 18 anos e inferior a 85 anos.
- 2) Critérios de Exclusão:
- a) Bloco de parafina insuficiente ou indisponível;
  - b) Doença metastática ao diagnóstico;
  - c) Outra malignidade prévia;
  - d) Perda do acompanhamento.

### 3.1.1.3 Procedimento de coleta das amostras clínicas

As amostras foram obtidas a partir do material de *core-biopsy* do tumor primário do diagnóstico de pacientes, ou seja, virgem de tratamento, fixado em formalina e conservados em parafina sob domínio do Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ).

Os dados sociodemográficos, clínicos e patológicos foram obtidos a partir do prontuário físico e/ou eletrônicos arquivados na unidade. Portanto, as variáveis estudadas são divididas em:

1. Variáveis sociodemográficas: sexo (masculino, feminino), idade, raça (branca / parda/não informado).
2. Variáveis clínicas-patológicas: histórico familiar, estadiamento clínico TNM ao diagnóstico, subtipo histológico, invasão linfovascular, resposta patológica, grau histológico, índice de proliferação celular Ki-67 (< ou igual a 20% / > 20%), metástase a distância, local da metástase, resposta a quimioterapia, recidiva e óbito.

### 3.1.1.4 Análise anatomopatológico das pacientes

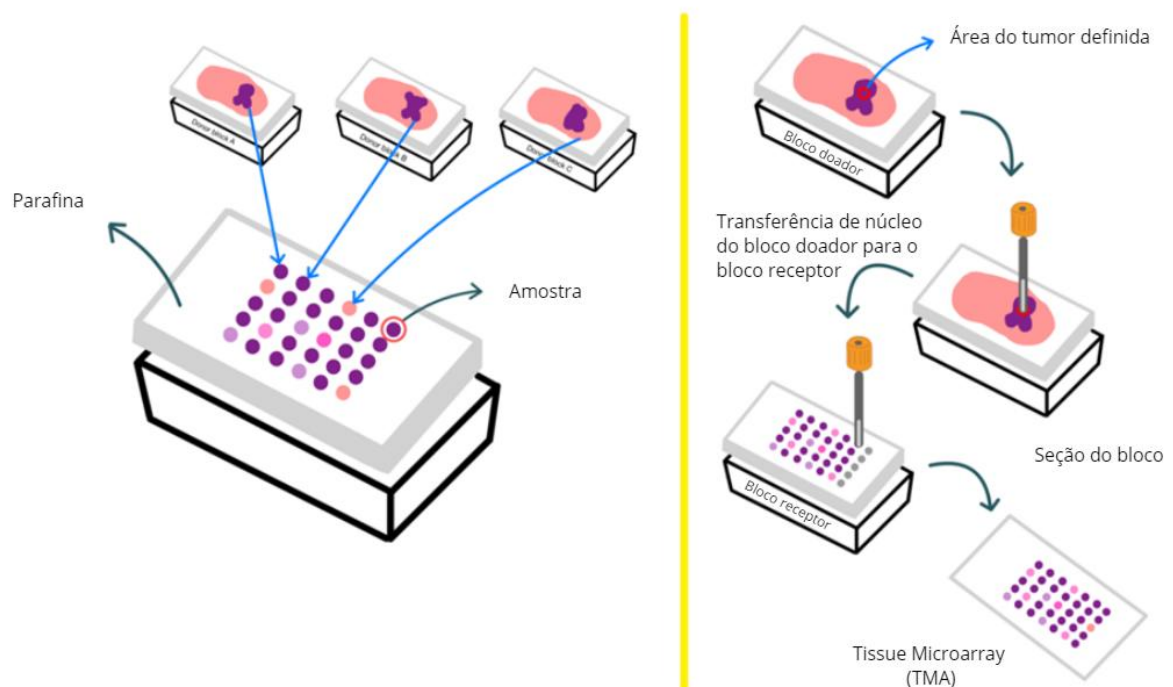
#### 3.1.1.4.1 Montagem de Tissue Microarray (TMA)

Para a realização da técnica dos blocos de microarranjos teciduais (do inglês, *tissue microarray*) que consiste em retirar um fragmento cilíndrico do tecido proveniente do bloco doador e colocar um bloco receptor, de forma a criar sequência de amostras teciduais conhecidas pelo pesquisador. Esta técnica proporciona uma diminuição dos custos envolvidos para as análises teciduais.

Para isso, os blocos de parafina e suas respectivas lâminas de HE (Hematoxilina-Eosina) foram analisados por uma patologista, a fim de realizar a marcação de duas áreas com os maiores percentuais de células tumorais. Posteriormente, uma agulha com o diâmetro de

2mm (Quick Ray, UNITMA®) foi utilizada para retirar o fragmento cilíndrico do bloco doador [bloco de parafina com biópsia/*core biopsy* de mama do diagnóstico inicial] e logo seguida foi colocado em um bloco receptor com a capacidade de 60 poços. Este bloco foi organizado da seguinte forma: controles positivos um em cada canto do bloco, totalizando 4, sendo eles: fígado, pulmão, placenta e pele; 28 casos em duplicata de CMTN. Os controles positivos foram fornecidos pelo Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ). Por fim, foram obtidos 3 blocos de TMA para esta pesquisa. O procedimento descrito acima encontra-se esquematizado logo abaixo (**Figura 8**).

**Figura 8** - Técnica do *Tissue Microarray* (TMA).



Fonte: Adaptado de MYmAb Biologics, 2024. Elaborada pela autora (2025).

A partir desses blocos de TMA foi realizado o corte histológico com espessura de 2 $\mu$ m com o equipamento micrótomo e colocados em lâminas silanizadas.

### 3.1.1.5 Avaliação da expressão dos marcadores IL-33/ST2

A princípio, foram adotadas duas técnicas, imunofluorescência indireta e imunohistoquímica para avaliar a expressão da IL-33/ST2, as quais serão descritas a seguir dos seguintes tópicos (3.5.1 e 3.5.2).

### 3.1.1.5.1 Imunofluorescência

Inicialmente, as lâminas foram colocadas na estufa por 1 hora a 65°C. Posteriormente, foi feito dois banhos em xilol por 10 minutos cada para desparafinação dos tecidos. Após isto, foi realizada a submersão das lâminas em banhos sucessivos de etanol em concentração de forma decrescente (99,98%; 90%, 70% e 50%) para retirar o excesso de xilol e promover a reidratação dos tecidos: duas vezes em álcool absoluto por 10 minutos, e depois 1 banho de etanol nas concentrações 90%, 70%, 50% por 05 minutos cada. Encerrado esse processo, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguido de 03 banhos de salina tamponada com fosfato (PBS) (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*). Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0), a 95°C por 18 minutos em banho-maria. Para tal, as lâminas foram imersas em um recipiente contendo o tampão, de modo a garantir a submersão total.

Decorrido esse tempo, as lâminas foram retiradas do banho-maria e mantidas submersas no tampão para o resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS de 5 minutos cada. Em seguida, realizou-se a permeabilização da membrana celular por 10 minutos com uma solução contendo 200 mL de PBS, 4 mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 5 % (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 200 µL de Triton X-100 (0,1%) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com PBS de 5 minutos cada. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com Glicina 0,3 M (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em BSA 5% por 30 minutos. Finalizado isso, foi colocado 200µL do anticorpo primário feito em mouse anti-IL-33 (diluição 1:200, MA5-15772, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e rabbit anti-ST-2 (diluição 1:400, PA5-20077, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em cada lâmina para a incubação durante a noite (*overnight*) na geladeira (4°C).

No dia seguinte, retirar as lâminas da geladeira e deixar resfriar em temperatura ambiente por 20 minutos. Após isso, foram realizadas 3 lavagens com PBS, cada uma com duração de 5 minutos. Na sequência, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário goat anti-IgG mouse ou rabbit Alexa Fluor 568 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em amostras separadas, na diluição de 1:400, durante 1 hora e 30 minutos. Finalizado esse tempo, foi realizada a incubação do DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole, marcador de núcleo (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, EUA), durante 30 minutos, na proporção 4 µl em 200 ml de PBS (1X), seguido por 3 lavagens de água destilada de 5 minutos cada.

Para montagem das lâminas, utilizou-se o meio Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para preservar a fluorescência nas amostras.

Por fim, as lâminas foram fotografadas no leitor multiespectral (Cytation™ 3, BioTek, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) disponibilizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NDPM). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio de um “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA).

A metodologia aplicada para execução da imunofluorescência está esquematizada logo abaixo (**Figura 9**):

**Figura 9** - Fluxograma resumido da metodologia de imunofluorescência.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

### 3.1.1.5.2 Imunohistoquímica

De forma similar a técnica de imunofluorescência descrita anteriormente. Primeiramente, as lâminas foram a estufa por 1 hora a 65°C. Em seguida, as lâminas foram submetidas a dois banhos de xilol para desparafinização por 3 minutos cada. As lâminas

seguiram para a hidratação com etanol, ou seja, banhos sucessivos em ordem decrescente de concentração, obedecendo a ordem: álcool absoluto, 95%, 70% por 3 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram colocadas em água corrente por 10 minutos, seguido de 03 banhos de PBS (1X) de 3 minutos cada. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0), a 95°C, por 18 minutos em banho-maria, seguidas do resfriamento por 20 minutos a temperatura ambiente ainda submersos em solução tampão. Após isto, foram feitos 3 banhos de PBS (1X) de 3 minutos cada. Finalizado isso, foi retirado o excesso de PBS com papel toalha por capilaridade nas bordas de cada lâmina. Feito isto, foi pipetado 250µl de peróxido de hidrogênio 3% sob cada tecido e esperar agir por 30 minutos.

Em seguida, foram realizados 2 banhos de PBS (1X) por 3 minutos cada. Após os banhos, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com BSA 5% (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), que foi deixado agir por 20 minutos. Após esse tempo, foram pipetados 200µl nas respectivas lâminas com os anticorpos primários: em mouse anti-IL-33 (diluição 1:200, MA5-15772, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e rabbit anti-ST-2 (diluição 1:200, PA5-20077, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), onde permaneceram durante a noite (*overnight*) na geladeira (4°C) em câmara úmida com PBS (1X) no fundo.

No dia seguinte, a câmara úmida com as lâminas foi retirada da geladeira para resfriar à temperatura ambiente por 20 minutos. Decorrido esse tempo, foram realizadas 3 lavagens com PBS (1X) por 5 minutos cada. Em seguida foi retirado o excesso de PBS (1X) com papel toalha. Feito isto, o anticorpo secundário goat anti-IgG mouse ou rabbit ligado a peroxidase (SM802, EnVision FLEX/HRP, Dako®, Copenhagen, Dinamarca) foi incubado por 30 minutos à temperatura de 22°C a 25°C e após essa etapa as lâminas foram lavadas 4 vezes com PBS (1X) por 5 minutos cada.

Após isso, para a revelação da coloração foi aplicado o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) (K8000, K8002 ou K8023, EnVision FLEX DAB+CHROMOGEN, Dako®, Copenhagen, Dinamarca) com o seu respectivo diluente (SM803, EnVision FLEX, Dako®, Copenhagen, Dinamarca). A coloração “marrom” foi então observada a “olho nu”. A reação foi interrompida mergulhando as lâminas em água destilada por 5 minutos e a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris à temperatura ambiente por 45 segundos. Vale ressaltar que o controle negativo da reação foi processado simultaneamente para assegurar resultados falso-negativos e excluir “reação cruzada”. Em seguida, para retirar o excesso de hematoxilina da etapa anterior, que pode interferir na visualização do tecido. Para tal, foi feito

1 banho de água destilada com 6 gotas de acetona por 10 segundos, seguida de 1 banho de água destilada por 5 minutos.

Por fim, os tecidos foram desidratados em álcool (95% e Álcool absoluto) por 10 segundos cada, seguidos de 1 banho de xilol, também por 10 segundos. Logo em seguida, foi iniciado o procedimento para a montagem das lâminas. Para montar as lâminas, foi necessário pingar uma gota de Entellan (REF 107961, Merk®, Darmstadt, Alemanha) sobre o tecido, a fim de preservar e facilitar a visualização no microscópio; em seguida, foi encaixada a lamínula.

Finalizadas as lâminas, foi iniciada as fotomicrografias no microscópio óptico DM2000, Leica®, Alemanha, (200x e 400x) acoplado à câmera digital (DFC295, Leica®, Wetzlar, Alemanha) com o software Nikon Infinity Analyze™ para posterior quantificação da área da expressão dos marcadores IL-33 e ST2.

Além disso, as lâminas foram encaminhadas para avaliação do Patologista MPSSC que classificou os tecidos quanto à intensidade de expressão a partir de um sistema de escores graduados de 0 a 3, conforme **Quadro 3** abaixo.

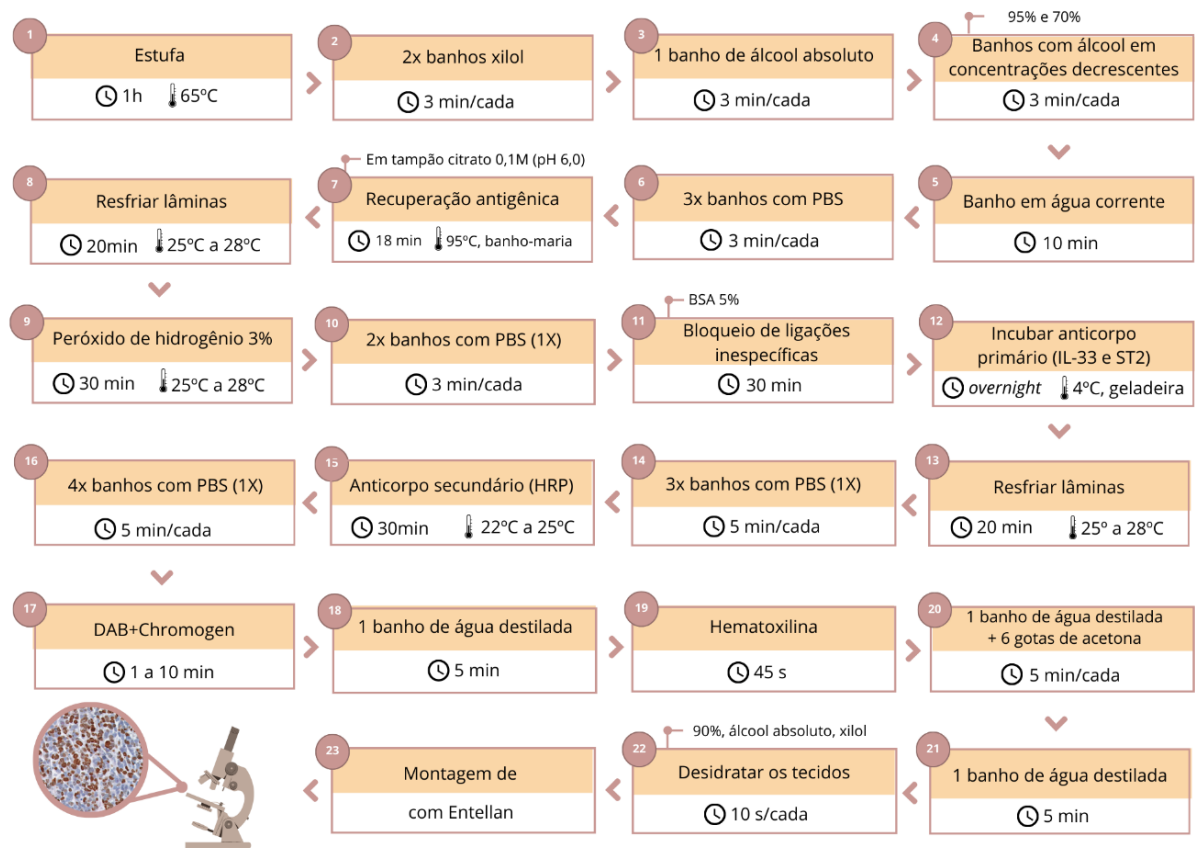
**Quadro 3** - Intensidade de expressão da marcação por imunohistoquímica.

<b>Intensidade de expressão</b>	<b>Graduação</b>
0	marcação em menos de 5% das células tumorais.
1	marcação discreta em mais de 5% ou moderada em menos de 50% das células tumorais.
2	marcação moderada em mais de 50% das células ou intensa em até 50% das células tumorais.
3	Marcação intensa em mais de 50% das células tumorais.

Fonte: Febrônio, 2024.

A metodologia aplicada para execução da imunohistoquímica está esquematizada logo abaixo (**Figura 10**):

**Figura 10** - Fluxograma resumido da metodologia de imunohistoquímica.

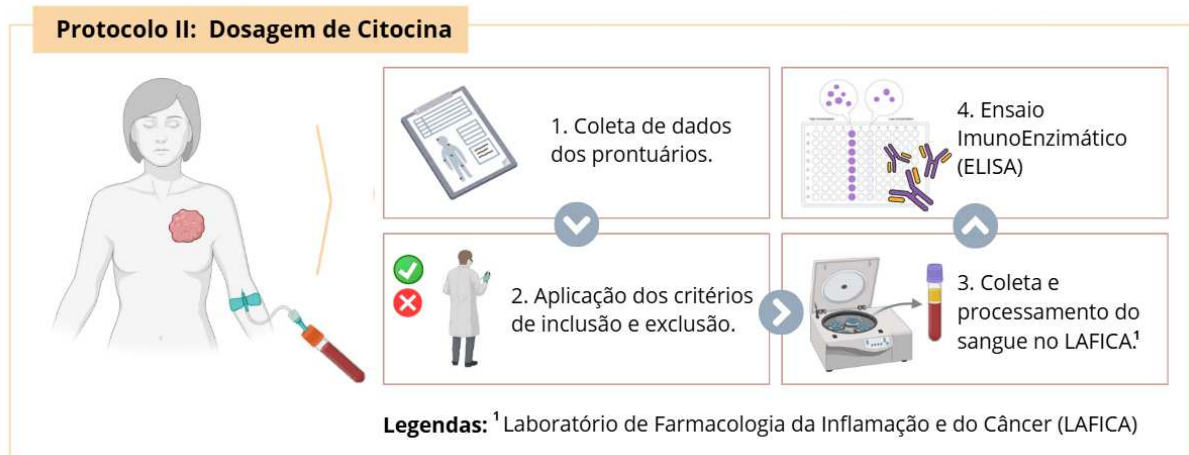


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

### 3.1.2 Protocolo 2: Dosar a interleucina 33 no plasma das pacientes com câncer de mama Luminais e Triplo-negativo.

A dosagem de IL-33 foi realizada por ELISA (técnica quantitativa) para quantificar os níveis plasmáticos dessa interleucina no plasma dos pacientes. O esquema de trabalho para o protocolo 2 está disponível na **Figura 11** abaixo.

**Figura 11** - Resumo do protocolo experimental 2.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: ELISA: do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. LAFICA: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer.

## ESTUDO PROSPECTIVO:

### 3.1.2.1 Delineamento e local da pesquisa

Trata-se de um estudo prospectivo, transversal e observacional realizado com 70 pacientes de Câncer de Mama, com o subtipo Luminal (A e B) ou Triplo Negativo, atendidas no Hospital do Câncer Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC) e Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), ambos localizados na cidade de Fortaleza - CE, no período de outubro de 2021 a março de 2023.

### 3.1.2.2 Seleção dos pacientes

Para este protocolo, foram adotados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

1) Critérios de Inclusão:

- a) Pacientes que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE);
- b) Diagnóstico de Câncer de Mama, subtipos Luminal (A ou B) ou Triplo Negativo (CMTN);

- c) Pacientes submetidos a quimioterapia neoadjuvante (QTneo) baseada em doxorrubicina/ciclofosfamida seguido de paclitaxel (Protocolo AC-T);
  - d) Pacientes sem o uso de fármacos imunossupressores;
  - e) Idade igual ou superior a 18 anos ou inferior a 75 anos;
- 2) Critérios de Exclusão:
- a) Doença metastática ao diagnóstico;
  - b) Outra malignidade prévia;
  - c) Perda do acompanhamento;
  - d) ausência de resultados dos exames imuno-histoquímicos para os marcadores prognósticos

### *3.1.2.3 Procedimento de coleta das amostras clínicas*

Previamente, antes do contato pessoal com as pacientes, a equipe de pesquisadores realizou uma triagem em cada unidade hospitalar para verificar os critérios de inclusão e exclusão. Após isto, as pacientes que atenderam aos critérios estabelecidos foram convidadas a participar da pesquisa intitulada “Estudo da associação entre a obesidade e mecanismos de resistência em pacientes com carcinoma mamário não-responsivo à terapia neoadjuvante”, a qual fez parte do Programa de Pesquisa para o SUS: Gestão compartilhada em Saúde/PPSUS–CE (financiada pela FUNCAP) (Freitas, 2024; Quispe-Choquenaira, 2023).

Foram realizadas três coletas de sangue periférico (10mL cada) nas pacientes incluídas no estudo. As coletas foram realizadas com o auxílio de técnicos e enfermeiros de cada Unidade Hospitalar, utilizando um tubo a vácuo contendo EDTA (tampa roxa), a partir do acesso venoso. Após a coleta, a amostra foi encaminhada para o LAFICA para o processamento e armazenamento a -80°C. A primeira coleta foi realizada antes do início dos ciclos de quimioterapia, a segunda após quatro ciclos de ciclofosfamida (AC), e a última após o segundo ciclo de taxano (AC/T).

### *3.1.2.4 Análise por ImunoEnsaio Enzimático (ELISA)*

Para a dosagem da Interleucina 33 no plasma dos pacientes ou sobrenadantes de células foi utilizado kit de DuoSet® ELISA, da marca R&D System (Human IL-33, catálogo # DY995). Este kit possui: anticorpo de captura, detecção e padrão.

Primeiramente, em uma placa de ELISA com 96 poços, foi incubado 100 µl/poço de anticorpo de captura por *overnight* (mínimo 12 h) na geladeira (4°C). Decorrido esse tempo, as placas foram retiradas da geladeira para resfriar à temperatura ambiente de 10 a 15 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS 1X + Tween 20 0,05%). Feito isto, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com BSA 1% (100 µl/poço). Em seguida, foram lavadas três vezes com tampão de lavagem. Depois, foi adicionado 100µl/poço de cada amostra, assim como a curva padrão seriada, e incubadas por 2h a 4°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas novamente com o tampão de lavagem e, em seguida, foi adicionado 100 µl/poço do anticorpo de detecção para incubação por 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e, logo após, incubadas com 100 µL/poço de Streptoavidina-HRP (1:40) por 20 minutos, protegidas da luz, a temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e, em seguida, incubadas com 100 µL/poço de solução substrato A+B (peróxido de hidrogênio:tetrametilbenzidina, 1:1) por 5 a 15 minutos. Nessa etapa é imprescindível observar a reação colorimétrica das amostras e da curva. A reação imunoenzimática foi interrompida com 50 µl da solução de parada (ácido sulfúrico 2N), sendo a absorbância analisada a 540 nm em um espectrofotômetro. As leituras foram plotadas no Microsoft Excel conforme recomendações do fabricante.

### 3.1.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS® versão 22.0 ou GraphPad Prism® versão 8.0, realizando-se o Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e Teste Exato de Fisher para as avaliações de associação entre variáveis qualitativas. Adicionalmente, foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significantes, valores de  $p < 0,05$ . Para análises de sobrevida foram realizados o teste de Log Rank Mantel x nas curvas de sobrevida de Kaplan Meier.

### 3.1.7 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará / Hospital Haroldo Juaçaba obedecendo a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), com o parecer consubstanciado do CEP nº 5.614.936 (Amostras de blocos de

parafina) e aprovado pelo parecer consubstanciado do CEP nº 4.664.756 do Instituto do Câncer do Ceará/Hospital Haroldo Juaçaba e 4.470.803 do Hospital Universitário Walter (Amostras de plasma).

## **ESTUDO *In vitro***

### **3.2 Estudo *in vitro***

Nesta seção, serão apresentadas as linhagens celulares utilizadas, bem como os protocolos experimentais executados para responder às perguntas de partida e hipóteses da pesquisa.

#### **3.2.1 Linhagens celulares**

Para este estudo, foram utilizadas três linhagens celulares, sendo elas:

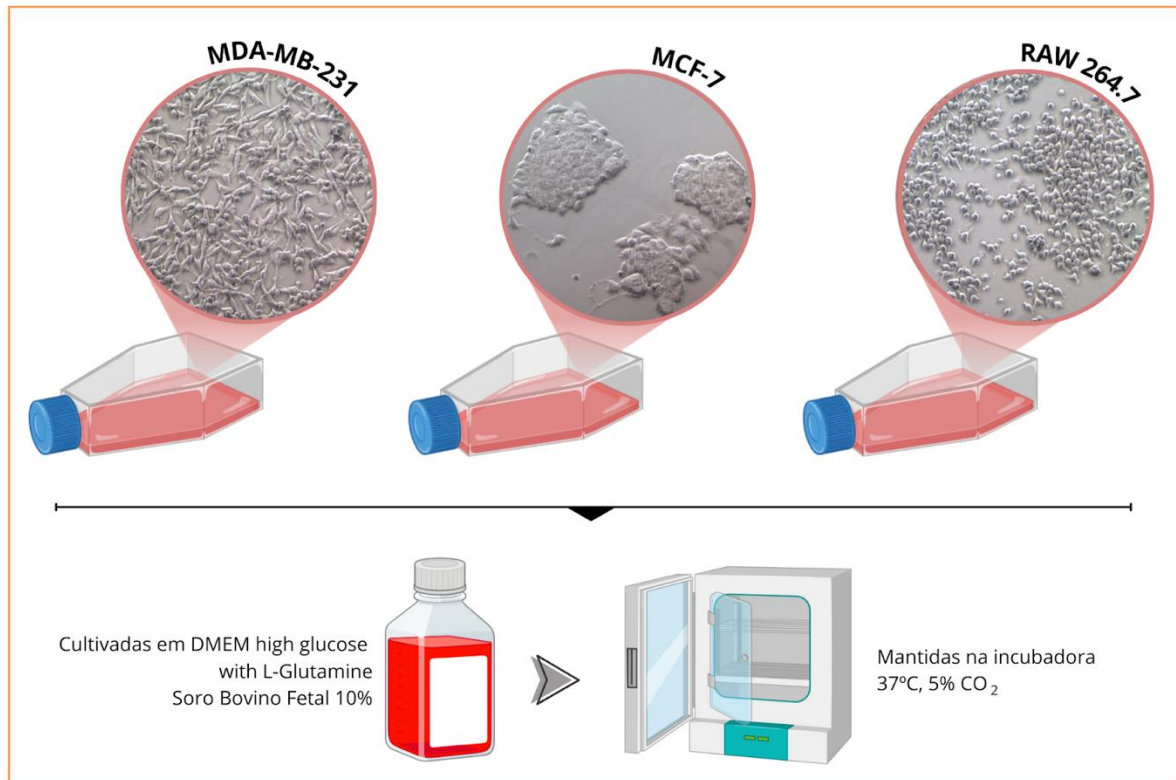
**a) MCF-7:** Célula tumoral de adenocarcinoma de mama. Essa linhagem expressa receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR).

**b) MDA-MB-231:** Célula tumoral de adenocarcinoma de mama triplo negativo, do subtipo basal-like B. Essa linhagem não expressa os receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e HER2.

**c) RAW 264.7:** Linhagem celular de macrófago produzida a partir de um tumor em um camundongo BALB/c macho induzido pelo vírus da leucemia murina Abelson.

Quanto ao cultivo celular, as linhagens de MCF-7, MDA-MB-231 e RAW 264.7 (**Figura 12**), coincidentemente foram cultivadas com o mesmo meio de cultura e suplementação em garrafa de cultivo de 75cm<sup>2</sup>. Portanto, as células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose with L-Glutamine* (DMEM, Capricorn, São Paulo, Brasil) suplementadas com 10% de soro bovino fetal inativado e mantidas em uma incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

**Figura 12** - Células MDA-MB-231, MCF-7 e RAW 264.7.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Fotomicrografia registrada em microscópio óptico na objetiva de 10x.

### 3.2.2 Reagentes e fármacos

As drogas utilizadas nesse estudo estão organizadas no **Quadro 4** abaixo:

**Quadro 4** - Drogas e seus respectivos códigos.

Reagente (sigla)	Código
Cloridrato de doxorrubicina (DOX)	(D1515, Sigma-Aldrich)
Paclitaxel (PTX)	(T7402, Sigma-Aldrich)
Lipopolissacarídeos de Escherichia coli O111:B4 (LPS)	(L4391, SigmaAldrich)

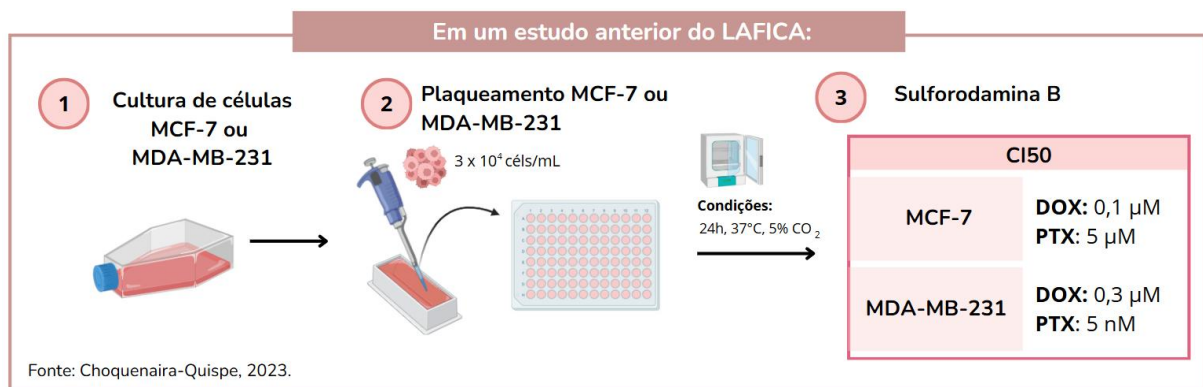
Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

### 3.2.3 Planejamentos experimentais

#### 3.2.3.1 Protocolo 1: Dados de experimentos anteriores do grupo

Para dar início ao protocolo experimental com as linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7, foi necessário definir a concentração inibitória média (CI50) dos quimioterápicos a serem utilizados (paclitaxel - PTX e doxorrubicina - DOX) no estudo. No entanto, no estudo de Choquenaira-Quispe (2023), uma pesquisa realizada no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), na perspectiva do câncer de mama utilizando as mesmas linhagens celulares (MDA-MB-231 e MCF-7) tratadas com os mesmos quimioterápicos (DOX e PTX), foi definido o CI50 no ensaio da sulforodamina B, para investigar o PTX e a DOX no contexto da ativação de receptores toll-like e proteínas de sua sinalização, PI3K e AKT, conforme ilustrado na **Figura 13**. Portanto, as concentrações apresentadas abaixo foram utilizadas em todos os protocolos que serão descritos nos tópicos seguintes.

**Figura 13** - Resumo da concentração inibitória média (CI50) obtida pelo ensaio de sulforodamina B.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: PTX: paclitaxel; DOX: Cloridrato de doxorrubicina; CI50: concentração inibitória média. MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal. MDA-MB-231: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo triplo negativo.

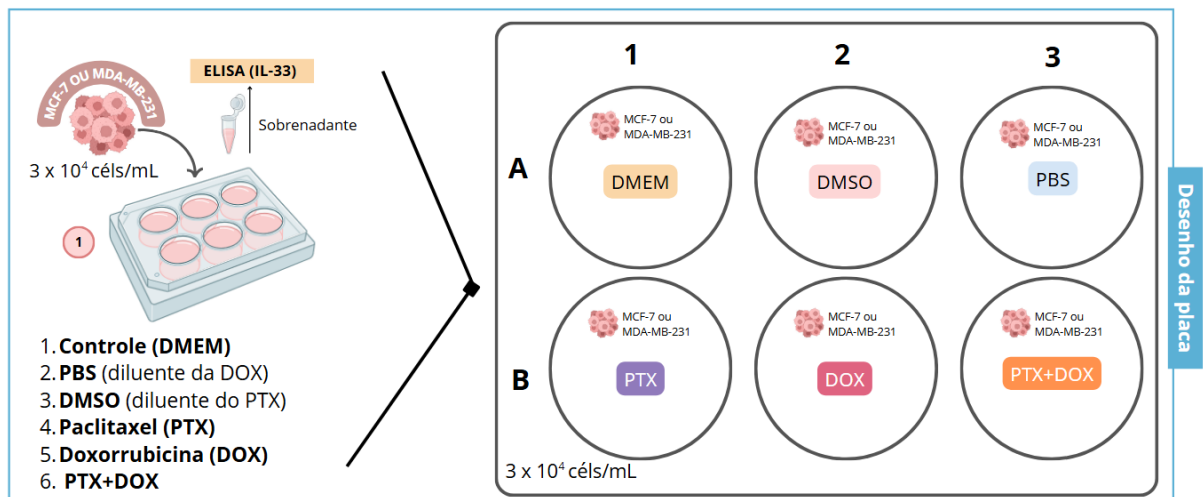
#### 3.2.3.2 Protocolo 2: *Quantificação da citocina IL-33 por ELISA linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.*

Inicialmente, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 6 poços com densidade celular de  $3 \times 10^4$  células/mL. Após 24h de plaqueamento, as células foram incubadas com as concentrações correspondentes ao CI50 de cada fármaco isolado ou

combinados por um tempo adicional de 24 h, conforme indicado a seguir: MCF-7 (PTX: 5  $\mu$ M; DOX: 0,1  $\mu$ M; PTX + DOX: 2,5 $\mu$ M e 0,05  $\mu$ M) e MDA- MB-231 (PTX: 5 nM; DOX: 0,3  $\mu$ M; PTX + DOX: 2,5 nM e 0,15  $\mu$ M). Os grupos controles foram estabelecidos a partir do diluente de cada fármaco, sendo eles: Dimetilsulfóxido (DMSO) para o PTX e tampão fosfato-salino (PBS) para a DOX. Além disso, foi reservado um poço sem nenhum tratamento e/ou reagente, ou seja, apenas meio de cultura (DMEM). Decorrido as 24h de tratamento, os sobrenadantes foram coletados para o ELISA (técnica descrita no tópico 3.1.2.4.)

Para ilustrar, o desenho da placa de 6 poços com seus respectivos tratamentos está disponível abaixo (**Figura 14**).

**Figura 14** - Desenho da placa de 6 poços para o tratamento com PTX e/ou DOX e seus respectivos CI50das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.



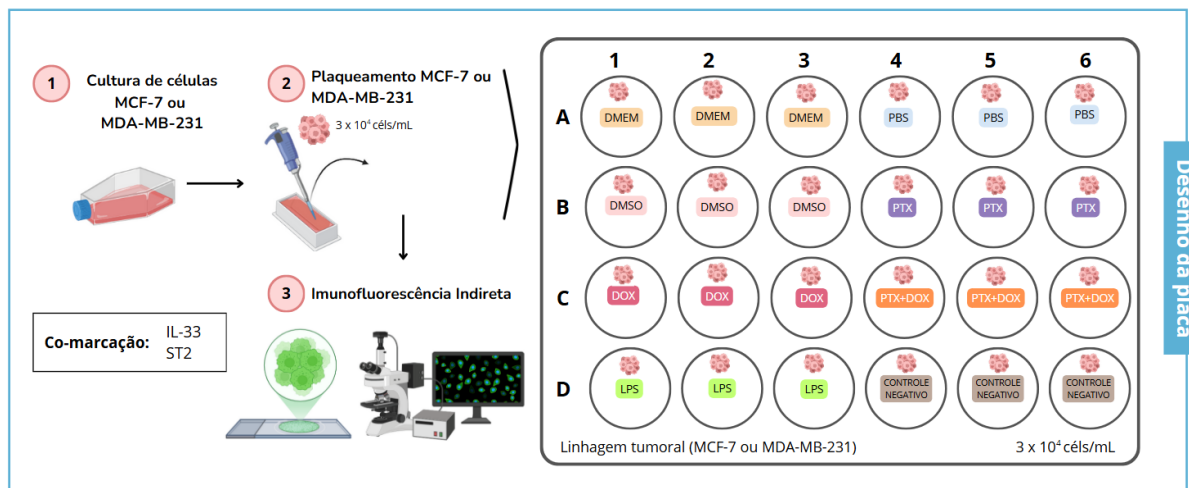
Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: PTX: paclitaxel; DOX: Cloridrato de doxorubicina; DMSO: Dimetilsulfóxido; PBS: tampão fosfato-salino (PBS). MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal. MDA-MB-231: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo triplo negativo. ELISA: do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.

### 3.2.3.3 Protocolo 3: Avaliar da co-marcação de IL-33/ST2 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 por Imunofluorescência Indireta

Para avaliar a expressão da co-marcação de IL-33/ST2 nas linhagens tumorais de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) antes da transferência dos respectivos sobrenadantes para a RAW 264.7 (conforme será apresentado no protocolo 4) foi realizado uma Imunofluorescência Indireta dessas células.

Para isso, as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em placas de 24 poços com densidade celular de  $3 \times 10^4$  células/mL e tratadas conforme descrito anteriormente no protocolo 2. Adicionalmente, foi incluído um grupo com estímulo de LPS (MCF-7: 20  $\mu\text{g/mL}$  e MDA-MB-231: 10  $\mu\text{g/mL}$ ), na qual esta concentração foi definida no trabalho de Choquenaira-Quispe (2023). Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas para a aplicação da técnica de Imunofluorescência Indireta (método qualitativo), a qual será descrita no tópico a seguir. O resumo do desenho experimental deste protocolo está ilustrado na **Figura 15**, a seguir.

**Figura 15** – Resumo do protocolo experimental 3.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: PTX: paclitaxel; DOX: Cloridrato de doxorubicina; DMSO: Dimetilsulfóxido; PBS: tampão fosfato-salino (PBS); LPS: Lipopolissacarídeo; MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal. MDA-MB-231: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo triplo negativo.

#### 3.2.3.3.1 Imunofluorescência de células

A imunofluorescência foi realizada para avaliar a expressão de IL-33/ST2 nas

células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) sem ou com exposição à quimioterapia. Inicialmente, as lamínulas de vidro (diâmetro 13mm) que seriam colocadas no fundo da placa de 24 poços passaram por um processo de lavagem e esterilização. As lamínulas ficaram mergulhadas em ácido clorídrico (HCl) 1M por *overnight*. No dia seguinte, enxaguar pelo menos duas vezes com água destilada e sonicar por 30 minutos. Esse processo foi repetido por duas vezes. Em seguida, as lamínulas foram transferidas para álcool 70% e absoluto, e sonicadas por 30 minutos em cada álcool. As lamínulas embebidas no álcool absoluto foram colocadas no fluxo laminar para UV por 30 minutos.

Após isso, com o auxílio de uma pinça, as lamínulas foram retiradas do álcool, secas uma por uma com um pano do tipo perfex e, em seguida, colocadas nos poços da placa de 24 poços. Após isso, as linhagens tumorais foram devidamente plaqueadas em cima da lamínula, a qual aderiram e cresceram em sua superfície. Após 24 horas, foi realizado o tratamento de acordo com cada linhagem: MCF-7 (LPS: 20 µg/mL; PTX: 5 µM; DOX: 0,1 µM; PTX + DOX: 2,5µM e 0,05 µM) e MDA- MB-231 (LPS: 10 µg/mL; PTX: 5 nM; DOX: 0,3 µM; PTX + DOX: 2,5 nM e 0,15 µM).

Decorrido esse tempo, foi iniciado o protocolo de imunofluorescência. Primeiramente, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C ultra freezer para posterior ensaio imunoenzimático (ELISA) da citocina IL-33, se caso fosse necessário. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS de 3 minutos cada. Logo após, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich®) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Logo após a fixação, os poços foram lavados três vezes com PBS por 3 minutos cada. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Triton 100 a 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) (diluído em PBS 1X) e incubadas por 10 minutos. Feito isto, os poços foram lavados por 3 vezes com PBS de 3 minutos cada. Após isso, foi feito o bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) por 20 minutos. Ao término do bloqueio, os poços foram lavados 3 vezes com PBS por 3 minutos cada.

As lamínulas com as células fixadas foram incubadas com cada anticorpo primário, de forma isolada ou combinados para caso de co-marcação, sendo eles: anti-ST2 (diluição 1:200, PA5-20077, Rabbit, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e mouse anti-IL-33 (diluição 1:200, MA5-15772, Mouse, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em cada lamínula para a incubação durante a noite (*overnight*) na geladeira (4°C).

No dia seguinte, foi retirado da geladeira a placa com as lamínulas e deixado resfriar em temperatura ambiente por 20 minutos. Após isso, foram realizadas 3 lavagens com PBS,

cada uma com duração de 3 minutos. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário goat anti-IgG mouse ou rabbit Alexa Fluor 568 ou 488 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), na diluição de 1:400, durante 2 horas. Finalizado esse tempo, com a intenção de marcar os núcleos, as células foram incubadas com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), durante 30 minutos, com a proporção de 4 µl em 200 ml de PBS 1X, seguido por 4 lavagens de água destilada de 3 minutos cada. Feito isto, foi realizada a montagem das lamínulas.

Para a montagem das lamínulas, foi utilizado o Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para preservar a fluorescência nas amostras. Por fim, as lamínulas foram fotografadas no equipamento multiusuário (Cytation™ 3, BioTek, Agilent, Santa Clara, CA, EUA) disponibilizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NDPM) e as imagens obtidas foram analisadas com o “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA).

#### ***3.2.3.4 Protocolo 4: Avaliação do perfil da polarização de macrófagos (M1 e M2) na linhagem RAW 264.7 por ELISA, imunofluorescência e expressão gênica por qPCR e, estimulados com o sobrenadante das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231 na RAW 264.7.***

Primeiramente, as linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) foram cultivadas em uma placa de 6 poços e tratadas conforme descrito anteriormente no protocolo 2. Após o tempo de tratamento das células tumorais, os sobrenadantes foram transferidos para as células RAW 264.7 (cultivadas sobre as lamínulas localizadas no fundo da placa de 24 poços) e incubados por 24 horas. Para controle positivo da polarização M1, os macrófagos foram estimulados com LPS (1000 ng/mL). Além disso, havia o grupo estimulado com LPS 24 horas antes de receberem o sobrenadante das linhagens MCF-7 ou MDA-MB-231.

Ademais, foram mantidos pelo menos dois poços como controle basal, conhecido como M0. Por fim, os sobrenadantes foram coletados para dosagem do perfil de citocinas (TNF-alfa, IL-10, IL-18 e IL-33) e nitrito, ambos métodos quantitativos. Vale ressaltar, que a metodologia do ELISA foi a mesma adotada do item 3.1.2.4. Sendo assim, foram utilizados os kits de DuoSet® ELISA, da marca R&D System para mouse TNF-alfa (# DY995), mouse IL-10 (# DY417), mouse IL-18 (# DY7625-05) e mouse IL-33 (# DY3626).

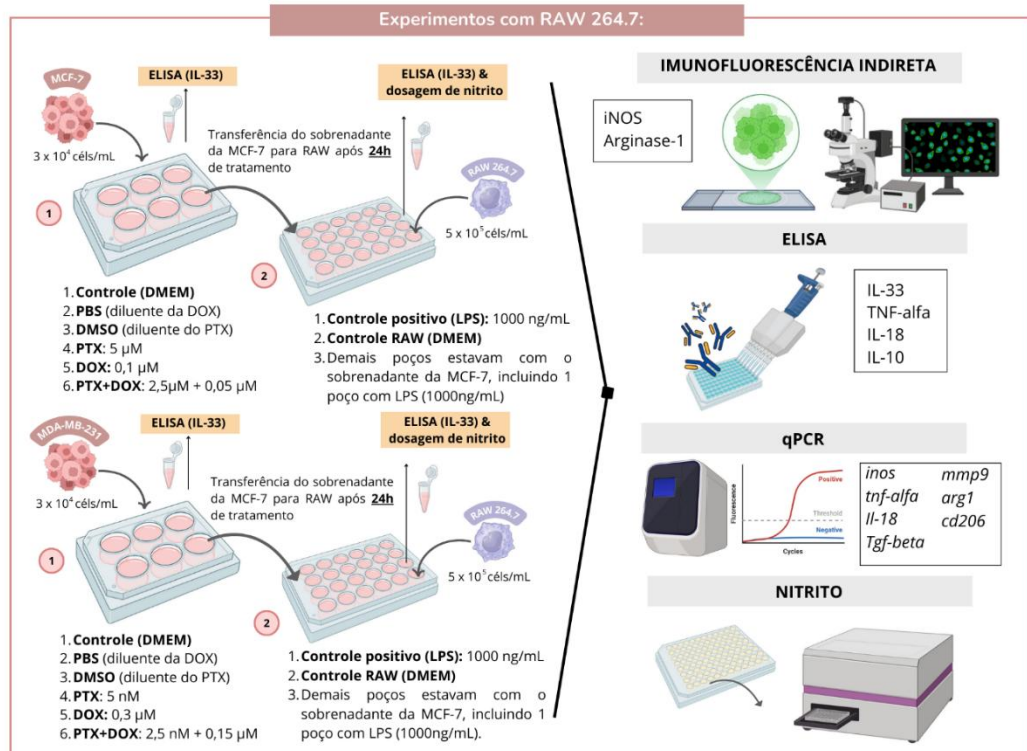
Já as células foram fixadas para aplicação da Imunofluorescência Indireta (método qualitativo) para investigar a polarização dos macrófagos para M1 (marcador iNOS) e M2 (marcador arginase-1) após exposição do sobrenadante da MDA-MB-231 ou MCF-7. As células fixadas foram incubadas com cada anticorpo primário, sendo eles: anti- iNOS (diluição 1:200, D6B6S, Rabbit, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) ou anti-Arginase-1 (diluição 1:200, D4E3M, Rabbit, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA).

Adicionalmente, foi realizada a qPCR da RAW 264.7 para o perfil M1 (*inos*, *tnf-alfa*, *Il-18* e *Tgf-beta*) e M2 (*mmp9*, *arg1* e *cd206*).

O detalhamento da técnica de imunofluorescência e ELISA já foram abordados nos tópicos anteriores, com exceção da dosagem de nitrito e qPCR, e por isso, não foi abordado neste protocolo.

O resumo do protocolo experimental encontra-se esquematizado abaixo (**Figura 16**).

**Figura 16** - Resumo do protocolo experimental 4.



Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Legenda: PTX: paclitaxel; DOX: Cloridrato de doxorrubicina; DMSO: Dimetilsulfóxido; PBS: tampão fosfato-salino (PBS). MCF-7: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo luminal. MDA-MB-231: Linhagem celular de câncer de mama do subtipo triplo negativo. RAW 264.7: Linhagem celular de macrófagos murinos. iNOS: óxido nítrico sintase induzível. TNF-alfa: Fator de necrose tumoral alfa. IL-18: Interleucina 18. IL-10: Interleucina 10. TGF-beta: do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*. MMP9: Metaloproteinase de matriz 9. Arg1: arginase-1. CD206: do inglês, *Cluster of Differentiation 206*.

### 3.2.3.4.1 Expressão gênica por qPCR

Foi realizada uma análise no perfil de polarização dos macrófagos a partir da expressão de genes para M1 (*Tnf-alfa*, *inos*, *Tgf-beta* e *Il-18*) e M2 (*mmp9*, *arg1* e *cd206*).

Para a extração do RNA, foi adicionado 1mL o reagente Trizol (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para cada grupo experimental e com o auxílio de um “scraper” as células foram arrastadas no fundo do poço, e logo em seguida, armazenadas em um microtubo de 2mL. Feito isto, a extração do RNA total seguiu o protocolo do fabricante do Trizol.

A qualidade do RNA extraído foi quantificado em um Espectrofotômetro de Microplacas Epoch™ (BioTek) nos comprimentos de onda de 260 nm e da razão 260/280 nm, Após isso, a transcrição do RNA em cDNA (DNA complementar) foi realizada com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em um terminociclador. Por fim, o qPCR foi feito no QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando o SyBr Green (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

Por fim, a expressão do mRNA foi determinada a partir da normalização dos dados com o gene de referência *Gapdh*. A expressão relativa foi calculada pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para a qPCR foi utilizada a lista dos seguintes primers (**Quadro 5**).

**Quadro 5** - Sequência de primers utilizados no qRT-PCR

<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Tnf-alfa</i>	5'- CATCTTCTCAAAATTCGAGACAA -3'	5'- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
<i>inos</i>	5'- GGCAGCCTGTGAGACCTTTG-3'	5'- GCATTGGAAGTGAAGCGTTTC-3'
<i>Tgf-beta</i>	5'- CACTGGAGTTGTACGGCAGTG-3'	5'- AGAGCAGTGAGCGCTGAATC-3'
<i>Il-18</i>	5'- CAGGCCTGACATCTTCTGCAA-3'	5'- TCTGACATGGCAGCCATTGT-3'
<i>cd206</i>	5'- CTCGTGGATCTCCGTGACAC-3'	5'- GCAAATGGAGCCGTCTGTGC-3'
<i>arg1</i>	5'- CCAGAAGAATGGAAGAGTCAGTGT-3'	5'- GCAGATATGCAGGGAGTCACC-3'
<i>mmp9</i>	5'- AACATCTGGCACTCCAC-3'	5'- GCAGAAGTTCTATGGCCTGC-3'
<i>Gadph</i>	5'- GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	5'- CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'

Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

#### 3.2.3.4.1 *Dosagem de Nitrito*

Para avaliar o estímulo dos sobrenadantes das linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) nas células RAW 264.7 para a produção de óxido nítrico (NO), foi dosada a quantidade de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pelo método de Griess. Para análise do NO, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% / N-(1-naftil)-etilenodiamina (NEED) 0,1% em água destilada) a 50  $\mu\text{L}$  das amostras de sobrenadantes das culturas. A reação ocorreu em uma placa de 96 poços, por 15 minutos, a temperatura ambiente, sem iluminação. Em seguida, foi efetuada a leitura no espectrofotômetro com o comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir da curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), em uma diluição seriada a partir de  $200\mu\text{M}$ . Por fim, as absorbâncias foram tabuladas no Excel e definitivamente calculadas pela equação da reta obtida a partir da curva padrão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudo Clínico

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

Os resultados que serão apresentados a seguir foram obtidos a partir de 73 pacientes após considerar os critérios de inclusão e exclusão, com Câncer de Mama Triplo Negativo entre os estágios I a III, todas do sexo feminino, com admissão no período de 2012 a 2020 atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba. Por conseguinte, será apresentado na **Tabela 1** os dados clínicos e patológicos das pacientes do estudo.

Quanto à análise descritiva da idade, observa-se uma média de 53 anos, com a mínima de 26 anos e máxima de 86 anos. Ao categorizar por faixa etária (<50 ou ≥ 50), observou-se que 46 pacientes (63,01%) tinham mais de 50 anos. Quanto à raça, 44 (60,27%) pacientes eram pardas, 19 (26,03%) eram brancas e 10 (13,70%) pacientes não tinham essa informação no prontuário. Além disso, das 46 pacientes que possuíam informação sobre histórico familiar de câncer, 41,10% apresentavam histórico familiar (mãe, tia, prima e sobrinhas) para câncer, dentre eles, mama. Contudo, vale salientar que, das 73 pacientes, 27 (36,99%) não possuíam essa informação no prontuário. 70 (95,89%)

Com relação ao tipo histológico, a maioria das pacientes foi classificada como carcinoma invasivo tipo não especial (TNE), representando 95,89% (n=70) da amostra. Para finalizar, os menos comuns foram o papilar com 1,37% (n=1) e o mucinoso metaplásico com 2,74% (n=2). Quanto ao grau histológico, a maior frequência foi de escala II e III, contabilizando 24 (32,88%) e 48 (65,75%) pacientes, respectivamente (**Tabela 1**).

Quanto ao estadiamento clínico ao diagnóstico, observou-se que a maioria das pacientes estava no estágio II, representando 45,21% (n=33) da amostra. Em sequência, o estágio III foi o segundo mais frequente, com 35,62% (n=26), e, por último, o estágio I com 9,59% (n=7). Dos 73 pacientes, a maioria apresentou uma classificação de tumor primário entre T2 e T3, de acordo com a classificação TNM. Além disso, entre os 66 pacientes com informações sobre o Estadiamento N (nódulo linfático), observou-se que 33 pacientes (N1 a N3) apresentaram comprometimento linfático, conforme detalhado na **tabela 1**.

A presença da invasão vascular linfática e perineural esteve presente em 42,47% e 26,03% pacientes, respectivamente. Em relação ao índice de proliferação celular, mesurado pela imunomarcagem do Ki-67 foi escolhido como ponto de corte >20% obtendo como resultado que

84,93% (n=62) das pacientes apresentaram elevado índice de proliferação. No que diz respeito ao tratamento adotado, das 73 pacientes do estudo, 46 (63,01%) não realizaram a quimioterapia neoadjuvante, enquanto 44 (60,27%) fizeram quimioterapia adjuvante. Quanto a resposta clínica a quimioterapia evidenciou-se que 10 pacientes progrediram a doença.

**Tabela 1** – Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo (continua).

Variável	N (%)
<b>Idade (anos)</b>	
Média ± Desvio padrão	53,27 ±14,27
<50	27 (36,99%)
≥ 50	46 (63,01%)
<b>Raça</b>	
Parda	44 (60,27%)
Branca	19 (26,03%)
Sem informação	10 (13,70%)
<b>Histórico Familiar</b>	
Sim	30 (41,10%)
Não	16 (21,92%)
NA	27 (36,99%)
<b>Tipo histológico</b>	
Carcinoma Invasivo tipo não especial (TNE)	70 (95,89%)
Papilar	1 (1,37%)
Mucinoso Metaplásico	2 (2,74%)
<b>Grau histológico</b>	
I	1 (1,37%)
II	24 (32,88%)
III	48 (65,75%)
<b>Estadiamento</b>	
I	7 (9,59%)
II	33 (45,21%)
III	26 (35,62%)
NA	7 (9,59%)
<b>Estadiamento T</b>	
T1	8 (10,96%)
T2	28 (38,36%)
T3	16 (21,92%)
T4	11 (15,07%)
NA	10 (13,70%)
<b>Estadiamento N</b>	
N0	30 (41,10%)
N1	16 (21,92%)
N2	14 (19,18%)
N3	3 (4,11%)
NA	10 (13,70%)
<b>Metástase</b>	
M0	63 (86,30%)
NA	10 (13,70%)
<b>pT</b>	
In situ	1 (1,37%)
0	5 (6,85%)
1	13 (17,81%)
2	34 (46,58%)
3	11 (15,07%)
4	5 (6,85%)
Sem informação	4 (5,48%)
<b>pN</b>	
0	43 (58,90%)
1	13 (17,81%)
2	6 (8,22%)
3	6 (8,22%)
Sem informação	5 (6,85%)

**Tabela 1** – Dados clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama triplo negativo (conclusão).

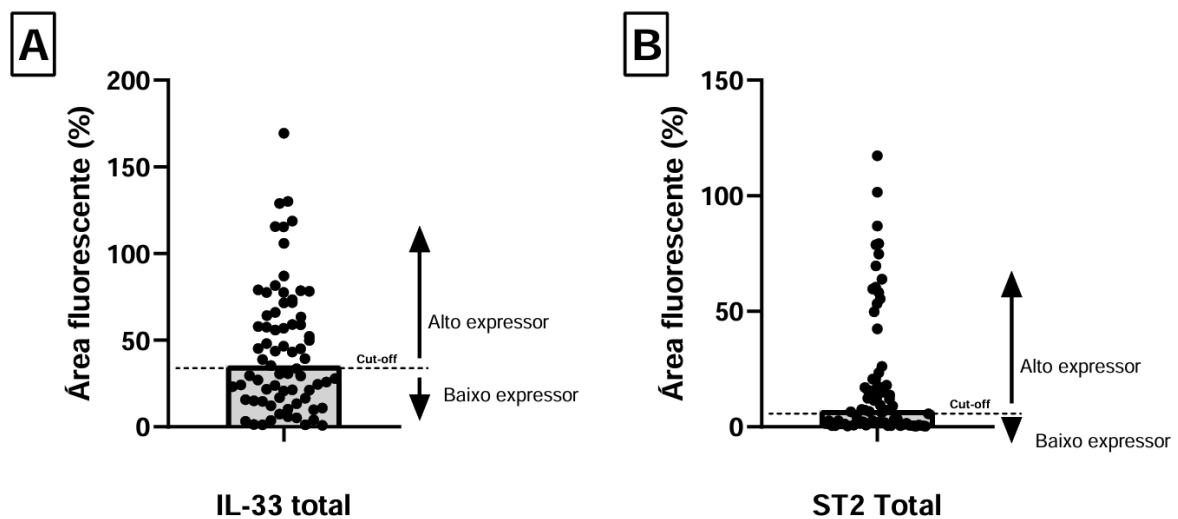
<b>Variável</b>	<b>N (%)</b>
<b>Invasão vascular linfática</b>	
Sim	31 (42,47%)
Não	40 (54,79%)
Sem informação	2 (2,74%)
<b>Invasão perineural</b>	
Sim	19 (26,03%)
Não	52 (71,23%)
Sem informação	2 (2,74%)
<b>Índice de proliferação ki67</b>	
≤20%	10 (13,70%)
>20%	62 (84,93%)
NA	1 (1,37%)
<b>Quimioterapia Neoadjuvante</b>	
Sim	26 (2,74%)
Não	46 (63,01%)
Sem informação	1 (1,37%)
<b>Quimioterapia Adjuvante</b>	
Sim	44 (60,27%)
Não	29 (39,73%)
<b>Resposta clínica</b>	
Resposta completa	5 (6,94%)
Resposta parcial	9 (12,50%)
Progressão da doença	10 (13,89%)
NA	48 (66,67%)
Sem informação	1 (1,37%)
<b>Radioterapia</b>	
Sim	53 (72,60%)
Não	19 (26,03%)
NA	1 (1,37%)
<b>Recidiva</b>	
Sim	34 (46,58%)
Não	39 (53,42%)
NA	2 (2,74%)

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

#### 4.1.2 Imunofluorescência do eixo IL-33/ST2 e as associações com os parâmetros patológicos e clínicos de pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo.

Para classificar os pacientes em alto (do inglês, *High*) e baixo (do inglês, *low*) expressor, foi necessário definir um *cut-off*, também conhecido como ponto de corte. O *cut-off* foi estabelecido a partir da mediana das porcentagens da quantificação da área da fluorescência, a distribuição da expressão da fluorescência está ilustrada na **Figura 17**, abaixo. Para o marcador IL-33, os casos com valor maior ou igual a 35,48% como alto expressor para IL-33, enquanto os valores inferiores a 35,48% foram classificados como baixo expressor. Já para o ST-2, os valores iguais ou superior a 9,03% foram classificados como alto expressor para ST-2 e os valores inferiores como sendo baixo expressor.

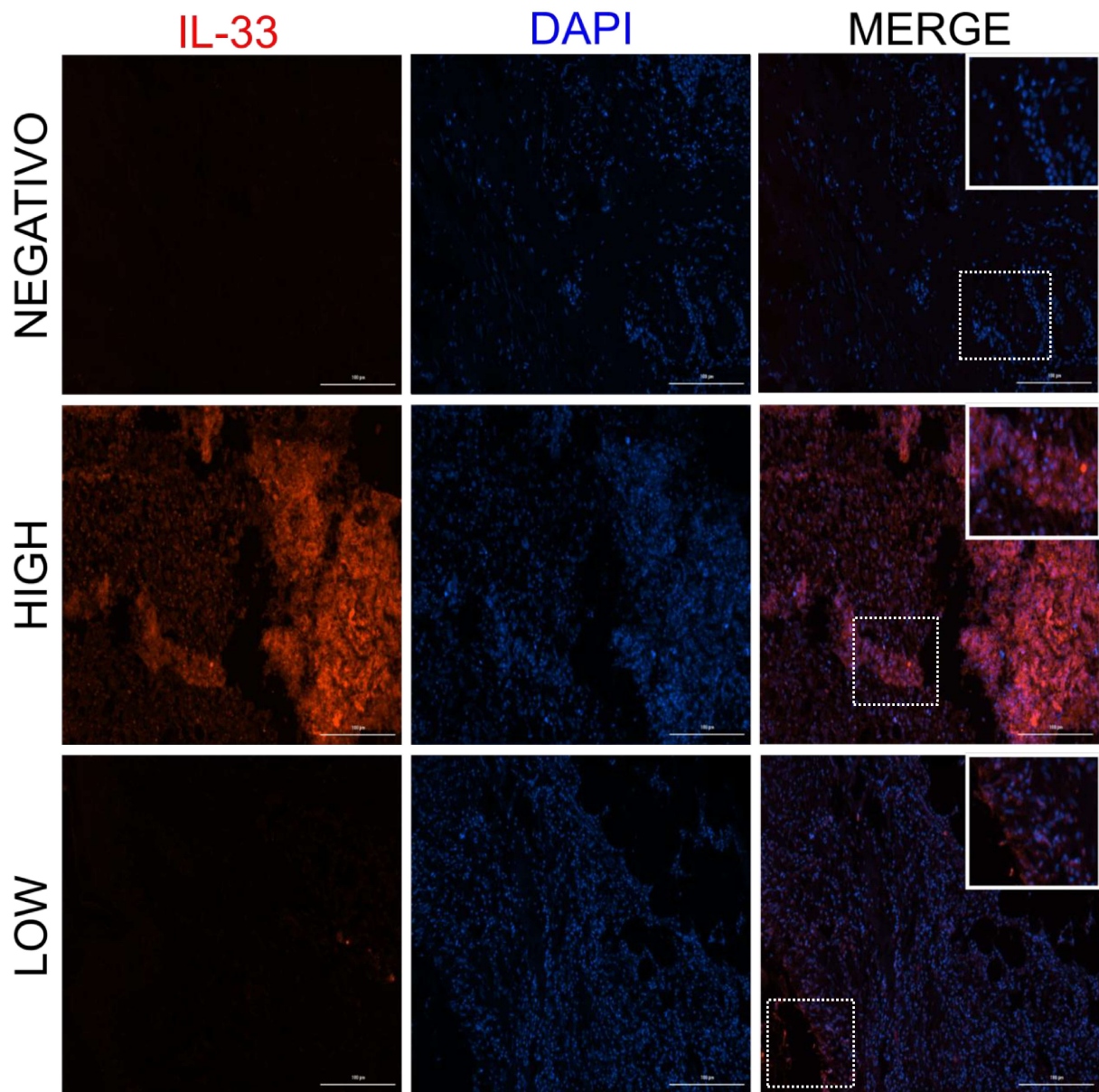
**Figura 17** – Distribuição da área fluorescente das pacientes Câncer de Mama Triplo Negativo com ponto de corte (*cut-off*) definido pela mediana.



Fonte: Dados da Pesquisa (2025). A figura mostra a distribuição do percentual da área fluorescentes dos marcadores IL-33 e ST2 nos 73 pacientes. Cada ponto representa o percentual de cada paciente. A linha pontilhada indica a mediana (*cut-off*) das amostras analisadas. a) O percentual mínimo da área fluorescente de IL-33 foi 0,94% e o máximo foi de 169,4%. b) O valor mínimo do receptor da IL-33 (ST2) foi 0,33% e o máximo foi 117,4%.

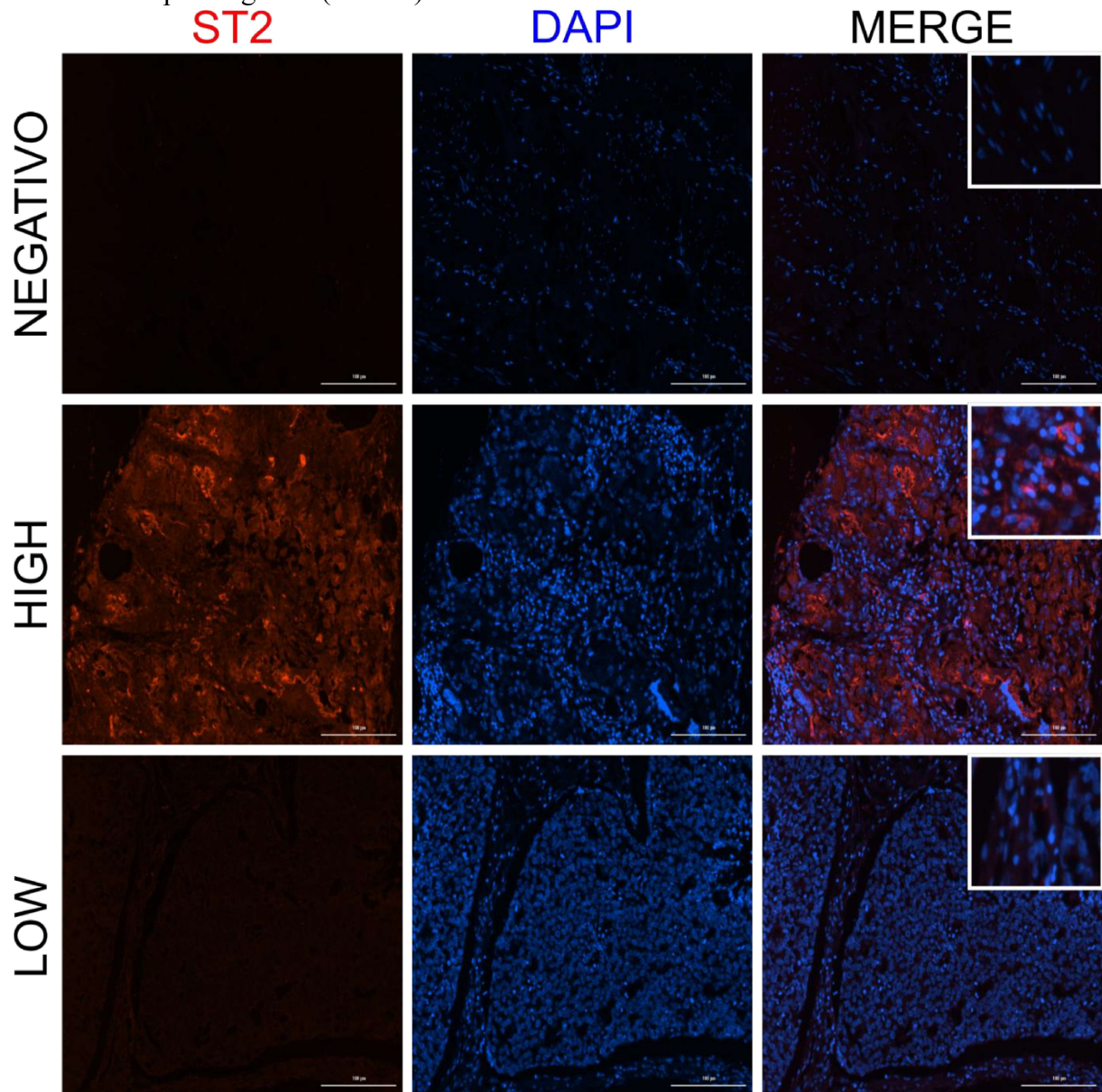
De maneira geral, a fluorescência dos dois marcadores (IL-33 e ST-2) se mostrou com um padrão variável, já que tiveram casos com alta e baixa expressão, conforme representado logo a seguir nas **Figuras 18 e 19**.

**Figura 18** - Expressão de IL-33 por imunofluorescência das amostras em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN).



Fonte: Dados da pesquisa (2025). As lâminas de parafina de *Tissue Microarray* (TMA) com as amostras de *core-biopsy* foram submetidas a Imunofluorescência Indireta (IFI) para avaliar a expressão da IL-33. O controle negativo foi incubado com anticorpo secundário para observar a presença do background. O “high” representa um paciente com marcação da área de fluorescência  $\geq 35,48\%$ , enquanto “low” representa o paciente com marcação  $< 35,48\%$ . Legenda: IL-33 (em vermelho); DAPI (marcador nuclear, em azul); Merge: sobreposição da IL-33 e DAPI. Aumento: 200 x. Escala: 100µm.

**Figura 19** - Expressão de ST-2 por imunofluorescência das amostras em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN).



Fonte: Dados da pesquisa (2025). As lâminas de parafina de *Tissue Microarray* (TMA) com as amostras de *core-biopsy* foram submetidas a Imunofluorescência Indireta (IFI) para avaliar a expressão de ST2. O controle negativo foi incubado com anticorpo secundário para observar a presença do *background*. O “*high*” representa um paciente com marcação da área de fluorescência  $\geq 9,03\%$ , enquanto “*low*” representa o paciente com marcação  $< 9,03\%$ .  
 Legenda: ST2 (em vermelho); DAPI (marcador nuclear, em azul); Merge: sobreposição da ST2 e DAPI. Aumento: 200 x. Escala: 100µm.

A **Tabela 2** resume a análise da associação da área de fluorescência de IL-33 e ST2 entre as variáveis clínico-patológicas das pacientes com CMTN. Os dados evidenciaram um pior prognóstico nos pacientes com câncer de mama triplo negativo e que apresentaram baixo nível de expressão da IL-33. Houve uma significância estatística ( $p < 0,05$ ) nos pacientes que não recidivaram e com alto índice de proliferação com o aumento da expressão de IL-33 na biopsia de pacientes com câncer de mama triplo negativo.

**Tabela 2** - Associação dos parâmetros clínicos-patológicos com a expressão de IL-33 e ST-2 por imunofluorescência (continua).

Variáveis	Total n (%)	Expressão de IL-33		p-Value	Expressão de ST2		p-Value
		High n (%) ≥ 35,48%	Low n (%) <35,48%		High n (%) ≥9,03%	Low n (%) (<9,03%)	
<b>Sexo</b>							
Feminino	73 (100%)	37 (50,68%)	36 (49,32%)	-	35 (47,95%)	38 (52,05%)	-
<b>Idade (anos)</b>							
<50	27 (36,99%)	13 (35,14%)	14 (38,89%)	0,8108	14 (40,00%)	13 (34,21%)	0,6356
≥ 50	46 (63,01%)	24 (64,86%)	22 (61,11%)		21 (60,00%)	25 (65,79%)	
<b>Raça</b>							
Parda	44 (60,27%)	25 (67,57%)	19 (52,78%)	0,1769	17 (48,57%)	27 (71,05%)	0,5834
Branca	19 (26,03%)	7 (18,92%)	12 (33,33%)		9 (25,71%)	10 (26,32%)	
Sem informação	10 (13,70%)	5 (13,51%)	5 (13,89%)		9 (25,71%)	1 (2,63%)	
<b>Histórico Familiar</b>							
Sim	30 (41,10%)	17 (45,95%)	13 (36,11%)	0,7604	13 (37,14%)	17 (44,74%)	0,5326
Não	16 (21,92%)	8 (21,62%)	8 (22,22%)		5 (14,29%)	11 (28,95%)	
NA	27 (36,99%)	12 (32,43%)	15 (41,67%)		17 (48,57%)	10 (26,32%)	
<b>Tipo histológico</b>							
TNE	70 (95,89%)	35 (94,6%)	35 (97,22%)	-	33 (94,28%)	37 (97,37%)	-
Papilar	1 (1,37%)	1 (2,70%)	0 (0,00%)		1 (2,86%)	0 (0,00%)	
Mucinoso Metaplásico	2 (2,74%)	1 (2,70%)	1 (2,78%)		1 (2,86%)	1 (2,63%)	
<b>Grau histológico</b>							
I	1 (1,37%)	1 (2,70%)	0 (0,00%)	0,3703	0 (0,00%)	1 (2,63%)	0,0597
II	24 (32,88%)	14 (37,84%)	10 (27,78%)		16 (45,71%)	8 (21,05%)	
III	48 (65,75%)	22 (59,46%)	26 (72,22%)		19 (54,29%)	29 (76,32%)	
<b>Estadiamento</b>							
I	7 (9,59%)	5 (13,51%)	2 (5,56%)	0,1051	4 (11,43%)	3 (7,89%)	0,4619
II	33 (45,21%)	19 (51,35%)	14 (38,89%)		13 (37,14%)	20 (52,63%)	
III	26 (35,62%)	9 (24,32%)	17 (47,22%)		14 (40,00%)	12 (31,58%)	
NA	7 (9,59%)	4 (10,81%)	3 (8,33%)		4 (11,43%)	3 (7,89%)	

**Tabela 2** - Associação dos parâmetros clínicos-patológicos com a expressão de IL-33 e ST-2 por imunofluorescência (continua).

Variáveis	Total n (%)	Expressão de IL-33		p-Value	Expressão de ST2		p-Value
		High n (%) ≥ 35,48%	Low n (%) <35,48%		High n (%) ≥9,03%	Low n (%) (<9,03%)	
<b>Estadiamento T</b>							
T1	8 (10,96%)	5 (13,51%)	3 (8,33%)	0,4114	6 (17,14%)	2 (5,26%)	0,4275
T2	28 (38,36%)	16 (43,24%)	12 (33,33%)		12 (34,29%)	16 (42,11%)	
T3	16 (21,92%)	6 (16,22%)	10 (27,78%)		7 (20,00%)	9 (23,68%)	
T4	11 (15,07%)	4 (10,81%)	7 (19,44%)		5 (14,29%)	6 (15,79%)	
NA	10 (13,70%)	6 (16,22%)	4 (11,11%)		5 (14,29%)	5 (13,16%)	
<b>Estadiamento N</b>							
N0	30 (41,10%)	16 (43,24%)	14 (38,89%)	0,1105	12 (34,29%)	18 (47,37%)	0,2033
N1	16 (21,92%)	10 (37,50%)	6 (16,67%)		9 (25,71%)	7 (18,42%)	
N2	14 (19,18%)	3 (7,57%)	11 (30,56%)		6 (17,14%)	8 (21,05%)	
N3	3 (4,11%)	2 (33,33%)	1 (2,78%)		3 (8,57%)	0 (0,00%)	
NA	10 (13,70%)	6 (40,00%)	4 (11,11%)		5 (14,29%)	5 (13,16%)	
<b>pT</b>							
<i>In situ</i>	1 (1,37%)	1 (2,70%)	0 (0,00%)	0,8082	1 (2,86%)	0 (0,00%)	0,5900
0	5 (6,85%)	2 (5,41%)	3 (8,33%)		3 (8,57%)	2 (5,26%)	
1	13 (17,81%)	6 (16,22%)	7 (19,44%)		8 (22,86%)	5 (13,16%)	
2	34 (46,58%)	18 (48,65%)	16 (44,44%)		13 (37,14%)	21 (55,26%)	
3	11 (15,07%)	7 (18,92%)	4 (11,11%)		5 (14,29%)	6 (14,79%)	
4	5 (6,85%)	2 (5,41%)	3 (8,33%)		2 (5,71%)	3 (7,89%)	
Sem informação	4 (5,48%)	1 (2,70%)	3 (8,33%)		3 (8,57%)	1 (2,63%)	
<b>pN</b>							
0	43 (58,90%)	22 (59,46%)	21 (58,33%)	0,6106	20 (57,14%)	23 (60,53%)	0,3743
1	13 (17,81%)	8 (21,62%)	5 (13,89%)		6 (17,14%)	7 (18,42%)	
2	6 (8,22%)	2 (5,41%)	4 (11,11%)		1 (2,86%)	5 (13,16%)	
3	6 (8,22%)	4 (10,81%)	2 (5,56%)		4 (11,43%)	2 (5,26%)	
NA	5 (6,85%)	1 (2,70%)	4 (11,11%)		4 (11,43%)	1 (2,63%)	

**Tabela 2** - Associação dos parâmetros clínicos-patológicos com a expressão de IL-33 e ST-2 por imunofluorescência (continua).

Variáveis	Total n (%)	Expressão de IL-33		p-Value	Expressão de ST2		p-Value
		High n (%) ≥ 35,48%	Low n (%) <35,48%		High n (%) ≥9,03%	Low n (%) (<9,03%)	
<b>Invasão vascular linfática</b>							
Sim	31 (42,47%)	14 (37,84%)	17 (47,22%)	0,5396	14 (40,00%)	17 (44,74%)	0,6856
Não	40 (54,79%)	21 (56,76%)	19 (52,78%)		20 (57,14%)	20 (52,63%)	
Sem informação	2 (2,74%)	2 (5,41%)	0 (0,00%)		1 (2,86%)	1 (2,63%)	
<b>Invasão perineural</b>							
Sim	19 (26,03%)	8 (21,62%)	11 (30,56%)	0,4638	6 (17,14%)	13 (34,21%)	0,0964
Não	52 (71,23%)	27 (72,97%)	25 (69,44%)		28 (80,00%)	24 (63,16%)	
Sem informação	2 (2,74%)	2 (5,41%)	0 (0,00%)		1 (2,86%)	1 (2,63%)	
<b>Índice de proliferação ki67</b>							
≤20%	10 (13,70%)	9 (24,32%)	1 (2,78%)	0,0068*	5 (14,29%)	5 (13,16%)	0,9246
>20%	62 (84,93%)	27 (72,97%)	35 (97,22%)		30 (85,71%)	32 (84,21%)	
NA	1 (1,37%)	1 (2,70%)	0 (0,00%)		0 (0,00%)	1 (2,63%)	
<b>Quimioterapia Neoadjuvante</b>							
Sim	26 (35,62%)	9 (24,32%)	17 (47,22%)	0,0497*	13 (37,14%)	13 (34,21%)	0,8593
Não	46 (63,01%)	27 (72,97%)	19 (52,78%)		22 (62,86%)	24 (63,16%)	
Sem informação	1 (1,37%)	1 (2,70%)	0 (0,00%)		0 (0,00%)	1 (2,63%)	
<b>Quimioterapia Adjuvante</b>							
Sim	44 (60,27%)	25 (67,57%)	19 (52,78%)	0,1967	20 (57,14%)	24 (63,16%)	0,5998
Não	29 (39,73%)	12 (32,43%)	17 (47,22%)		15 (42,86%)	14 (36,84%)	
<b>Radioterapia</b>							
Sim	53 (72,60%)	26 (70,27%)	27 (75,00%)	0,5084	23 (65,71%)	30 (78,95%)	0,1392
Não	19 (26,03%)	11 (29,73%)	8 (22,22%)		12 (34,29%)	7 (18,42%)	
NA	1 (1,37%)	0 (0,00%)	1 (2,78%)		0 (0,00%)	1 (2,63%)	

**Tabela 2** - Associação dos parâmetros clínicos-patológicos com a expressão de IL-33 e ST-2 por imunofluorescência (conclusão).

Variáveis	Total n (%)	Expressão de IL-33		p-Value	Expressão de ST2		p-Value
		High n (%) ≥ 35,48%	Low n (%) <35,48%		High n (%) ≥9,03%	Low n (%) (<9,03%)	
<b>Resposta clínica</b>							
Resposta completa	5 (6,94%)	1 (2,70%)	4 (11,11%)	0,6488	3 (8,57%)	2 (5,26%)	0,8559
Resposta parcial	9 (12,50%)	4 (10,81%)	5 (13,89%)		4 (11,43%)	5 (13,16%)	
Progressão da doença	10 (13,89%)	4 (10,81%)	6 (16,67%)		5 (14,29%)	5 (13,16%)	
NA	48 (66,67%)	27 (72,97%)	21 (58,33%)		23 (65,71%)	25 (65,79%)	
Sem informação	1 (1,37%)	1 (2,70%)	0 (0,00%)		0 (0,00%)	1 (2,63%)	
<b>Recidiva</b>							
Sim	34 (46,58%)	13 (35,14%)	21 (58,33%)	0,0440*	18 (51,43%)	16 (42,11%)	0,5559
Não	39 (53,42%)	23 (62,16%)	14 (38,89%)		17 (48,57%)	20 (52,63%)	
NA	2 (2,74%)	1 (2,70%)	1 (2,78%)		0 (0,00%)	2 (5,26%)	

Fonte: Dados da pesquisa (2025).

### ***4.1.3 Imuno-histoquímica de IL-33 e ST-2 em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo.***

Os resultados obtidos entre a associação das variáveis clínico-patológicas com os escores obtidos pela expressão de IL-33 e ST2 por imuno-histoquímica estão organizados na **Tabela 3** Contudo, não foram encontrados valores significativos ( $p>0,05$ ) nas variáveis analisadas em ambos os marcadores. As **Figuras 20 e 21** de forma representativa os escores da imuno-histoquímica.

**Tabela 3** - Associação entre os escores de imuno-histoquímica para IL-33 e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com CMTN (continua).

Variável	N (%)	IL-33 (Escore de IHQ)		p
		Escore 0-1	Escore 2	
Total (n)	38 (100,0%)	20 (100,0%)	18 (100,0%)	
<b>Idade (anos)</b>				
<50	17 (44,7%)	6 (30,0%)	11 (61,1%)	0,1042
≥ 50	21 (55,3%)	14 (70,0%)	7 (38,9%)	
<b>Raça</b>				
Parada	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,7958
Branca	20 (52,6%)	9 (45,0%)	11 (61,1%)	
Sem informação	10 (26,3%)	5 (25,0%)	5 (27,8%)	
8 (21,1%)	6 (30,0%)	2 (11,1%)		
<b>Histórico Familiar</b>				
Sim	14 (36,8%)	6 (30,0%)	8 (44,4%)	0,5000
Não	2 (5,3%)	0 (0,0%)	2 (11,1%)	
NA	22 (57,9%)	14 (70,0%)	8 (44,4%)	
<b>Tipo histológico</b>				
Carcinoma Invasivo tipo não especial (TNE)	37 (97,4%)	20 (100,0%)	17 (94,4%)	-
Papilar	1 (2,6%)	0 (0,0%)	1 (5,6%)	
<b>Grau histológico</b>				
I	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,9442
II	15 (39,5%)	8 (40,0%)	7 (38,9%)	
III	23 (60,5%)	12 (60,0%)	11 (61,1%)	
<b>Estadiamento Clínico</b>				
I	4 (10,5%)	2 (10,0%)	2 (11,1%)	0,7849
II	17 (44,7%)	10 (50,0%)	7 (38,9%)	
III	17 (44,7%)	8 (40,0%)	9 (50,0%)	
<b>Estadiamento T</b>				
T1	6 (15,8%)	3 (15,0%)	3 (16,7%)	0,5346
T2	14 (36,8%)	8 (40,0%)	6 (33,3%)	
T3	9 (23,7%)	3 (15,0%)	6 (33,3%)	
T4	9 (23,7%)	6 (30,0%)	3 (16,7%)	
<b>Estadiamento N</b>				
N0	18 (47,4%)	10 (50,0%)	8 (44,4%)	0,9049
N1	8 (21,1%)	4 (20,0%)	4 (22,2%)	
N2	9 (23,7%)	4 (20,0%)	5 (27,8%)	
N3	3 (7,9%)	2 (10,0%)	1 (5,6%)	
<b>pT</b>				
0	5 (13,2%)	1 (5,0%)	4 (22,2%)	0,2162
1	9 (23,7%)	4 (20,0%)	5 (27,8%)	
2	13 (34,2%)	8 (40,0%)	5 (27,8%)	
3	5 (13,2%)	2 (10,0%)	3 (16,7%)	
4	3 (7,9%)	3 (15,0%)	0 (0,0%)	
NA	1 (2,6%)	0 (0,0%)	1 (5,6%)	
<b>pN</b>				
0	23 (60,5%)	11 (55,0%)	12 (66,7%)	0,3406
1	6 (15,8%)	3 (15,0%)	3 (16,7%)	
2	3 (7,9%)	1 (5,0%)	2 (11,1%)	
3	3 (7,9%)	3 (15,0%)	0 (0,0%)	
NA	1 (2,6%)	0 (0,0%)	1 (5,6%)	
<b>Invasão vascular linfática</b>				0,2638
Sim	19 (50,0%)	8 (40,0%)	11 (61,1%)	
Não	19 (50,0%)	12 (60,0%)	8 (44,4%)	

**Tabela 3** - Associação entre os escores de imuno-histoquímica para IL-33 e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com CMTN (conclusão).

Variável	N (%)	IL-33 (Escore de IHQ)		p
		Escore 0-1	Escore 2	
<b>Invasão perineural</b>				
Sim	8 (21,1%)	2 (10,0%)	6 (33,3%)	0,0781
Não	30 (78,9%)	18 (90,0%)	12 (66,7%)	
<b>Índice de proliferação ki67</b>				
≤20%	4 (10,5%)	3 (15,0%)	1 (5,6%)	0,3435
>20%	34 (89,5%)	17 (85,0%)	17 (94,4%)	
<b>Mama</b>				
Direita	16 (42,1%)	8 (40,0%)	8 (44,4%)	0,7817
Esquerda	22 (57,9%)	12 (60,0%)	10 (55,6%)	
<b>Cirurgia</b>				
Sim	35 (92,1%)	18 (90,0%)	17 (94,4%)	0,6119
Não	3 (7,9%)	2 (10,0%)	1 (5,6%)	
<b>Tipo de cirurgia</b>				
Não	1 (2,6%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	0,5624
Mastectomia	22 (57,9%)	12 (60,0%)	10 (55,6%)	
Quadrantectomia	13 (34,2%)	6 (30,0%)	7 (38,9%)	
NA	2 (5,3%)	1 (5,0%)	1 (5,6%)	
<b>Linfadenectomia</b>				
Sim	30 (78,9%)	16 (80,0%)	14 (77,8%)	0,8555
Não	7 (18,4%)	4 (20,0%)	3 (16,7%)	
NA	1 (2,6%)	0 (0,0%)	1 (5,6%)	
<b>Linfonodo sentinela</b>				
Não	17 (44,7%)	10 (50,0%)	7 (38,9%)	0,6232
Sim	14 (36,8%)	7 (35,0%)	7 (38,9%)	
NA	7 (18,4%)	3 (15,0%)	4 (22,2%)	
<b>Quimioterapia Neoadjuvante</b>				
Sim	17 (44,7%)	8 (40,0%)	9 (50,0%)	0,5359
Não	21 (55,3%)	12 (60,0%)	9 (50,0%)	
<b>Quimioterapia Adjuvante</b>				
Sim	19 (50,0%)	10 (50,0%)	9 (50,0%)	>0,9999
Não	19 (50,0%)	10 (50,0%)	9 (50,0%)	
<b>Resposta clínica</b>				
Resposta completa	4 (10,5%)	1 (5,0%)	3 (16,7%)	0,2296
Resposta parcial	7 (18,4%)	3 (15,0%)	4 (22,2%)	
Progressão da doença	5 (13,2%)	4 (20,0%)	1 (5,6%)	
NA	22 (57,9%)	13 (65,0%)	9 (50,0%)	
<b>Radioterapia</b>				
Sim	26 (68,4%)	12 (60,0%)	14 (77,8%)	0,3308
Não	11 (28,9%)	7 (35,0%)	4 (22,2%)	
NA	1 (2,6%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	
<b>Recidiva</b>				
Sim	21 (55,3%)	12 (60,0%)	9 (50,0%)	0,4290
Não	17 (44,7%)	8 (40,0%)	10 (55,6%)	

Fonte: Dados da Pesquisa (2025)

**Tabela 4** - Associação entre os escores de imuno-histoquímica para ST2 e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com CMTN (continua).

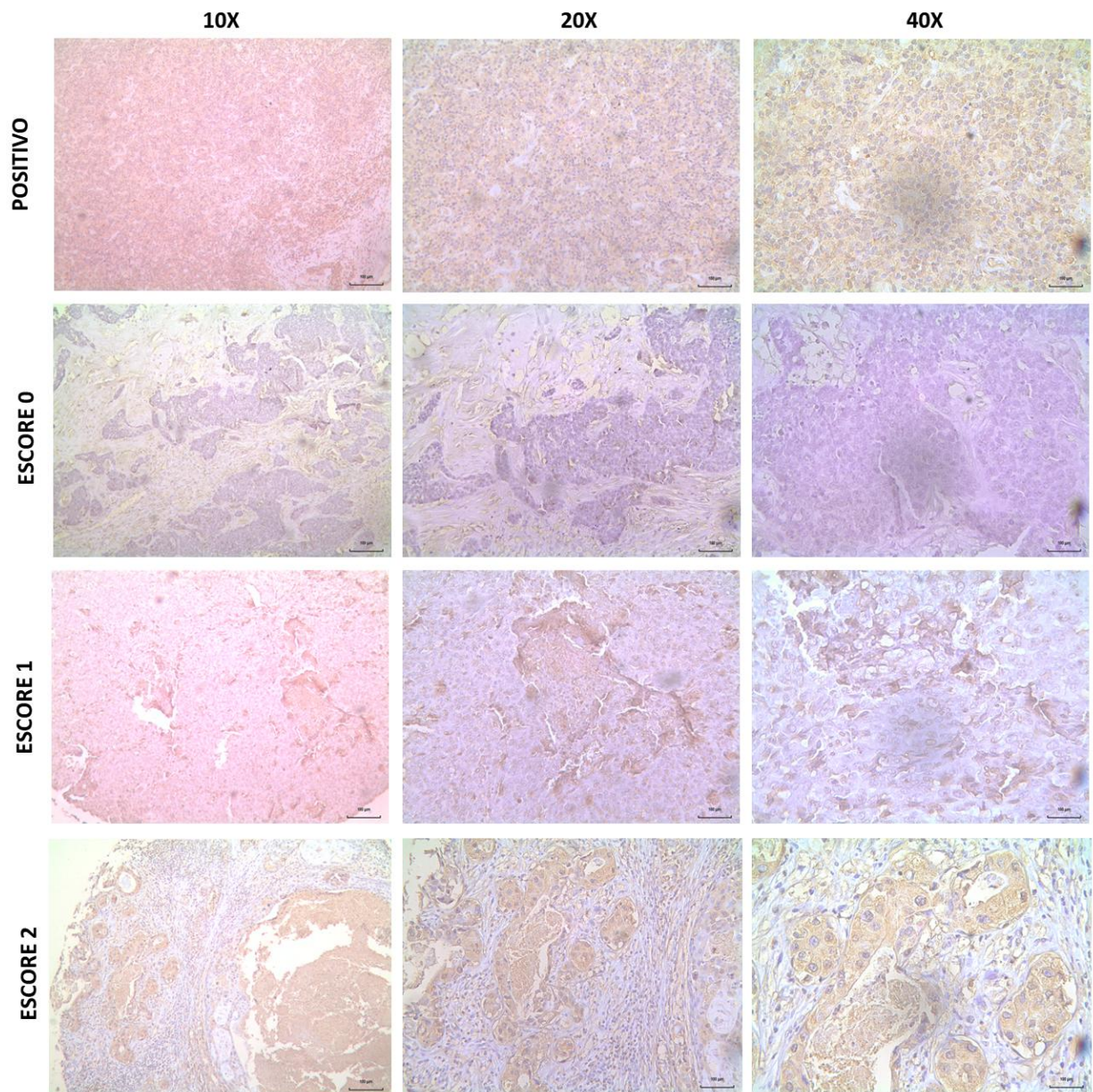
Variável	N (%)	ST2 (Escore de IHQ)		p
		Escore 0-1	Escore 2-3	
Total (n)	35 (100,0%)	31 (100,0%)	4 (100,0%)	
<b>Idade (anos)</b>				
<50	16 (45,7%)	14 (45,2%)	2 (50,0%)	0,9185
≥ 50	21 (60,0%)	19 (61,3%)	3 (75,0%)	
<b>Raça</b>				
Parda	9 (25,7%)	8 (25,8%)	1 (25,0%)	0,1495
Branca	18 (51,4%)	18 (58,1%)	0 (0,0%)	
Sem informação	8 (22,9%)	5 (16,1%)	3 (75,0%)	
<b>Histórico Familiar</b>				
Sim	13 (37,1%)	12 (38,7%)	1 (25,0%)	0,5933
Não	22 (62,9%)	19 (61,3%)	3 (75,0%)	
<b>Tipo histológico</b>				
Carcinoma Invasivo tipo não especial (TNE)	34 (97,1%)	30 (96,8%)	4 (100,0%)	-
Papilar	1 (2,9%)	1 (3,2%)	0 (0,0%)	
<b>Grau histológico</b>				
II	13 (37,1%)	10 (32,3%)	3 (75,0%)	0,0959
III	22 (62,9%)	21 (67,7%)	1 (25,0%)	
<b>Estadiamento Clínico</b>				
I	3 (8,6%)	2 (6,5%)	1 (25,0%)	0,3937
II	16 (45,7%)	15 (48,4%)	1 (25,0%)	
III	16 (45,7%)	14 (45,2%)	2 (50,0%)	
<b>Estadiamento T</b>				
T1	5 (14,3%)	4 (12,9%)	1 (25,0%)	0,9073
T2	13 (37,1%)	12 (38,7%)	1 (25,0%)	
T3	9 (25,7%)	8 (25,8%)	1 (25,0%)	
T4	8 (22,9%)	7 (22,6%)	1 (25,0%)	
<b>Estadiamento N</b>				
N0	16 (45,7%)	14 (45,2%)	2 (50,0%)	0,9354
N1	8 (22,9%)	7 (22,6%)	1 (25,0%)	
N2	8 (22,9%)	7 (22,6%)	1 (25,0%)	
N3	3 (8,6%)	3 (9,7%)	0 (0,0%)	
<b>pT</b>				
0	5 (14,3%)	4 (12,9%)	1 (25,0%)	0,8014
1	8 (22,9%)	7 (22,6%)	1 (25,0%)	
2	12 (34,3%)	11 (35,5%)	1 (25,0%)	
3	5 (14,3%)	5 (16,1%)	0 (0,0%)	
4	3 (8,6%)	3 (9,7%)	0 (0,0%)	
NA	1 (2,9%)	1 (3,2%)	0 (0,0%)	
<b>pN</b>				
0	21 (60,0%)	18 (58,1%)	3 (75,0%)	0,5965
1	6 (17,1%)	6 (19,4%)	0 (0,0%)	
2	3 (8,6%)	3 (9,7%)	0 (0,0%)	
3	3 (8,6%)	3 (9,7%)	0 (0,0%)	
NA	1 (2,9%)	1 (3,2%)	0 (0,0%)	
<b>Invasão vascular linfática</b>				
Sim	18 (51,4%)	16 (51,6%)	2 (50,0%)	0,06074
Não	17 (48,6%)	15 (48,4%)	2 (50,0%)	

**Tabela 4** - Associação entre os escores de imuno-histoquímica para ST2 e as variáveis clínico-patológicas em pacientes com CMTN (conclusão).

Variável	N (%)	ST2 (Escore de IHQ)		p
		Escore 0-1	Escore 2-3	
<b>Invasão perineural</b>				
Sim	8 (22,9%)	7 (22,6%)	1 (25,0%)	0,9136
Não	27 (77,1%)	24 (77,4%)	3 (75,0%)	
<b>Índice de proliferação ki67</b>				
≤20%	3 (8,6%)	2 (6,5%)	1 (25,0%)	0,2123
>20%	32 (91,4%)	29 (93,5%)	3 (75,0%)	
<b>Mama</b>				
Direita	15 (42,9%)	13 (41,9%)	2 (50,0%)	0,7590
Esquerda	20 (57,1%)	18 (58,1%)	2 (50,0%)	
<b>Cirurgia</b>				
Sim	33 (94,3%)	30 (96,8%)	3 (75,0%)	0,0774
Não	2 (5,7%)	1 (3,2%)	1 (25,0%)	
<b>Tipo de cirurgia</b>				
Não	2 (5,7%)	1 (3,2%)	1 (25,0%)	0,2061
Mastectomia	20 (57,1%)	18 (58,1%)	2 (50,0%)	
Quadrantectomia	13 (37,1%)	12 (38,7%)	1 (25,0%)	
<b>Linfadenectomia</b>				
Sim	28 (80,0%)	25 (80,6%)	3 (75,0%)	0,6813
Não	6 (17,1%)	5 (16,1%)	1 (25,0%)	
NA	1 (2,9%)	1 (3,2%)	0 (0,0%)	
<b>Linfonodo sentinela</b>				
Não	15 (42,9%)	12 (38,7%)	3 (75,0%)	0,0772
Sim	14 (40,0%)	14 (45,2%)	0 (0,0%)	
NA	6 (17,1%)	5 (16,1%)	1 (25,0%)	
<b>Quimioterapia Neoadjuvante</b>				
Sim	16 (45,7%)	14 (45,2%)	2 (50,0%)	0,8549
Não	19 (54,3%)	17 (54,8%)	2 (50,0%)	
<b>Quimioterapia Adjuvante</b>				
Sim	17 (48,6%)	16 (51,6%)	1 (25,0%)	0,3162
Não	18 (51,4%)	15 (48,4%)	3 (75,0%)	
<b>Resposta clínica</b>				
Resposta completa	4 (11,4%)	3 (9,7%)	1 (25,0%)	0,4008
Resposta parcial	7 (20,0%)	7 (22,6%)	0 (0,0%)	
Progressão da doença	5 (14,3%)	4 (12,9%)	1 (25,0%)	
NA	19 (54,3%)	17 (54,8%)	2 (50,0%)	
<b>Radioterapia</b>				
Sim	25 (71,4%)	23 (74,2%)	2 (50,0%)	0,2561
Não	9 (25,7%)	7 (22,6%)	2 (50,0%)	
NA	1 (2,9%)	1 (3,2%)	0 (0,0%)	
<b>Recidiva</b>				
Sim	18 (51,4%)	15 (48,4%)	3 (75,0%)	0,3162
Não	17 (48,6%)	16 (51,6%)	1 (25,0%)	

Fonte: Dados da Pesquisa (2025).

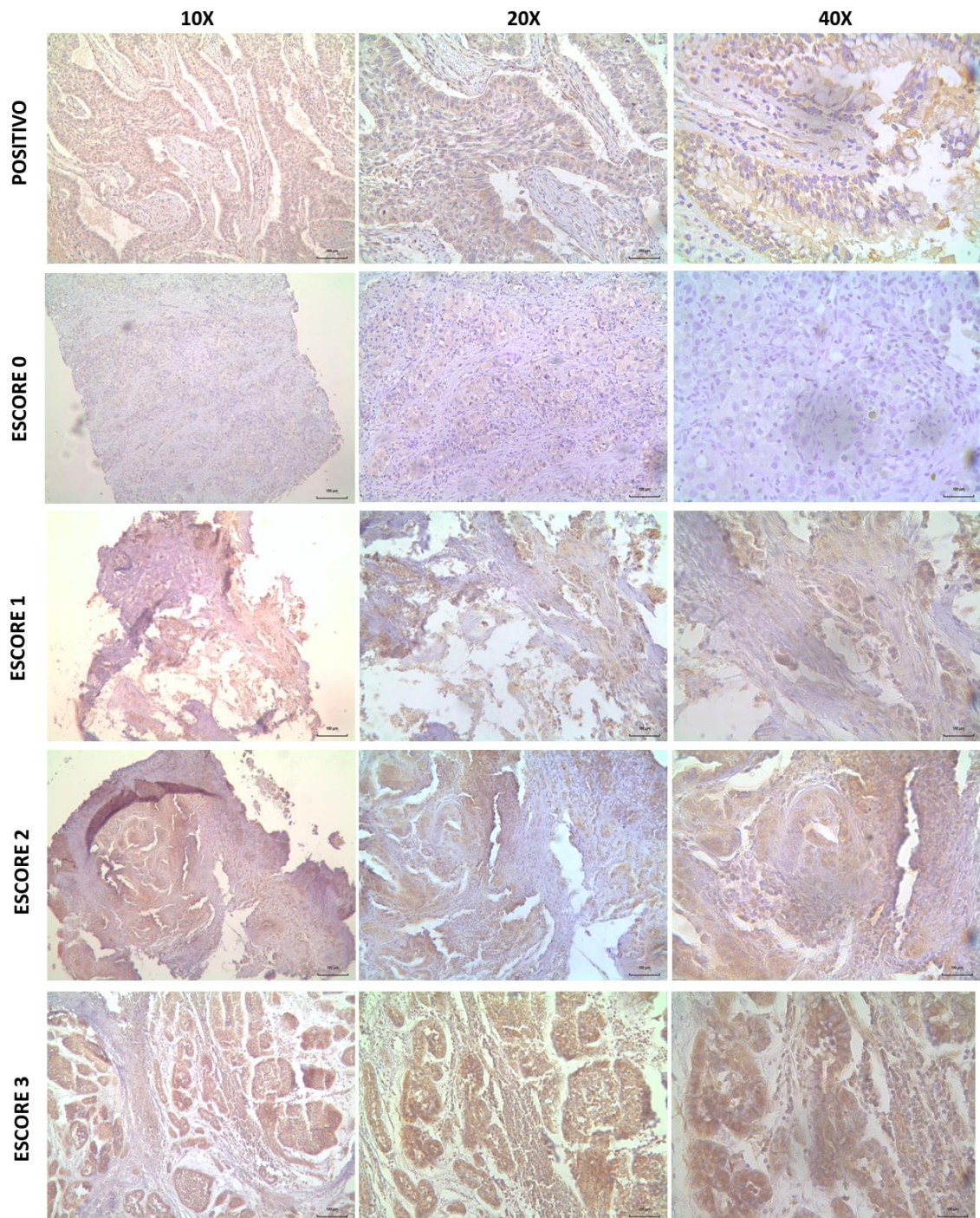
**Figura 20** - Fotomicrografias representativas da expressão de IL-33 por imuno-histoquímica das amostras de *core-biopsy* em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN).



Fonte: Dados da Pesquisa (2025). Controle positivo: linfonodo (recomendações do fabricante do anticorpo).

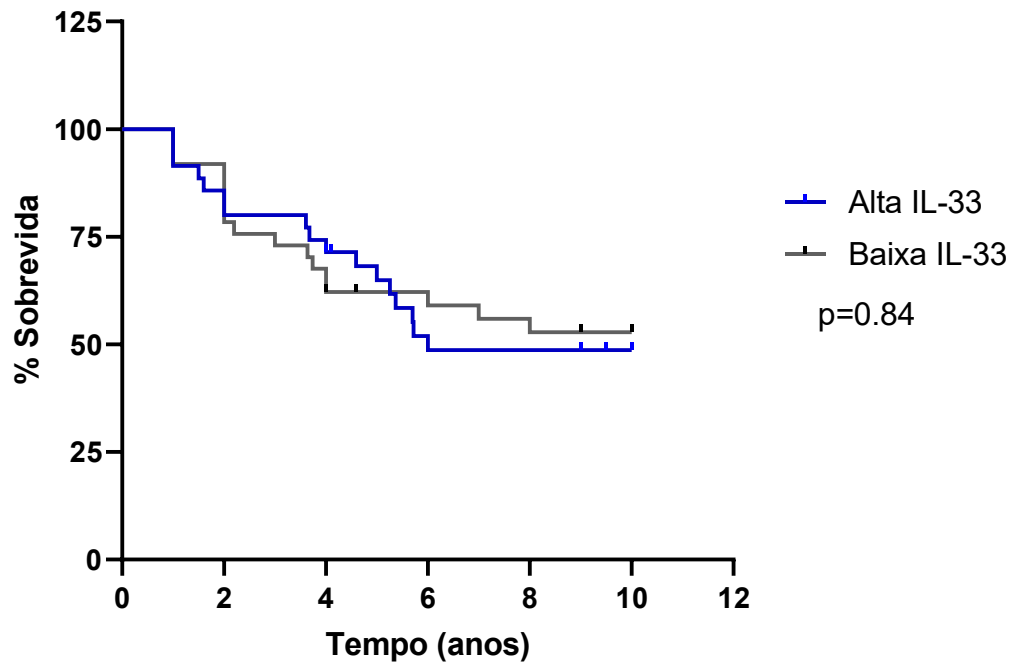
Fotomicrografias representativas da expressão de IL-33 por imuno-histoquímica analisadas a intensidade de marcação por escores em diferentes escalas capturadas por microscópio óptico, com aumento de 100×, 200×, 400×.

**Figura 21** - Fotomicrografias representativas da expressão de ST2 por imuno-histoquímica das amostras de *core-biopsy* em pacientes com Câncer de Mama Triplo Negativo (CMTN).



Fonte: Dados da Pesquisa (2025). Controle positivo: câncer de pulmão (recomendações do fabricante do anticorpo). Fotomicrografias representativas da expressão de ST2 por imuno-histoquímica em diferentes escalas capturadas por microscópio óptico, com aumento de 100x, 200x, 400x.

**Figura 22** - Análise de sobrevida global dos pacientes com alta e baixa expressão de IL-33.



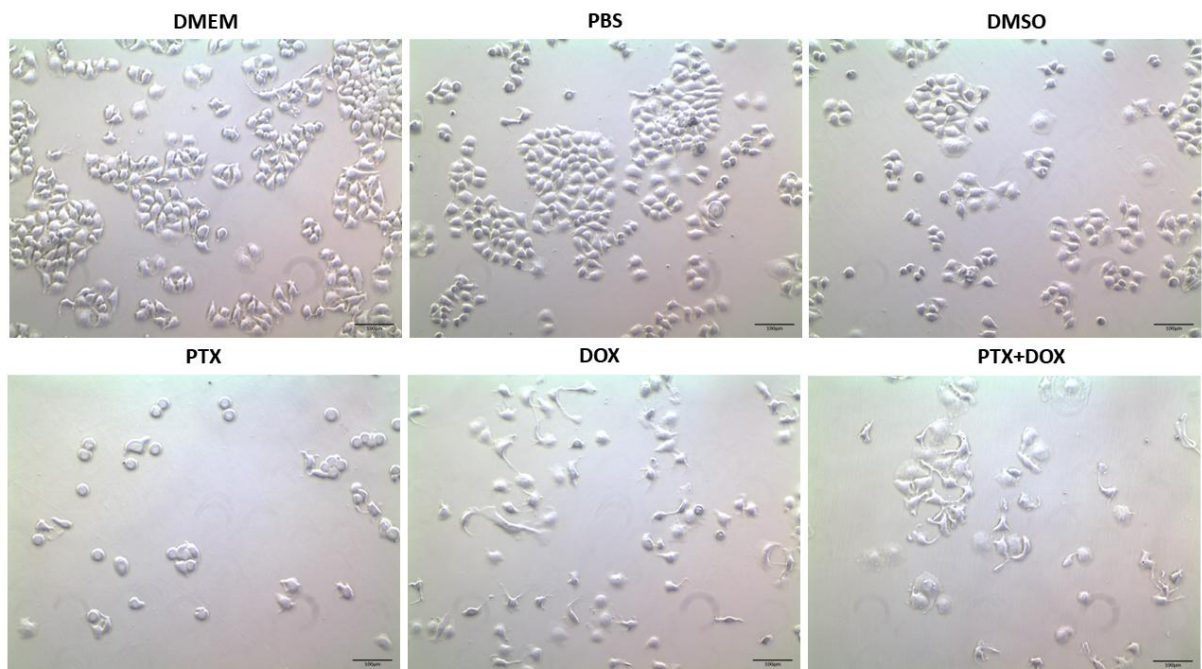
A análise de Kaplan-Meier mostra que não há diferença na sobrevida global de dez anos nos subgrupos de câncer de mama triplo-negativo de pacientes que apresentam expressão alta ou baixa de IL-33. O valor P foi obtido pelo teste de log-rank das curvas de Kaplan-Meier.

## 4.2 Estudo *in vitro*

### 4.2.1 Fotomicrografias das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 após o tratamento com quimioterápicos.

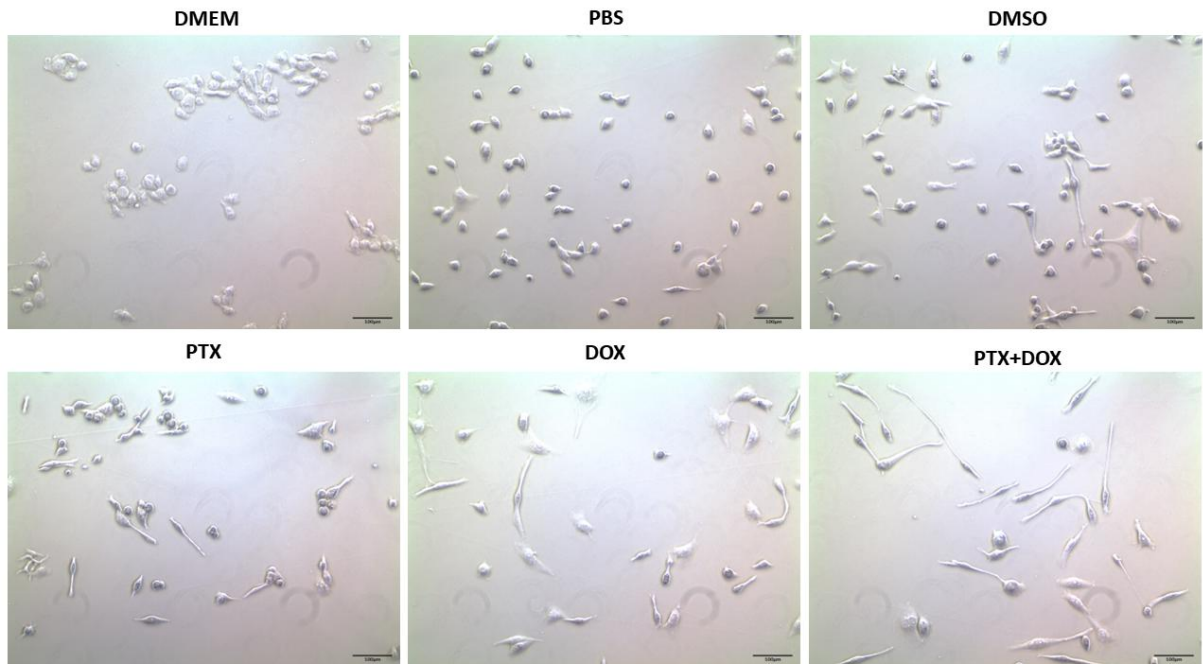
Para exemplificar o estado morfológico das linhagens celulares tumorais após o tratamento com paclitaxel e doxorrubicina, foram registradas, em microscópio óptico, as imagens dos grupos experimentais de MCF-7 e MDA-MB-2631, conforme observado nas **Figuras 23** e **24**. Diante disso, é visivelmente notório a mudança morfológica de ambas as linhagens após o tratamento.

**Figura 23** – Grupos experimentais da linhagem MCF-7 na placa de 6 poços.



Fonte: Dados da Pesquisa (2025). Aumento: 100x. Escala: 100 $\mu$ m. As células MCF-7 (linhagem não triplo negativo) ( $3 \times 10^4$  células/ml) foram incubadas com PBS, DMSO, LPS (20  $\mu$ g/ml), PTX (5  $\mu$ M), DOX (0,1  $\mu$ M) e PTX (2,5  $\mu$ M) combinado com DOX (0,05  $\mu$ M) por 24 horas. Nas imagens, é notório que existem diferenças morfológicas entre os grupos incubados com diluentes e/ou quimioterápicos em comparação ao grupo controle (DMEM). Essas mudanças incluem alterações no tamanho, forma e adesão celular. Além disso, é observado a diminuição da proliferação celular pelo CI50 (concentração inibitória capaz de inibir 50% do crescimento celular), indicado o efeito citotóxico dos antineoplásicos.

**Figura 24** – Grupos experimentais da linhagem MDA-MB-231 na placa de 6 poços.



Fonte: Dados da Pesquisa (2025). Aumento: 100x. Escala: 100 $\mu$ m. Legenda: As células MDA-MB-231 (linhagem triplo negativo) ( $3 \times 10^4$  células/ml) foram incubadas com PBS, DMSO, PTX (5 nM), DOX (0,3  $\mu$ M) e PTX (2,5 nM) combinado com DOX (0,15  $\mu$ M) por 24 horas. Nas imagens, é notório que existem diferenças morfológicas entre os grupos incubados com diluentes e/ou quimioterápicos em comparação ao grupo controle (DMEM). Essas mudanças incluem alterações no tamanho, forma e adesão celular.

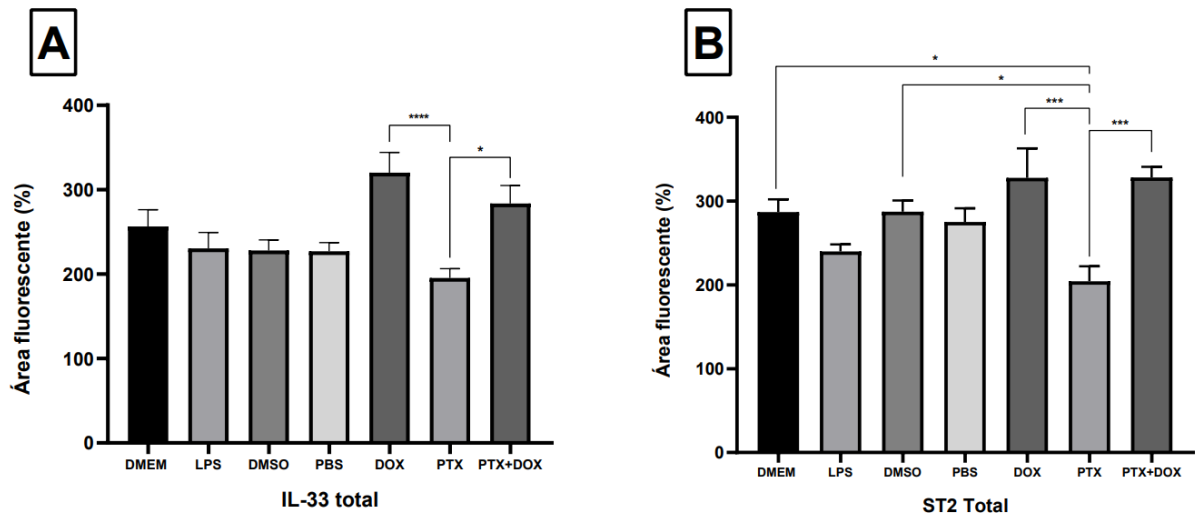
#### **4.2.2 Imunofluorescência do eixo IL-33/ST2 nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7.**

Para avaliar a expressão da interleucina-33, e de seu receptor ST2, nas células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) foi realizada a co-marcação do eixo IL-33/ST2 por Imunofluorescência.

A partir disso, foi possível observar visualmente a presença desse eixo em todos os grupos experimentais, com ou sem tratamento quimioterápico, de ambas as linhagens tumorais, incluindo o grupo controle (apenas meio de cultura), conforme ilustrado qualitativamente nas **Figuras 27 e 28**. Contudo, para verificar a diferença quantitativa da área fluorescente (**Figuras 25 e 26**) entre os grupos experimentais, foi realizada a quantificação da expressão desses marcadores, sendo possível observar uma diferença estatisticamente significativa em todos os grupos, independentemente da linhagem tumoral.

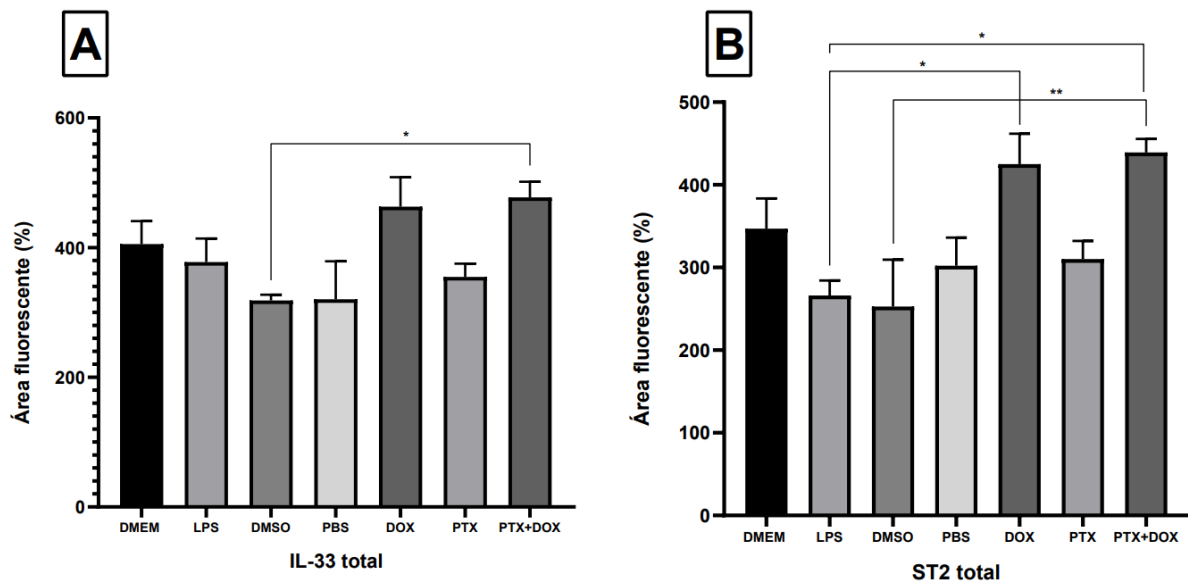
Quanto à área fluorescente de IL-33 tanto as linhagens de triplo negativo (MDA-MB-231) como não triplo negativo (MCF-7), o grupo incubado com doxorubicina apresentou um aumento significativo na expressão de IL-33 em relação aos outros grupos, assim como, a combinação de quimioterápicos paclitaxel e doxorubicina, como ilustra a **figura 25A e 26A**, respectivamente.

**Figura 25** - Quantificação da área fluorescente do eixo IL-33/ST2 da linhagem tumoral MCF-7 (linhagem não triplo negativo).



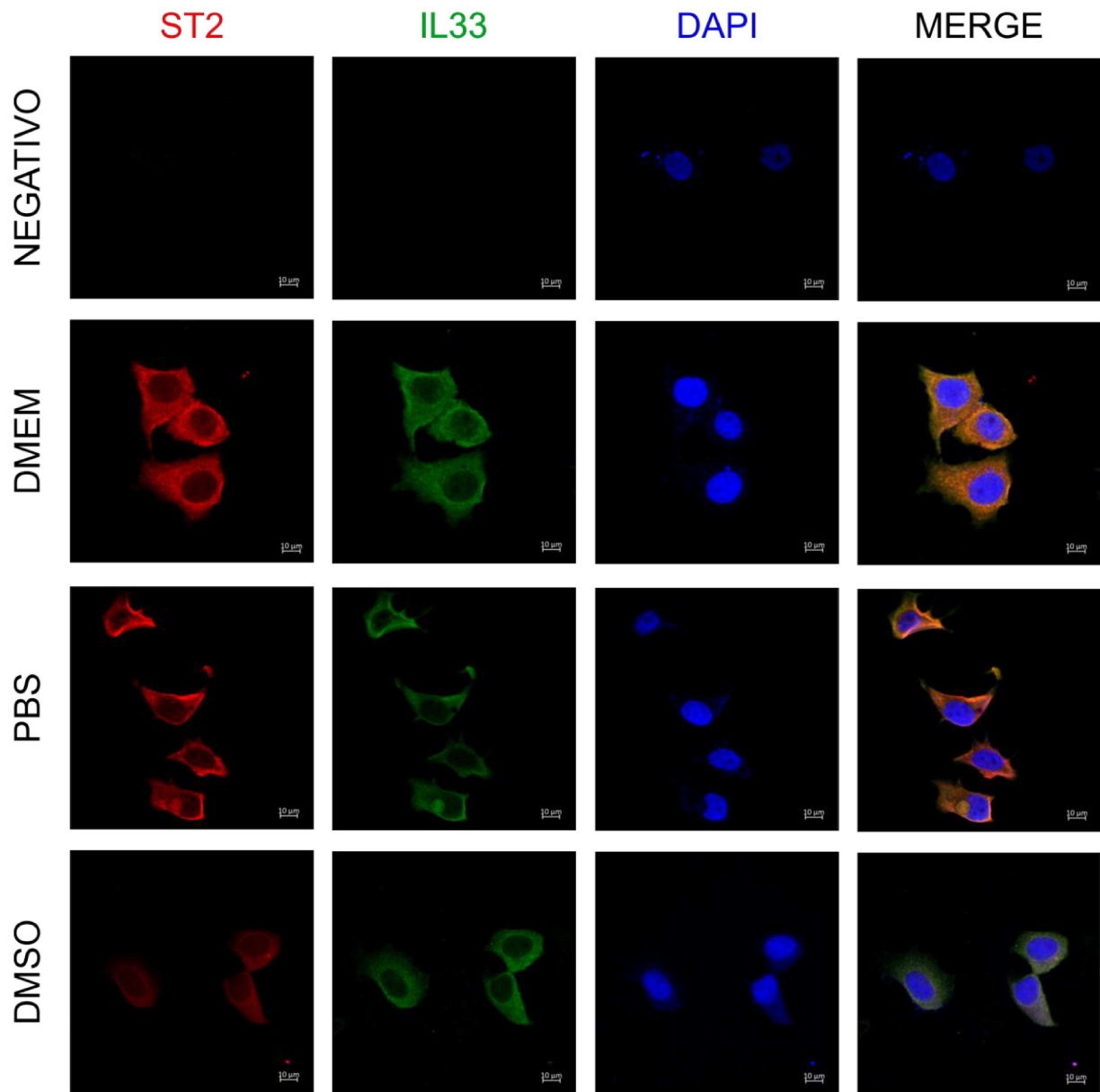
Fonte: Dados da pesquisa (2025). Os resultados da quantificação da área fluorescente realizada com o auxílio do ImageJ, foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. As células MCF-7 (linhagem não triplo-negativo) ( $3 \times 10^4$  células/mL) foram incubadas com LPS (20  $\mu$ g/ml), DMSO, PBS, DOX e/ou PTX por 24 horas. Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído para iniciar o protocolo da imunofluorescência. **a)** As células MCF-7 incubadas com DOX e PTX+DOX mostraram um aumento significativo da expressão de IL-33 *versus* paclitaxel (PTX). **b)** As células MCF-7 incubadas com PTX apresentaram uma menor expressão do receptor ST2 *versus* os grupos DMEM (controle) e DMSO (diluyente do PTX). O grupo incubado com DOX e PTX+DOX apresentou um aumento da expressão de ST2 *versus* PTX. Foi realizada a análise de *one-way* ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, na qual indicou diferenças estatisticamente significativas de \* $p < 0,05$ , \*\* $p > 0,005$  e \*\*\* $p < 0,0001$ .

**Figura 26** - Quantificação da área fluorescente do eixo IL-33/ST2 da linhagem tumoral MDA-MB-231.



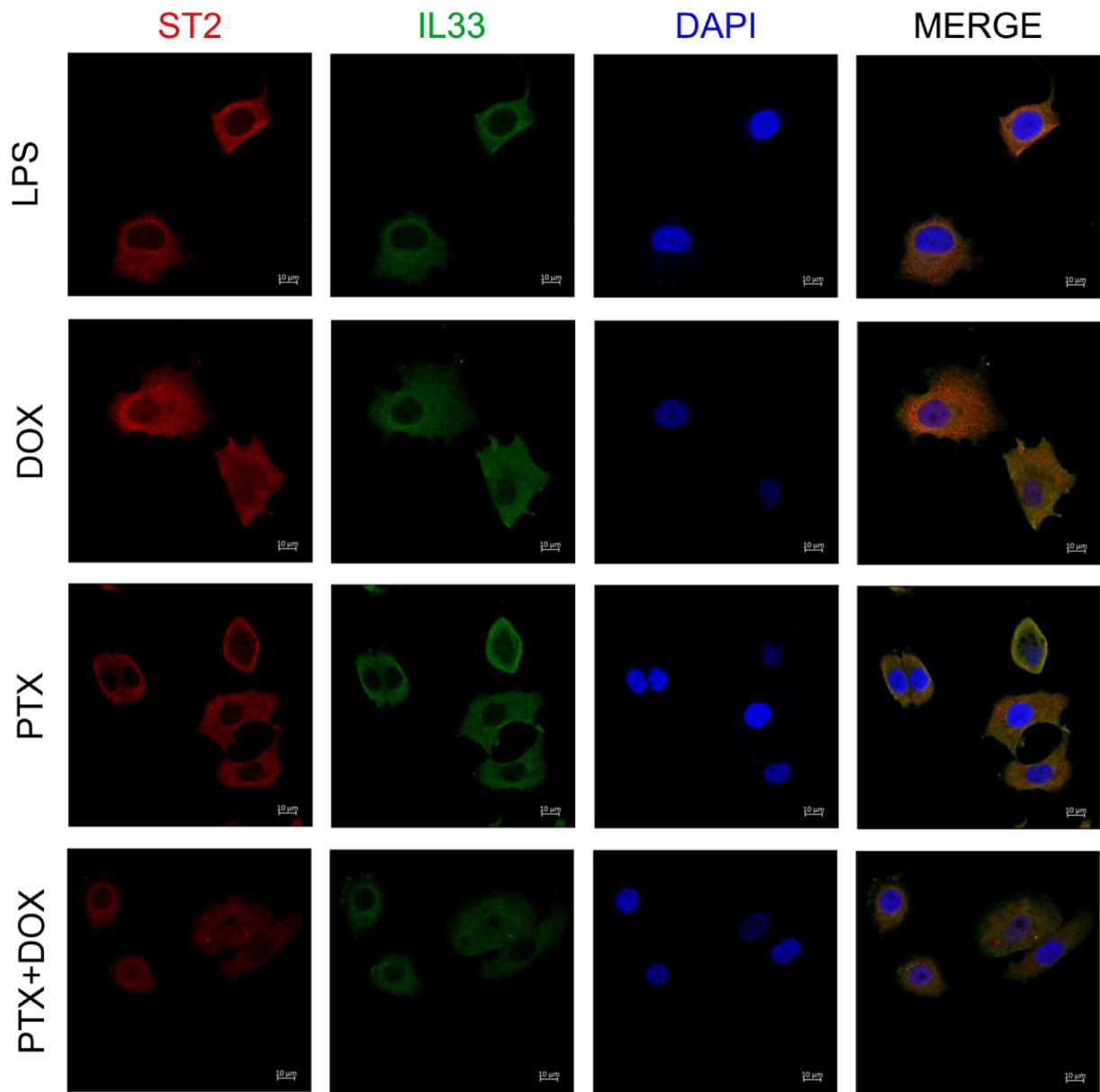
Fonte: Dados da pesquisa (2025). Os resultados da quantificação da área fluorescente, realizada com o auxílio do ImageJ, foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes. As células MDA-MB-231 (linhagem triplo negativo) ( $3 \times 10^4$  células/mL) foram incubadas com LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), DMSO, PBS, DOX e/ou PTX por 24 horas. Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído para iniciar o protocolo da imunofluorescência. **a)** As células MDA-MB-231 incubadas com PTX+DOX apresentaram um aumento significativo da expressão de IL-33 versus DMSO (dilúente do PTX). **b)** As células MDA-MB-231 incubadas com DOX e PTX+DOX apresentaram um aumento da expressão de ST2 versus LPS. O grupo PTX+DOX apresentou um aumento na expressão de ST2 versus DMSO. Foi realizada a análise de one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, na qual indicou diferenças estatisticamente significativas de  $*p < 0,05$ ,  $**p > 0,005$  e  $***p < 0,0001$ .

**Figura 27 A** - Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral de CMTN (MDA-MB-231) incubadas com DMEM, PBS, DMSO.



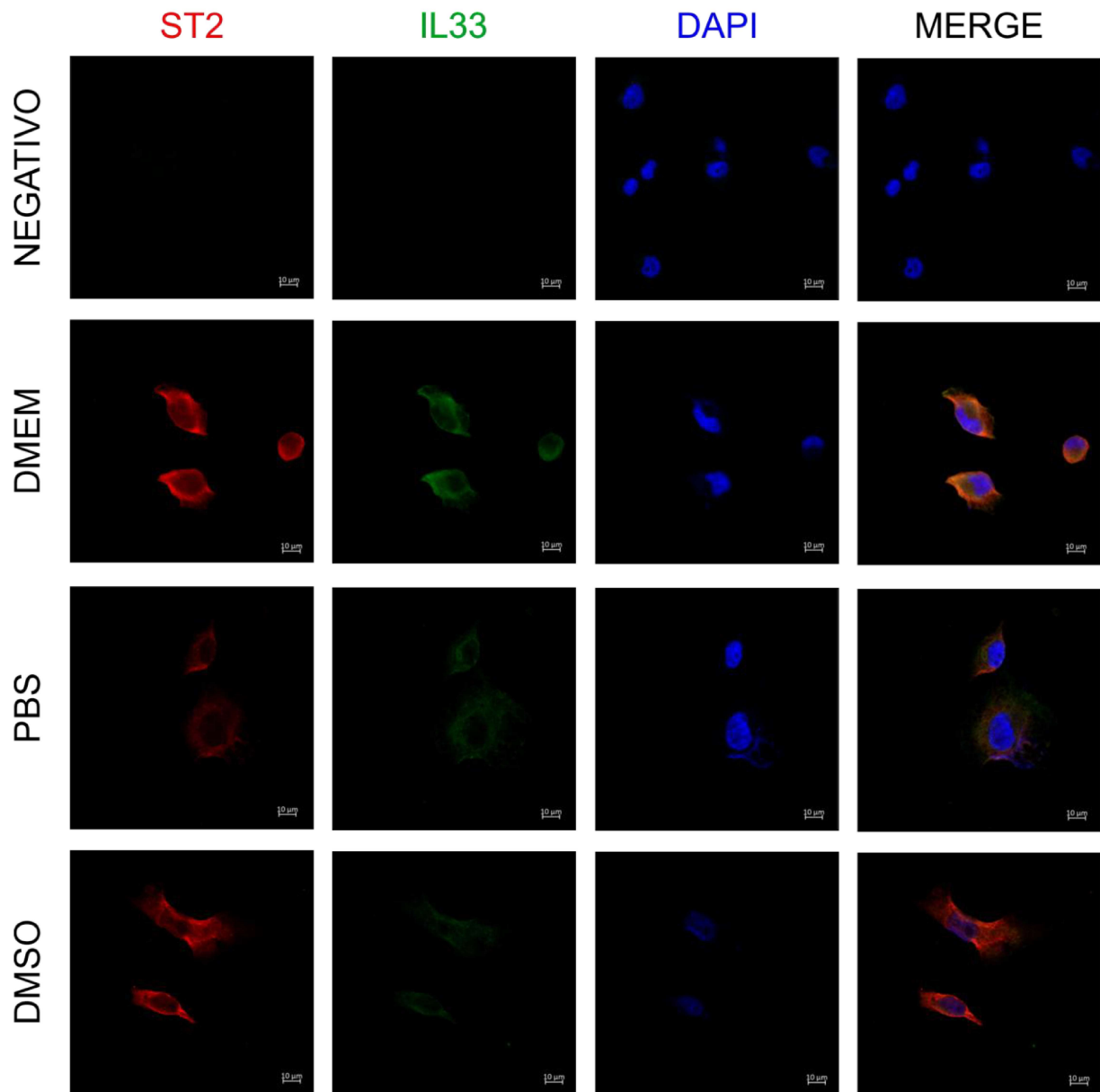
Fonte: Dados da pesquisa (2025). Legenda: As células MDA-MB-231 ( $3 \times 10^4$  células/ml) foram tratadas com PBS, DMSO, LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ), PTX (5 nM), DOX (0,3  $\mu\text{M}$ ) e PTX (2,5 nM) combinado com DOX (0,15  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas para o protocolo de Imunofluorescência. MERGE: sobreposição da IL-33, ST2 e Dapi. VERDE: IL-33; VERMELHO: ST2; azul: DAPI (marcador nuclear). Negativo: incubado apenas com anticorpo secundário. Na figura, observa-se qualitativamente uma redução da fluorescência de IL-33/ST2 no grupo DMSO em comparação ao grupo PBS. Aumento: 400x. Escala: 10 $\mu\text{m}$ . Foto realizada no microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) na Central Analítica da UFC.

**Figura 27 B** - Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral de CMTN (MDA-MB-231) incubadas com LPS, DOX, PTX e DOX/PTX.



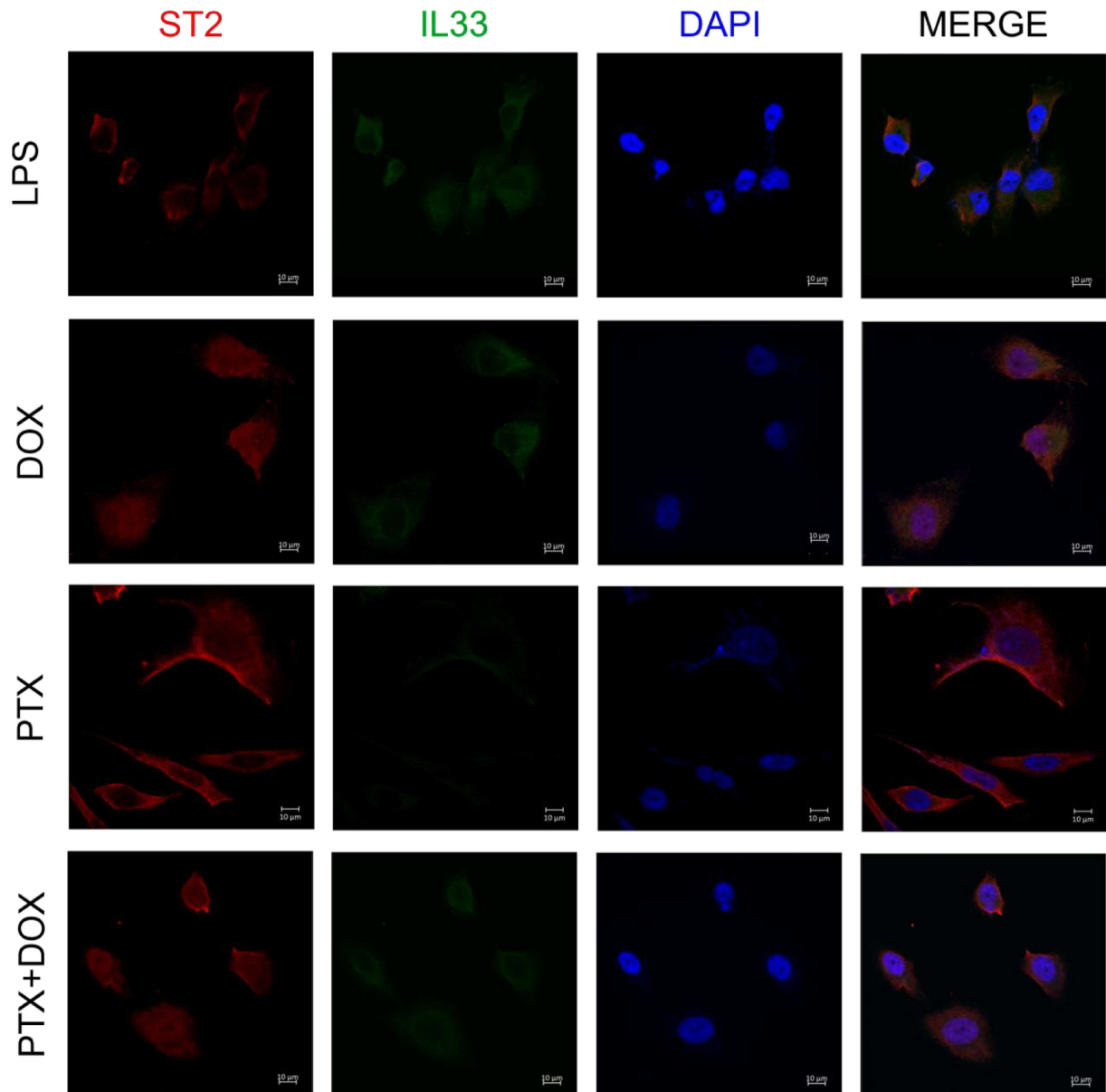
Fonte: Dados da pesquisa (2025). Legenda: As células MDA-MB-231 ( $3 \times 10^4$  células/ml) foram tratadas com PBS, DMSO, LPS (10 µg/ml), PTX (5 nM), DOX (0,3 µM) e PTX (2,5 nM) combinado com DOX (0,15 µM) por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas para o protocolo de Imunofluorescência. MERGE: sobreposição da IL-33, ST2 e Dapi. VERDE: IL-33; VERMELHO: ST2; azul: DAPI (marcador nuclear). Negativo: incubado apenas com anticorpo secundário. Na figura, observa-se quantitativamente um aumento da fluorescência de IL-33 no grupo PTX+DOX *versus* DMSO. Aumento: 400x. Escala: 10µm. Foto realizada no microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) na Central Analítica da UFC.

**Figura 28 A-** Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral MCF-7 incubadas com DMEM, PBS e DMSO.



Fonte: Dados da pesquisa (2025). Legenda: As células MCF-7 ( $3 \times 10^4$  células/ml) foram tratadas com PBS, DMSO, LPS (20 µg/ml), PTX (5 µM), DOX (0,1 µM) e PTX (2,5 µM) combinado com DOX (0,05 µM) por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas para o protocolo de Imunofluorescência. MERGE: sobreposição da IL-33, ST2 e Dapi. VERDE: IL-33; VERMELHO: ST2; azul: DAPI (marcador nuclear). Negativo: incubado apenas com anticorpo secundário. Na figura, observa-se qualitativamente uma semelhança da fluorescência de IL-33/ST2 entre os diluentes (PBS e DMSO). Aumento: 400x. Escala: 10µm. Foto realizada no microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) na Central Analítica da UFC.

**Figura 28 B** - Expressão de IL-33/ST2 na linhagem tumoral MCF-7 incubadas com LPS, DOX, PTX e DOX/PTX.

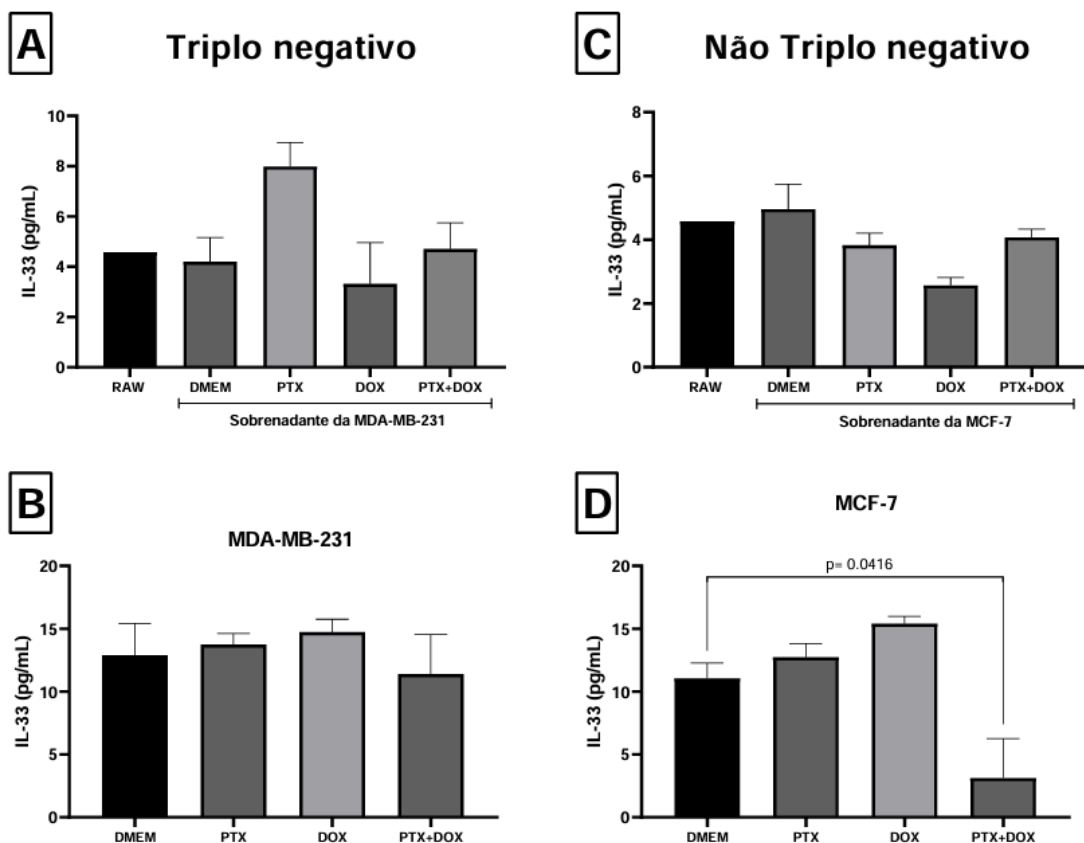


Fonte: Dados da pesquisa (2025). Legenda: As células MCF-7 ( $3 \times 10^4$  células/ml) foram tratadas com PBS, DMSO, LPS (20  $\mu\text{g/ml}$ ), PTX (5  $\mu\text{M}$ ), DOX (0,1  $\mu\text{M}$ ) e PTX (2,5  $\mu\text{M}$ ) combinado com DOX (0,05  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento, as células foram fixadas para o protocolo de Imunofluorescência. MERGE: sobreposição da IL-33, ST2 e Dapi. VERDE: IL-33; VERMELHO: ST2; azul: DAPI (marcador nuclear). Negativo: incubado apenas com anticorpo secundário. Na figura, um aumento da expressão de ST2 dos grupos DMEM, DMSO e DOX *versus* PTX ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, quantitativamente o grupo PTX+DOX apresentou uma expressão maior de ST2 *versus* PTX ( $p < 0,05$ ). Aumento: 400x. Escala: 10 $\mu\text{m}$ . Foto realizada no microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) na Central Analítica da UFC.

A **Figura 29** apresenta os dados obtidos na quantificação de IL-33 tanto para o sobrenadante advindos diretamente das linhagens tumorais MDA-MB-231 (triplo negativo) e MCF-7 (não triplo negativo), quanto para o sobrenadante condicionado com linhagem tumoral que estava em contato com RAW 264.7 (macrófagos).

Quanto a dosagem de IL-33 na linhagem tumoral não foi possível observar nenhuma diferença estatística entre os grupos da MDA-MB-231. Já na MCF-7, foi notório a redução da concentração da IL-33 no grupo PTX+DOX em comparação ao grupo DMEM ( $p > 0,05$ ).

**Figura 29** – Dosagem de níveis de IL-33 no sobrenadante das células de macrófagos previamente estimuladas com a quimioterapia nas células tumorais.

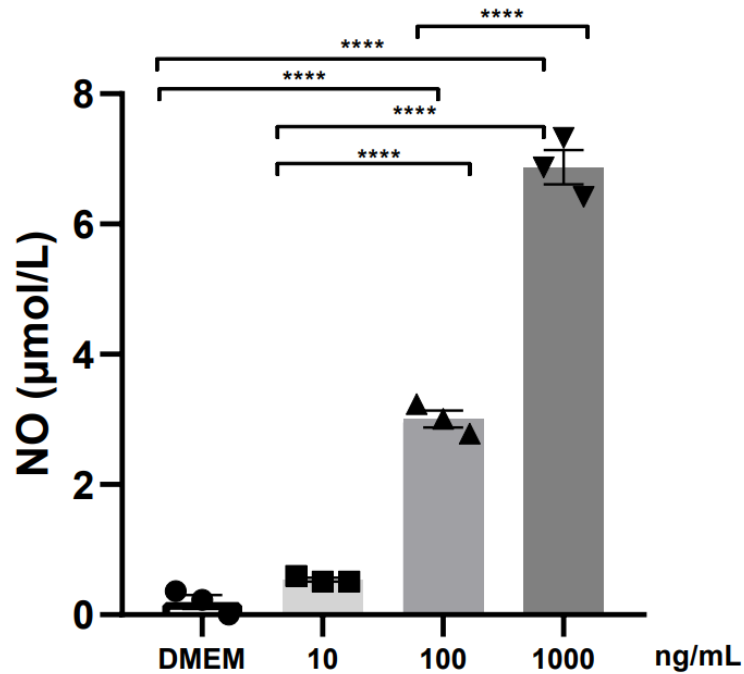


Legenda: Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média da quantidade de cada citocina em pg/ml. IL-33: Interleucina 33. RAW: linhagem de macrófago utilizada RAW 264.7; DMEM: meio de cultivo celular - Dulbecco's Modified Eagle Medium; PTX: paclitaxel; DOX: doxorrubicina. **a)** RAW 264.7 incubada com sobrenadante da MDA-MB-231 (triplo negativo). **b)** sobrenadante da linhagem tumoral triplo negativo (MDA-MB-231). **c)** RAW 264.7 incubada com sobrenadante da MCF-7 (não triplo negativo). **d)** sobrenadante da linhagem tumoral não triplo negativo (MCF-7). Observou-se uma diminuição da concentração de IL-33 no grupo PTX+DOX *versus* DMEM (controle) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Avaliação da ativação da linhagem celular RAW 264.7

Para avaliar a melhor concentração de LPS de acordo com as condições experimentais para a estimulação da RAW 264.7 ( $5,0 \times 10^5$  células/mL), foi realizada inicialmente uma curva de concentração (10, 100 e 1000 ng/mL) com o tempo de 24h. A **Figura 30** demonstra que as células tiveram uma maior produção de nitrito, ou seja, de forma indireta a produção de óxido nítrico ( $6,87 \mu\text{mol/L}$ ) na concentração de 1000 ng/mL.

**Figura 30** - Produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da RAW 264.7 estimulados com diferentes concentrações (10, 100 e 1000 ng/mL) de LPS.



Fonte: Dados da pesquisa (2025). Curva de concentração de LPS (10, 100 e 1000 ng/mL) incubado por 24h. Observou-se que as três concentrações estimularam a produção de NO *versus* DMEM (controle basal da RAW 264.7). A análise de one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey indicou diferenças estatisticamente significativas de  $***p < 0,0001$ . Os resultados de NO foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes.

#### ***4.2.4 Dosagem de Óxido Nítrico***

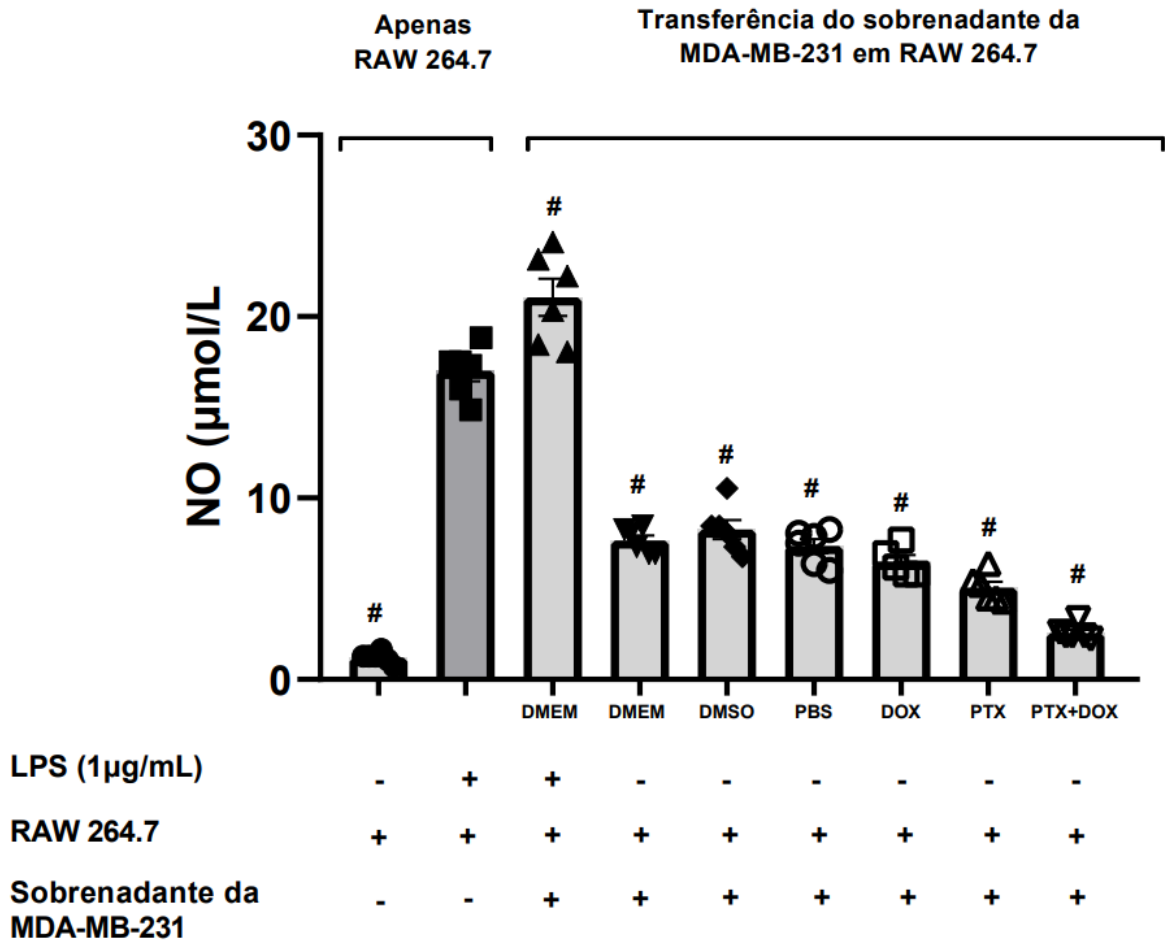
Após a escolha da concentração de LPS para ativação da RAW 264.7 foi realizado a dosagem de óxido nítrico (NO) pela dosagem de nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ) no sobrenadante advindo da linhagem tumoral incubados em RAW 264.7 por 24 horas, pelo reagente de Griess.

Na **Figura 31** observa-se que o grupo da RAW 264.7 sem o estímulo de LPS (controle negativo) não apresentou produção significativa de óxido nítrico quando comparado ao grupo estimulado com LPS (controle positivo).

Quanto à RAW 264.7 previamente estimulada com LPS antes da transferência do sobrenadante da MDA-MB-231, observou-se uma maior produção de óxido nítrico em comparação ao controle positivo, em decorrência da exposição a dois estímulos estressantes. Já em relação aos outros grupos experimentais, percebe-se que, mesmo sem o estímulo prévio do LPS na RAW 264.7, todos os sobrenadantes da MDA-MB-231 foram capazes de induzir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

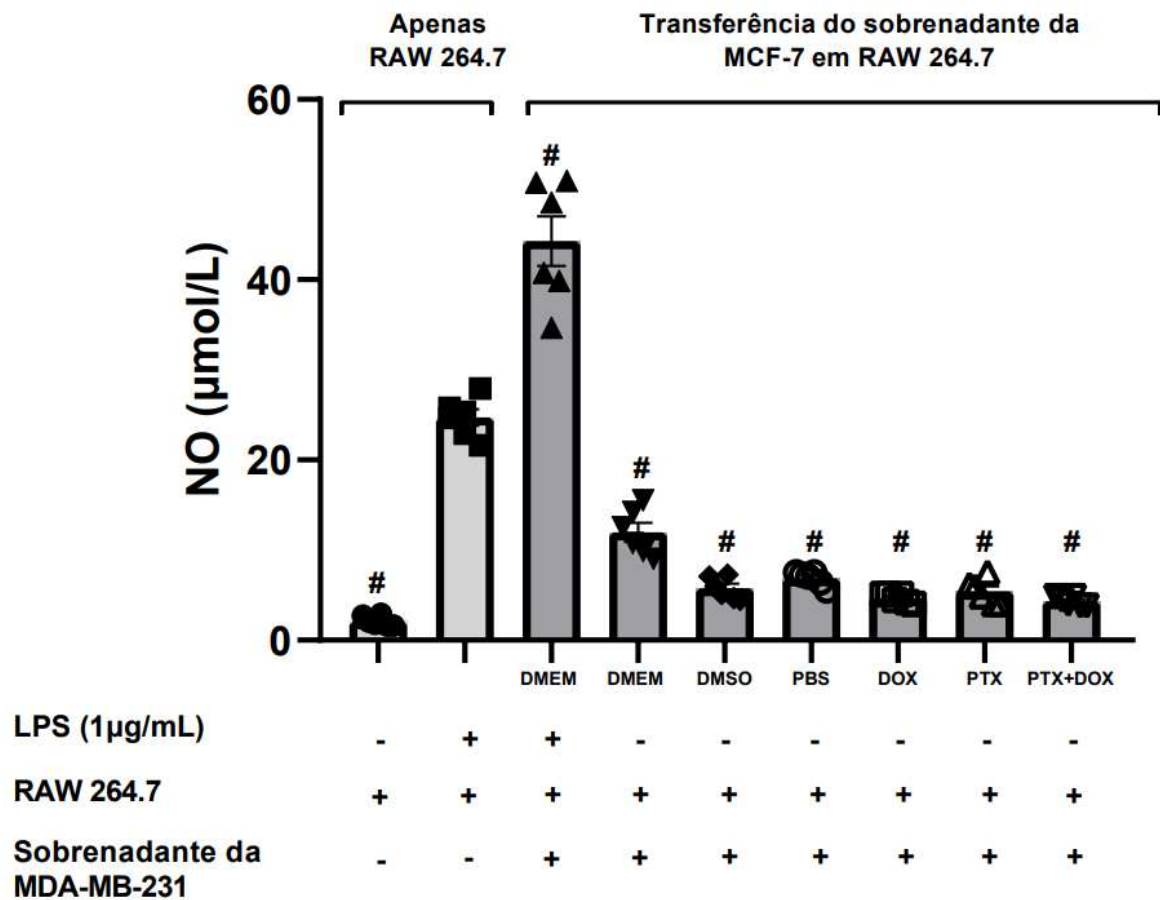
Além disso, os resultados mostraram uma menor produção do óxido nítrico nos sobrenadantes com quimioterapia (paclitaxel e doxorrubicina) em relação aos grupos apenas com o meio de cultura DMEM ou com os diluentes das drogas (PBS e DMSO), indicando que o PTX e/ou DOX podem ter inibido a produção do óxido nítrico.

**Figura 31** - Níveis de produção de óxido nítrico do sobrenadante da MDA-MB-231 incubados em macrófagos RAW 264.7 durante 24 horas.



Fonte: Dados da pesquisa (2025). O controle basal (M0) apresentou baixa produção de NO. O controle positivo para ativação do fenótipo M1 (incubado com LPS) apresentou elevada produção de óxido nítrico *versus* basal. A linhagem RAW 264.7, previamente estimulada com LPS e incubada com o sobrenadante da linhagem tumoral triplo negativo, demonstrou aumento na produção de NO em comparação ao controle positivo. Por conseguinte, foi observada produção de NO em todos os grupos experimentais, mesmo sem estímulo prévio com LPS, após incubação com o sobrenadante da linhagem tumoral. A análise de Variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett indicou diferenças estatisticamente significativas de # $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle positivo, que seria o grupo da RAW 264.7 incubada estimulada com LPS (positivo). Os resultados de NO foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de seis experimentos independentes.

**Figura 32** - Níveis de produção de óxido nítrico do sobrenadante da MCF-7 incubados em macrófagos RAW 264.7 durante 24 horas.



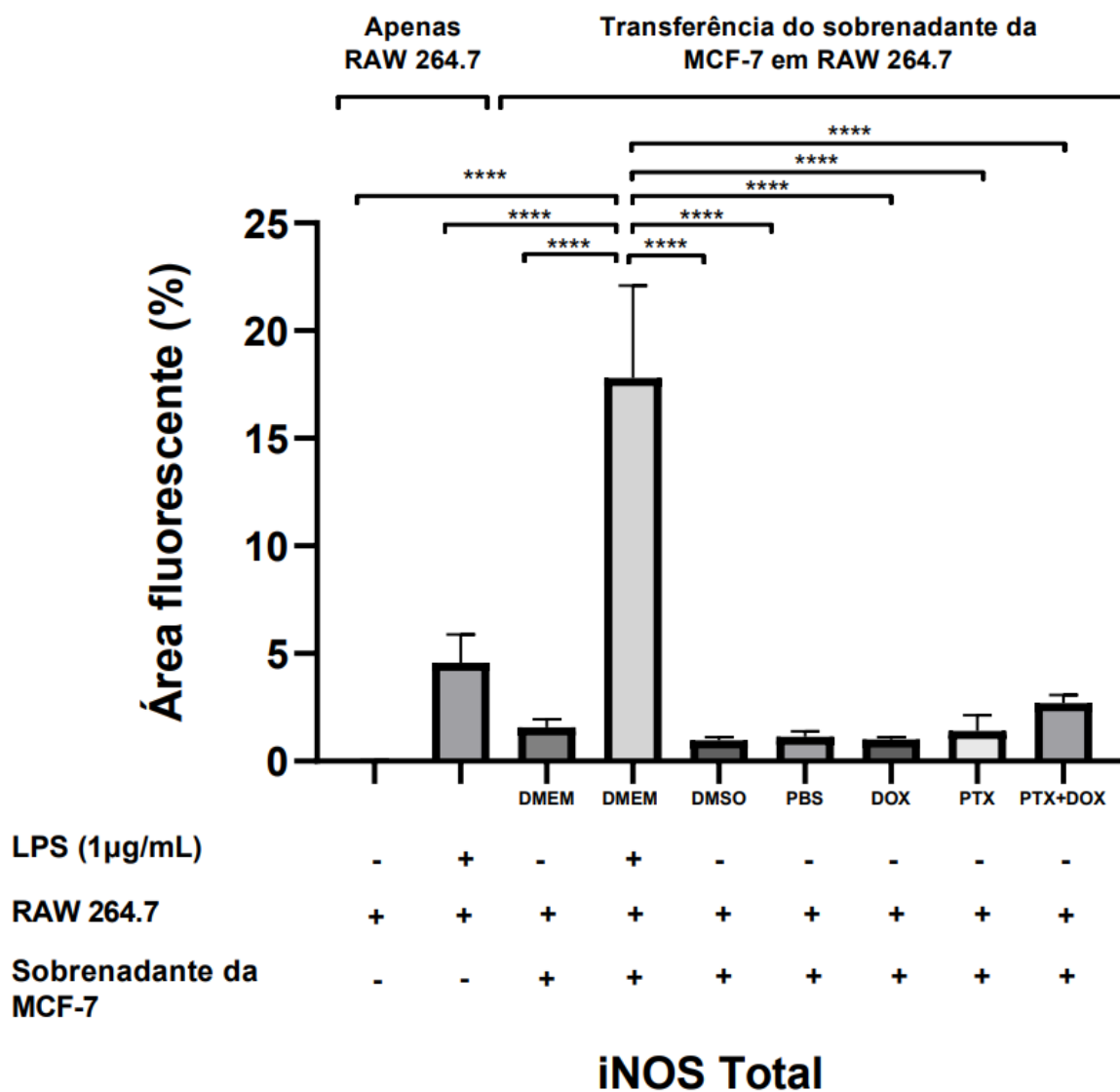
Fonte: Dados da pesquisa (2025). O controle basal (M0) apresentou baixa produção de NO. O controle positivo para ativação do fenótipo M1 (incubado com LPS) apresentou elevada produção de óxido nítrico *versus* basal. A linhagem RAW 264.7, previamente estimulada com LPS e incubada com o sobrenadante da linhagem tumoral não triplo negativo, demonstrou aumento na produção de NO em comparação ao controle positivo. Por conseguinte, foi observada produção de NO em todos os grupos experimentais, mesmo sem estímulo prévio com LPS, após incubação com o sobrenadante da linhagem tumoral. A análise de one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Dunnett indicou diferenças estatisticamente significativas de # $p < 0,0001$  em relação ao grupo controle positivo, que seria o grupo da RAW 264.7 estimulada com LPS (positivo). Os resultados de NO foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de seis experimentos independentes.

#### ***4.2.5 Imunofluorescência de iNOS e Arginase-1 em RAW 264.7 estimulados com o sobrenadante da MDA-MB-231 e MCF-7.***

Em relação à imunofluorescência de iNOS e Arginase-1 em RAW 264.7 incubadas com o sobrenadante da MDA-MB-231, observou-se que em ambas as linhagens foi observada a ativação da RAW 264.7 para o perfil M1, confirmada pela marcação do iNOS.

Quanto à linhagem MCF-7, foi observada uma diferença significativa entre todos os grupos experimentais em relação ao grupo DMEM da MCF-7 com RAW 264.7 ativada com LPS, evidenciando que, mesmo sem ativação prévia a RAW 264.7 conseguiu polarizar para o perfil M1, independentemente da quimioterapia. Contudo, os grupos com quimioterapia tiveram sua imunofluorescência potencializada de iNOS, conforme mostrada na **Figura 33**.

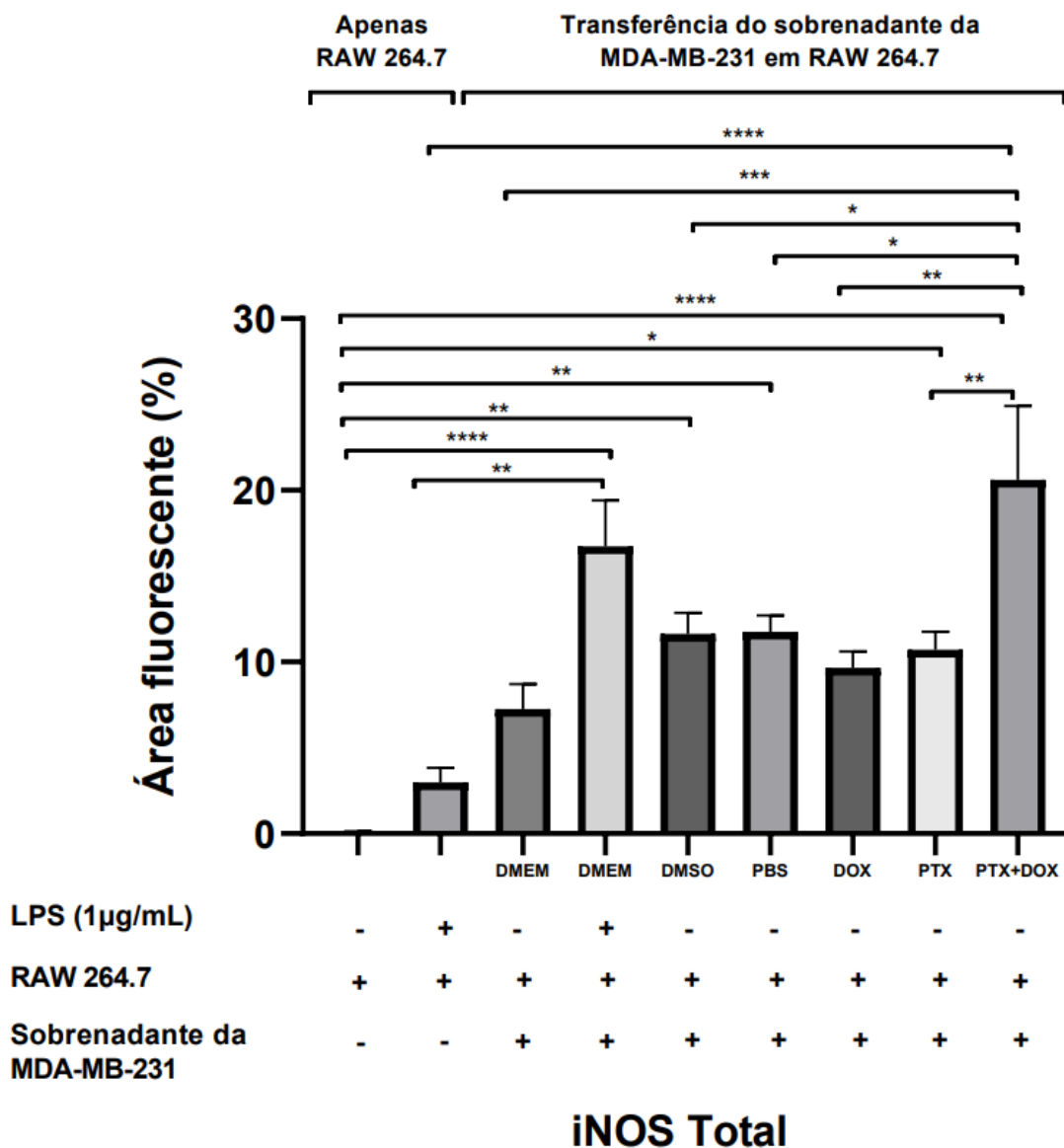
**Figura 33** - Quantificação da área fluorescente de iNOS da linhagem tumoral MCF-7.



Fonte: Dados da pesquisa (2025). A análise de one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey indicou diferenças estatisticamente significativas de \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Os resultados da expressão de iNOS foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes.

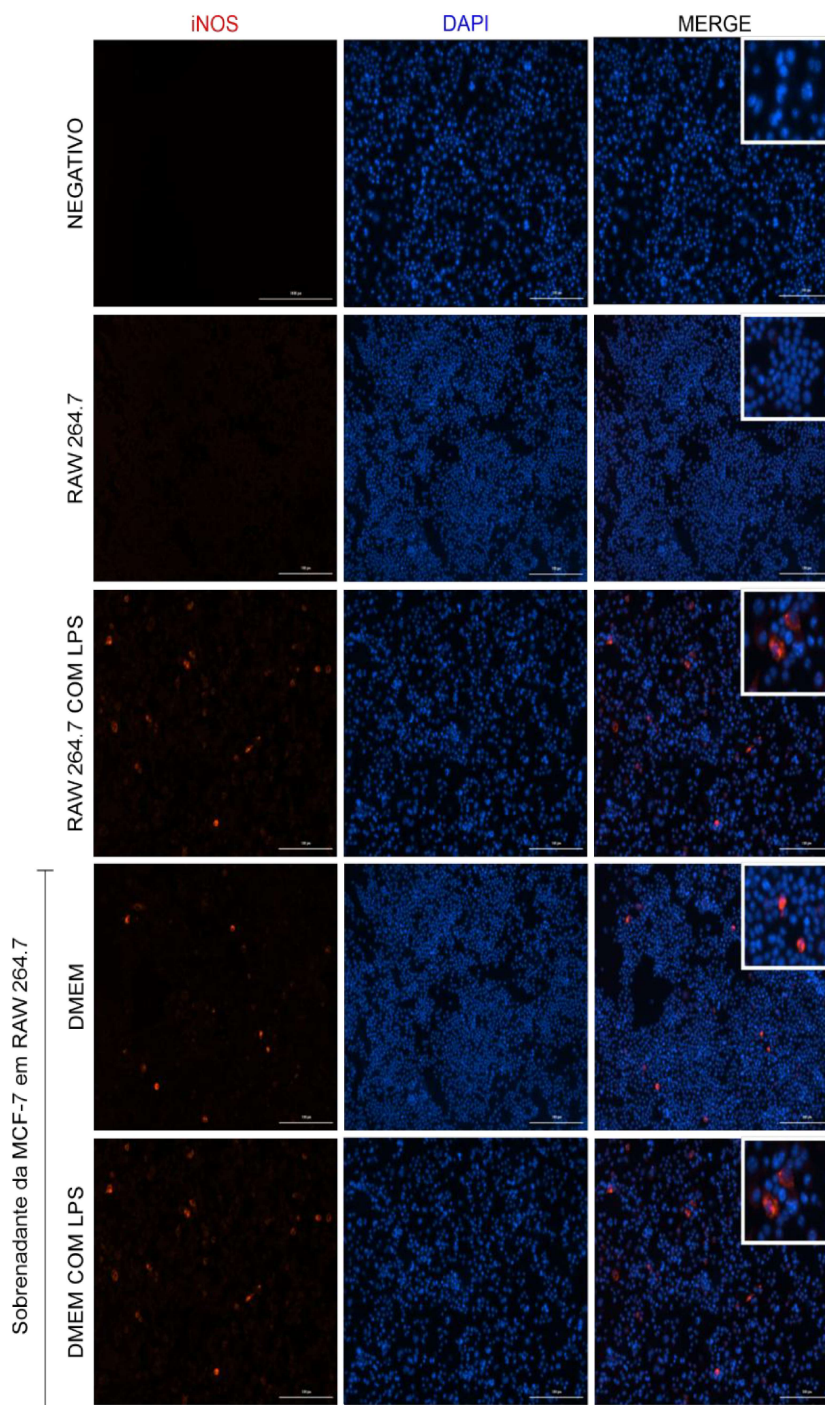
Quanto à linhagem MDA-MB-231, percebeu-se um comportamento diferente da linhagem MCF-7. O grupo da RAW 264.7 exposto ao sobrenadante da MDA-MB-231, com a combinação de quimioterápicos (PTX+DOX), apresentou uma área fluorescente maior em relação aos outros grupos, conforme observado na **Figura 34**.

**Figura 34** - Quantificação da área fluorescente de iNOS da linhagem tumoral MDA-MB-231.



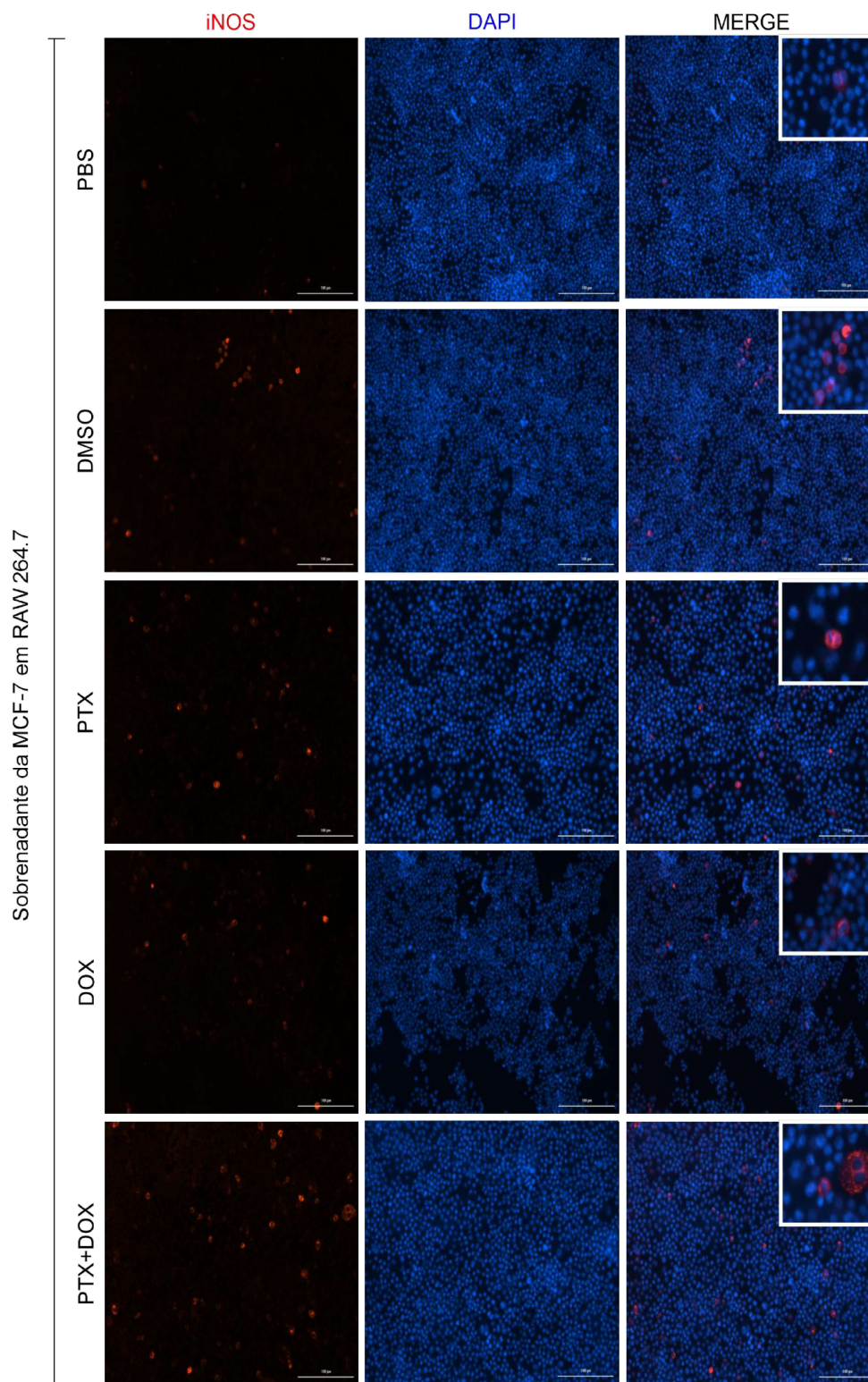
Fonte: Dados da pesquisa (2025). A análise de one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey indicou diferenças estatisticamente significativas de \* $P < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  e \*\*\* $p < 0,0001$ . Os resultados da expressão de iNOS foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos independentes.

**Figura 35 A-** Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (continua).



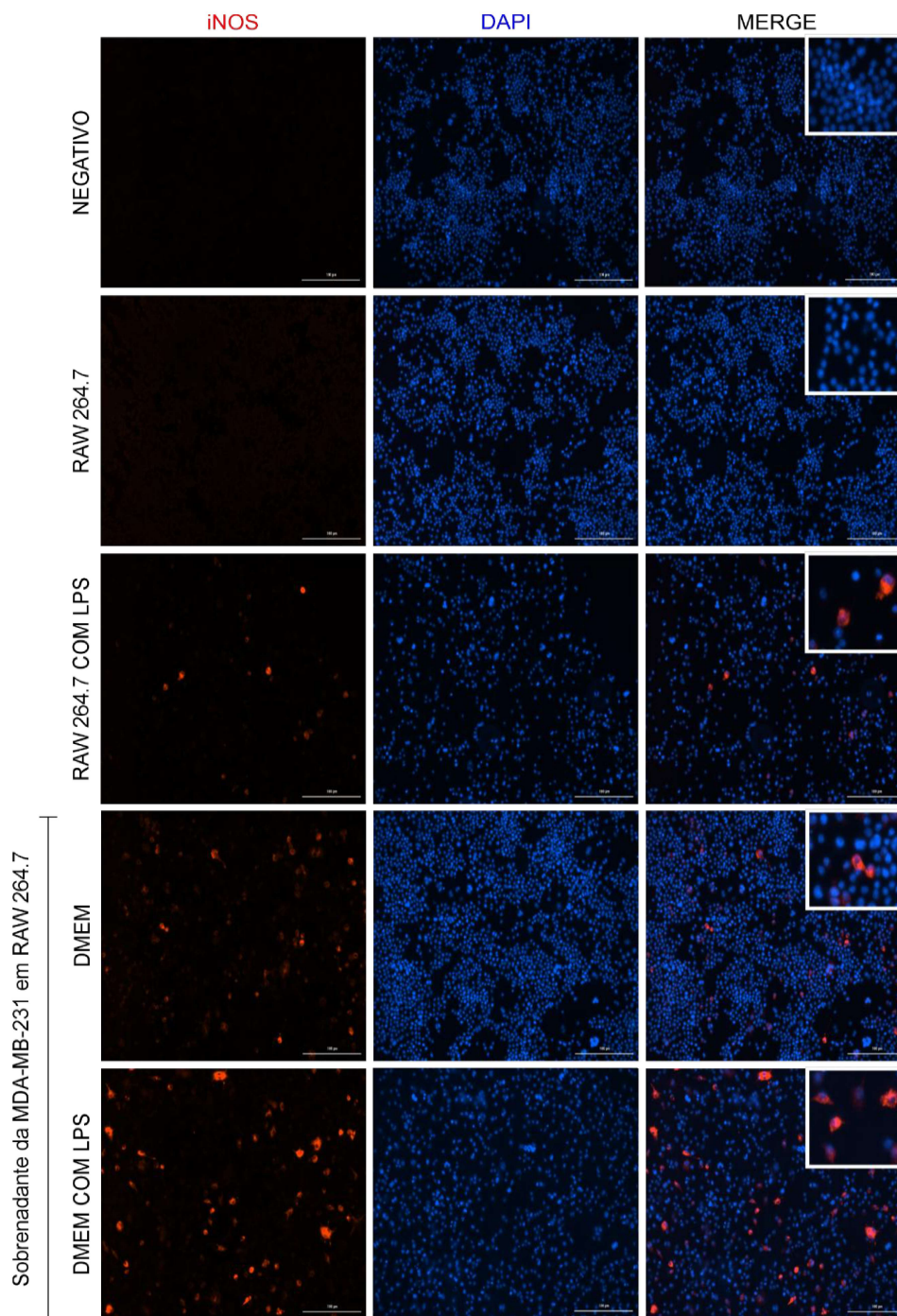
Fonte: Dados da pesquisa (2025). O grupo negativo foi incubado apenas com anticorpo secundário conjugado fluoróforo. Ao incubar a RAW 264.7 basal com anticorpo primário (iNOS), foi possível confirmar o fenótipo M0, evidenciando que as células não estavam estressadas durante o protocolo experimental. A RAW 264.7 estimulada com LPS mostrou o controle positivo para fenótipo M1. Os macrófagos incubados com o sobrenadante da linhagem tumoral não triplo negativo expressaram iNOS. Houve um aumento da expressão de iNOS do grupo DMEM com LPS *versus* DMEM ( $p < 0,05$ ). Legenda: VERMELHO: iNOS; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10µm.

**Figura 35B** - Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (final).



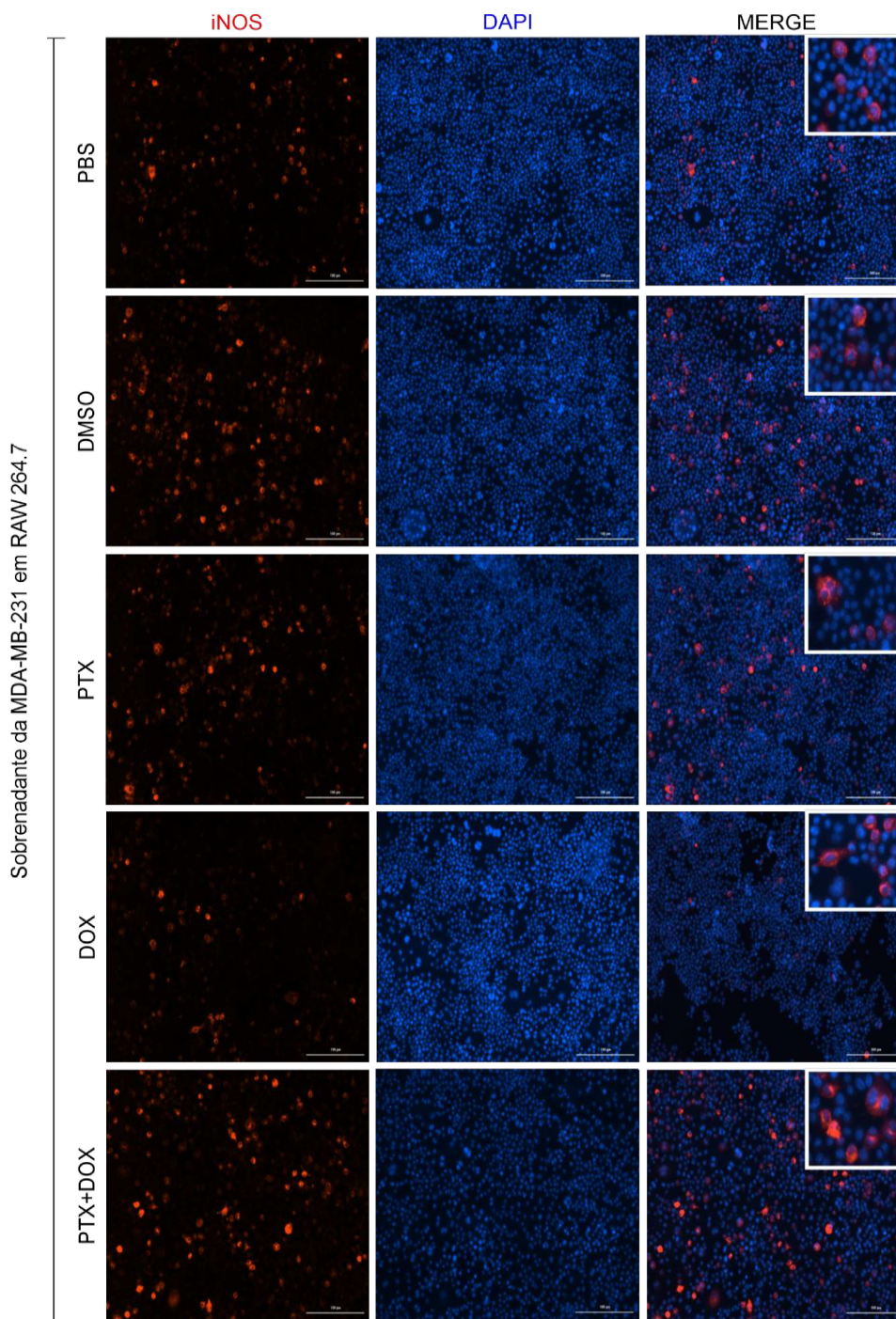
Fonte: Dados da pesquisa (2025). Houve um aumento da expressão de iNOS no grupo PTX+DOX *versus* DMEM, DMSO, PBS e DOX ( $p < 0,05$ ). Legenda: VERMELHO: iNOS; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10µm.

**Figura 36A** - Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (continua).



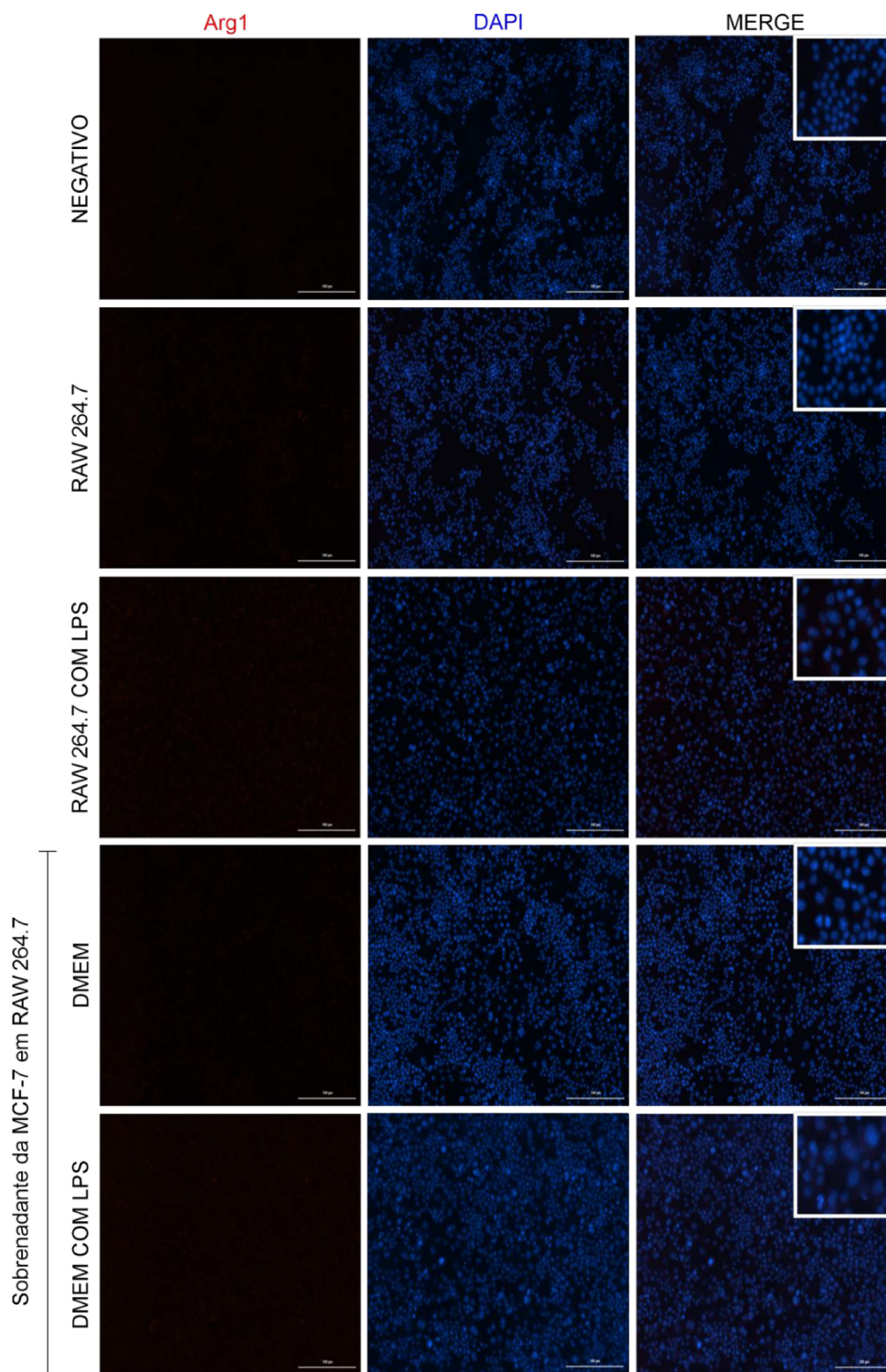
Fonte: Dados da pesquisa (2025). O grupo negativo foi incubado apenas com anticorpo secundário conjugado fluoróforo. Ao incubar a RAW 264.7 basal com anticorpo primário (iNOS), foi possível confirmar o fenótipo M0, evidenciando que as células não estavam estressadas durante o protocolo experimental. A RAW 264.7 estimulada com LPS mostrou o controle positivo para fenótipo M1. Os macrófagos incubados com o sobrenadante da linhagem tumoral triplo negativo expressaram iNOS. Houve um aumento da expressão de iNOS do grupo DMEM com LPS *versus* DMEM ( $p < 0,05$ ). Legenda: VERMELHO: iNOS; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10 $\mu$ m.

**Figura 36B** - Expressão de iNOS por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (final).



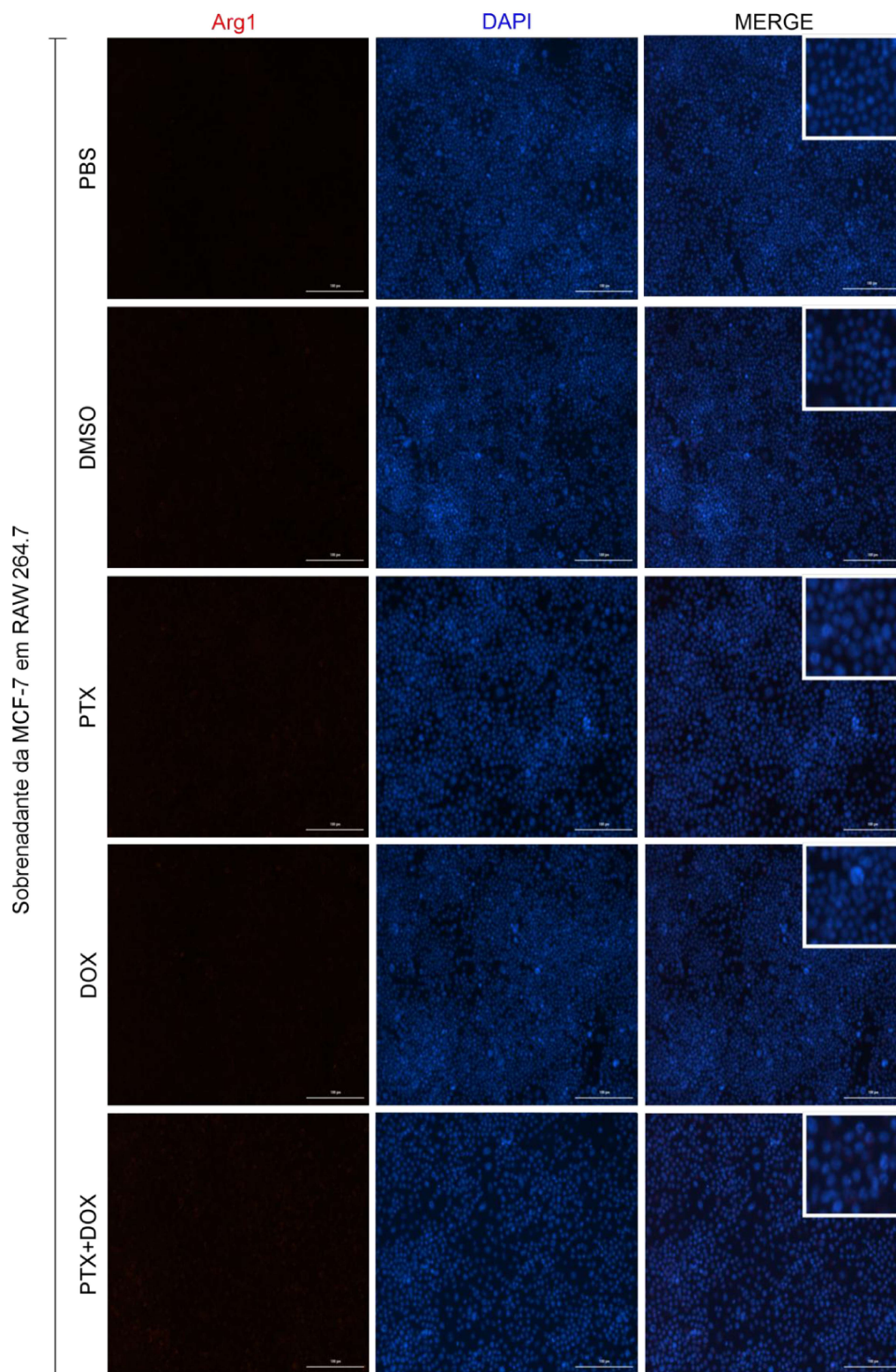
Fonte: Dados da pesquisa (2025). Houve um aumento da expressão de iNOS no grupo PTX+DOX *versus* DMEM, DMSO, PBS, PTX e DOX ( $p < 0,05$ ). Legenda: VERMELHO: iNOS; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10 $\mu$ m.

**Figura 37A** - Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (continua).



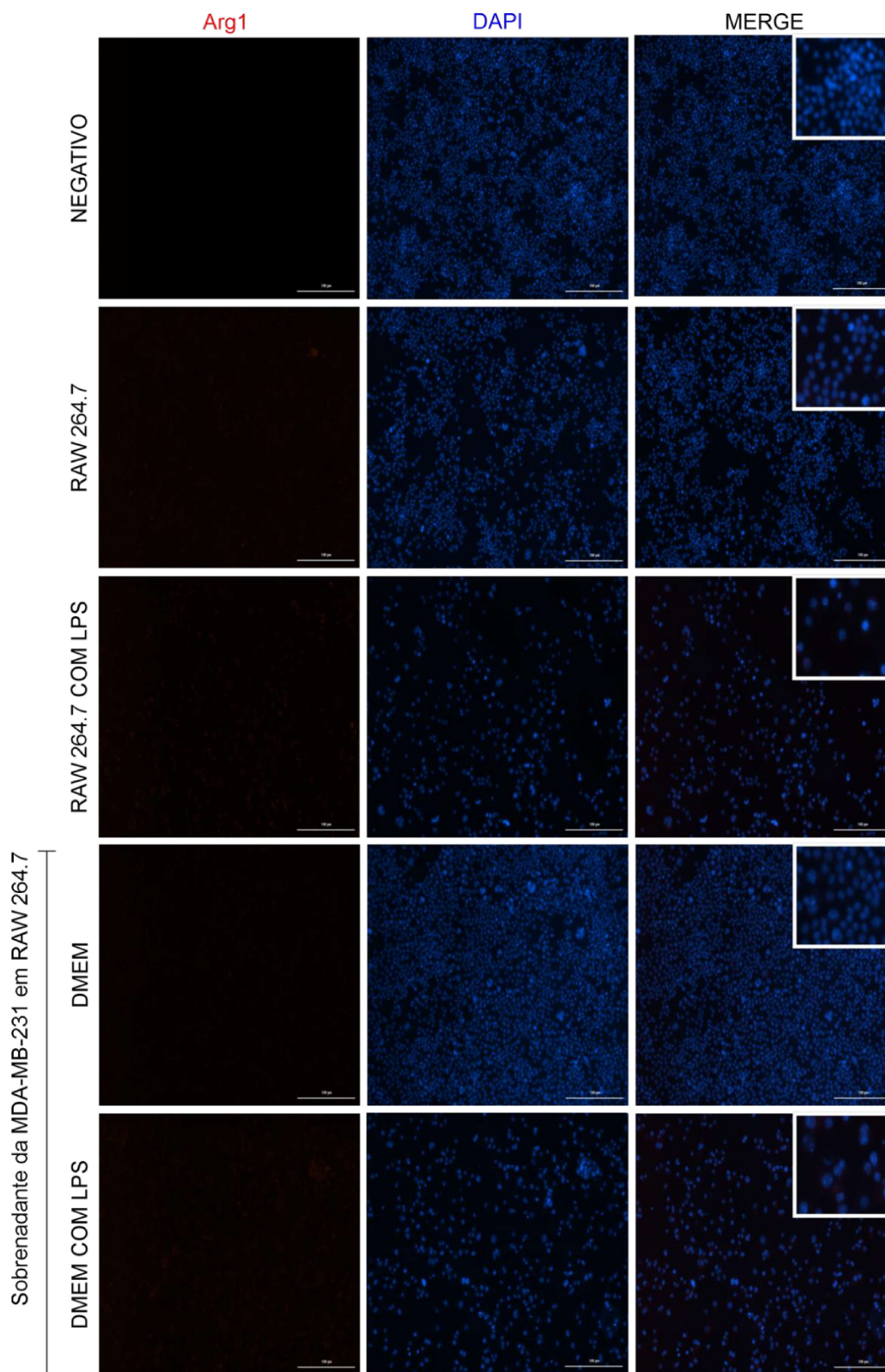
Fonte: Dados da pesquisa (2025). O grupo negativo foi incubado apenas com anticorpo secundário conjugado fluoróforo. Ao incubar a RAW 264.7 basal com anticorpo primário (Arginase-1) não foi nenhuma expressão para o fenótipo M2. Legenda: VERMELHO:Arginase-1; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10 $\mu$ m.

**Figura 37B** - Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MCF-7 (final).



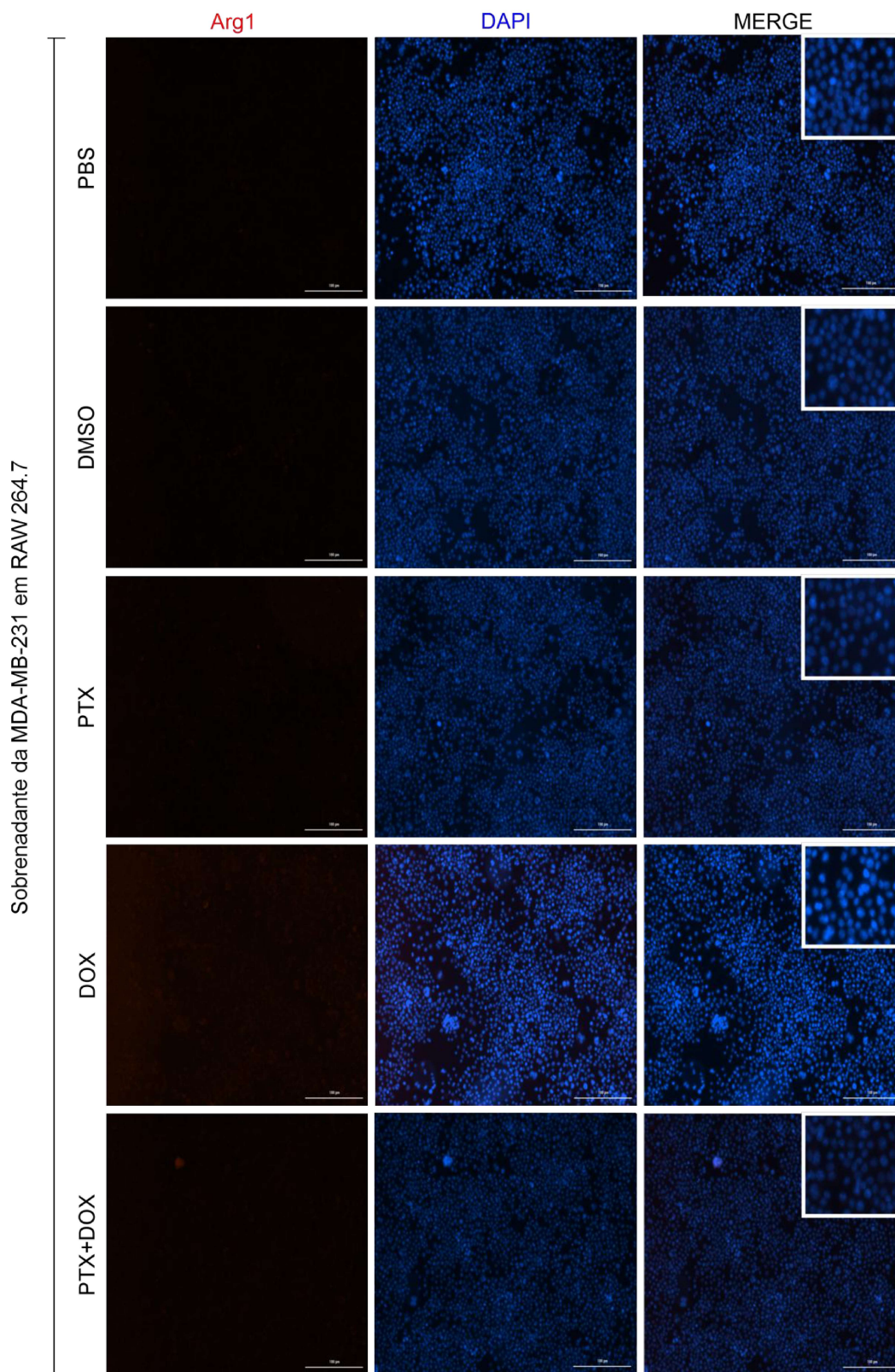
Fonte: Dados da pesquisa (2025). Não foi observada a expressão de Arginase-1 em nenhum dos grupos experimentais. Legenda: VERMELHO:Arginase-1; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10µm.

**Figura 38A** - Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (continua).



Fonte: Dados da pesquisa (2025). Não foi observada a expressão de Arginase-1 em nenhum dos grupos experimentais. Legenda: VERMELHO: Arginase-1; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10 $\mu$ m.

**Figura 38B** - Expressão de Arginase-1 por Imunofluorescência Indireta em RAW 264.7 estimulada com o sobrenadante da MDA-MB-231 (final).

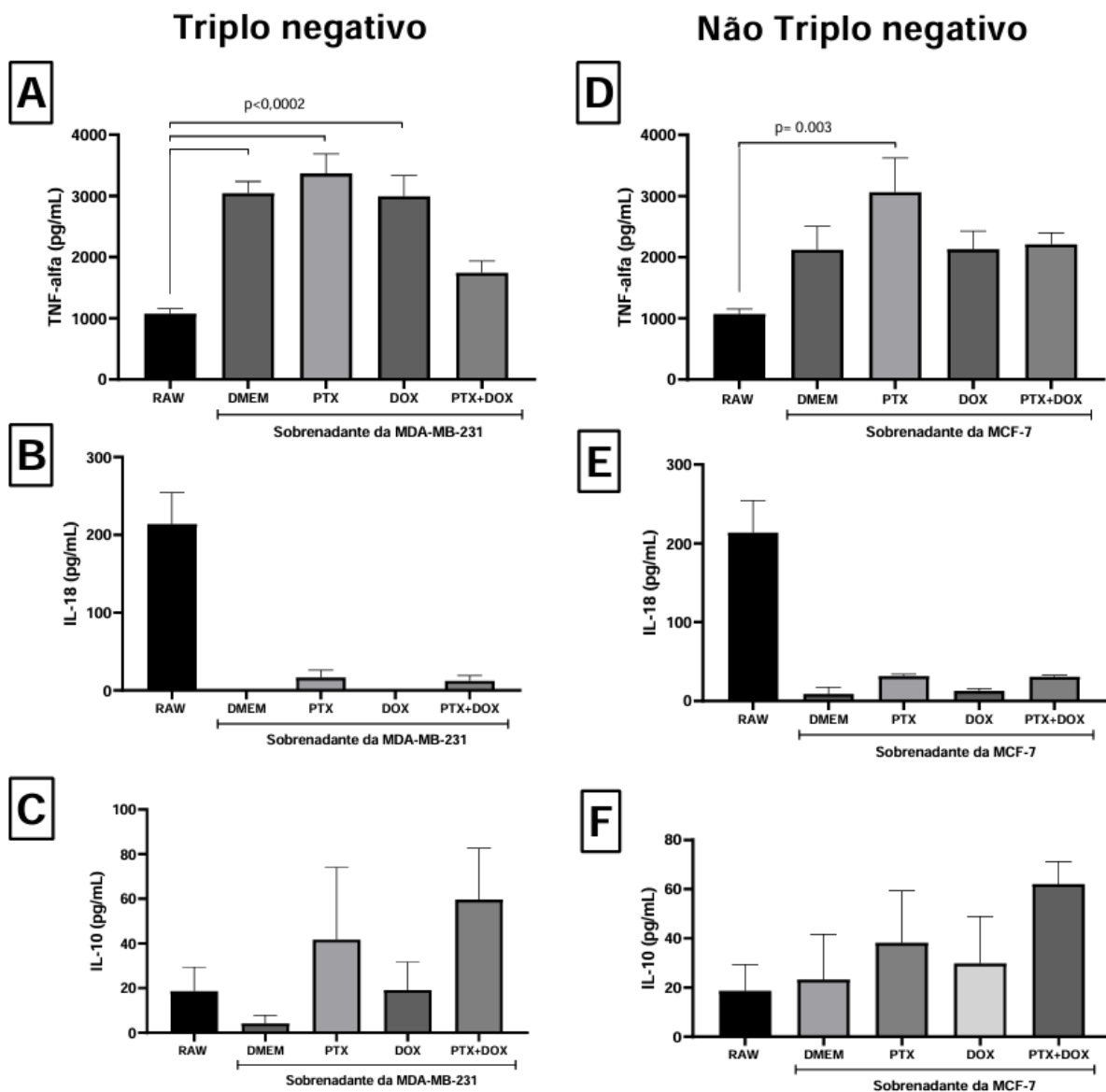


Fonte: Dados da pesquisa (2025). Não foi observada a expressão de Arginase-1 em nenhum dos grupos experimentais. Legenda: VERMELHO:Arginase-1; azul: DAPI (marcador nuclear). Aumento: 200 x. Escala: 10µm.

#### ***4.2.6 Dosagem de citocinas para avaliação do perfil de polarização de macrófagos (M1 ou M2) e IL-33 em macrófagos (RAW 264.7) e linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231)***

Após 24h da transferência do sobrenadante provenientes da linha triplo negativo (MDA-MB-231) e não triplo negativo (MCF-7) para o macrófago. O sobrenadante foi coletado para dosagem das citocinas (TNF-alfa, IL-18 e IL-10) pelo método ELISA. Os resultados apresentados na **Figura 39** abaixo evidenciaram que o PTX favoreceu um aumento na concentração de TNF-alfa em relação ao controle RAW 264.7. Dessa forma, é notório que o sobrenadante advindo da célula tumoral incubadas com ou sem quimioterápico, estimulou a RAW 264.7. Quanto a IL-18, é possível notar que as células RAW 264.7 conseguiram produzir essa citocina. Contudo, ao entrarem em contato com o sobrenadante condicionado, foi observada uma queda brusca em sua produção. Apesar disso, o meio condicionado com quimioterápicos PTX e/ou DOX conseguiu aumentar suavemente essa produção. No entanto, tais dados não foram significantes estatisticamente ( $p>0,05$ ). Por conseguinte, também não foram observados resultados significantes para a citocina anti-inflamatória (IL-10).

**Figura 39** – Dosagem de citocinas (TNF-alfa, IL-18 e IL-10) da RAW 264.7 com o meio condicionado das linhagens tumorais triplo negativo e não triplo negativo.



Fonte: Dados da pesquisa (2025). Legenda: Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média da quantidade de cada citocina em pg/ml. **a)** Em relação aos macrófagos incubados com o sobrenadante da linhagem triplo negativo (MDA-MB-231), observou-se um aumento na concentração de TNF-alfa nos grupos DMEM, PTX e DOX *versus* RAW 264.7 basal. **d)** Quando incubados com o sobrenadante da linhagem não triplo negativo (MCF-7) foi observado aumento de TNF-alfa apenas no grupo PTX *versus* RAW basal. Não foram encontrados resultados significativos para outras citocinas (IL-18 e IL-10). RAW: linhagem de macrófago utilizada RAW 264.7; DMEM: meio de cultivo celular - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; PTX: paclitaxel; DOX: doxorubicina.

#### **4.2.7 Expressão gênica por RT-PCR do perfil de polarização de macrófagos (M1) em macrófagos (RAW 264.7) após incubar com os sobrenadantes das linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231)**

Para o perfil de polarização M1 foi realizada a análise de qPCR para a expressão gênica de *inos*, *Tnf-alfa*, *Il-18* e *Tgf-beta*. Conforme observado na **Figura 40**, houve um aumento na expressão gênica de *iNOS* no grupo com PTX quando comparado ao grupo controle, independente da linhagem tumoral que esteve em contato com a RAW 264.7 ( $p>0,05$ ). Entretanto, ao incubar a RAW 264.7 com o meio condicionado da linhagem tumoral triplo negativo com quimioterápico DOX observou-se um aumento significativo ( $p>0,05$ ) da expressão de *iNOS* em relação ao grupo controle (apenas RAW 264.7).

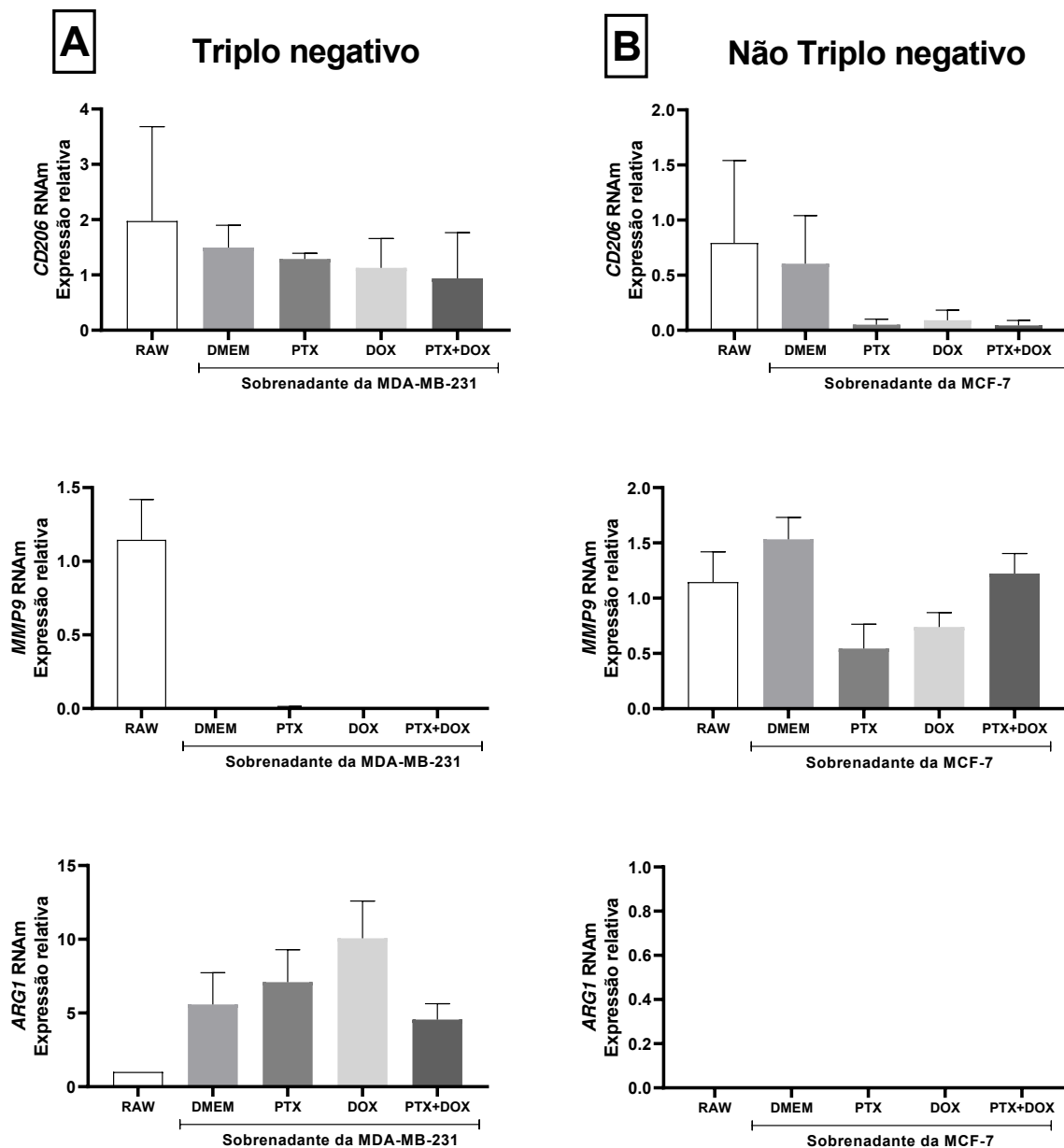
Com relação ao *Tnf-alfa*, observou-se que um aumento significativo nos grupos DMEM, PTX e DOX da linhagem tumoral MDA-MB-231 (triplo negativo) em relação ao grupo controle, nas células RAW 264.7. Por conseguinte, também foi evidenciado um aumento na expressão de *IL-18* no grupo PTX+DOX vs DMEM. Além disso, também foi avaliado o *Tgf-beta*, contudo apesar de ter sido observada uma expressão nos grupos experimentais, não houve significância estatística.



#### **4.2.8 Expressão gênica por RT-PCR do perfil de polarização de macrófagos (M2) em macrófagos (RAW 264.7) após incubar com os sobrenadantes das linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231)**

Para o perfil de polarização M2 foi realizada a análise de qPCR para a expressão gênica de *cd206*, *mmp9* e *arg1*. Conforme observado na **Figura 41**, observou-se que ocorreu a expressão gênica de *cd206* e *mmp9*, mas não *arg1*, na RAW 264.7 incubada com o sobrenadante da linhagem não triplo negativo (MCF-7). Por conseguinte, foi constatado a expressão de CD206, MMP9 e ARG1 na RAW 264.7 incubada com o sobrenadante da linhagem triplo negativo (MDA-MB-231). Apesar disso, nenhum dos dados foram considerados estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

**Figura 41** – Expressão gênica de *cd206*, *mmp9* e *arg1* nas células RAW 264,7 incubadas com o sobrenadante da célula tumoral triplo negativo ou não triplo negativo.



Legenda: Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. da quantidade de cada citocina em pg/ml. As células MDA-M-231 (triplo negativo) e MCF-7 (não triplo negativo) foram incubadas com PTX, DOX e PTX+DOX por 24h. Decorrido esse tempo, o sobrenadante foi transferido para a RAW 264.7 (macrófago). Após 24h, as células foram coletadas para iniciar a extração do RNA e para futuramente prosseguir para qPCR. Não foram encontrados resultados significativos para a expressão gênica de *cd206*, *mmp9* e *arg1*. RAW: linhagem de macrófago utilizada RAW 264.7; DMEM: meio de cultivo celular - Dulbecco's Modified Eagle Medium; PTX: paclitaxel; DOX: doxorubicina.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho evidenciou-se a associação significativa da IL-33 com os parâmetros clínico-patológicos (quimioterapia neoadjuvante, índice de proliferação Ki-67 e recidiva). Neste aspecto, foi encontrada uma alta expressão de IL-33 em 61,06% nas pacientes CMTN sem recidiva tumoral. Além disso, as linhagens de células de mama triplo negativo e luminais apresentaram aumento da expressão da IL-33 e do receptor ST2 após a incubação da doxorubicina sozinha e a combinação com paclitaxel.

O Câncer de mama triplo negativo é o subtipo que apresenta maior taxa de proliferação celular mensurado pelo marcador de índice de proliferação celular Ki-67 (Borges, 2017). No estudo de Borges (2017) em que foi avaliado a expressão de Ki-67 nos subtipos de câncer de mama luminal e triplo negativo, evidenciou-se uma porcentagem média de núcleos corados com anti-Ki67 maior em pacientes de triplo negativo em relação ao luminal A pela técnica de imuno-histoquímica (Borges, 2017). No presente trabalho, pôde-se perceber que 84,93% dos pacientes estavam com um índice de proliferação Ki-67 >20% e somente 13,70% dos pacientes com Ki-67 <20%, sugerindo esse perfil aumentado de proliferação celular nos pacientes analisados.

Adicionalmente, nesse estudo observou-se que a maioria tinha idade igual ou superior a 50 anos, representando 63,01% (n=46). Contudo, na literatura, apresentam uma maior frequência em mulheres mais jovens, ou seja, com idade inferior a 50 anos (Rossoni et al., 2020). Quanto a raça, 60,27% da amostra foi composta por autodeclarados pardos. Esses achados vão ao encontro da literatura, uma vez que, é mais prevalente em mulheres afrodescendentes. Atualmente, o Instituto do Câncer (INCA) investiga a relação do CA mama mais agressivo em mulheres brasileiras negras e suas alterações no perfil molecular como mutação no BRCA. (INCA, 2024). Em relação ao histórico familiar, 41,10% (n=30) das pacientes apresentaram histórico de câncer na família em parentescos próximos, como tia, irmã e sobrinha.

Quanto ao grau histológico, foi observado que 65,75% (n=32,88%) dos pacientes eram do grau III. Tal achado é frequente nos casos de CMTN, pois apresenta características histológicas desfavoráveis, como, por exemplo, pobre diferenciação celular e grau histológico aumentado (Inocêncio *et al.*, 2024). Em relação ao estadiamento no diagnóstico, a grande maioria dos pacientes estavam com o estágio II (45,21%; n=33) ou III (35,62%; n=26). Tal achado é o mesmo encontrado na literatura, uma vez que apenas cerca de 20% dos casos de CMTN são diagnosticados no estágio inicial, e a grande maioria são identificados mais

tardamente (Silva, 2021).

A IL-33 é uma citocina pleiotrópica que exerce funções pró-tumorigênicas e anti-tumorigênicas a depender do câncer. Segundo Gao e colaboradores (2015), a IL-33 é uma citocina promissora para terapia adjuvante que busca potencializar a taxa de resposta à imunoterapia contra o câncer, uma vez que, a modulação do sistema imunológico pode tornar o tumor mais imunogênico e ajudar no tratamento (Gao *et al.*, 2015). Baseado nisso, surgiu a seguinte hipótese: Será que a IL-33 pode exercer um efeito anti-tumoral por meio da modulação do microambiente tumoral contribuindo para a polarização de macrófagos M1 no contexto do câncer de mama triplo negativo? Para responder essa pergunta foi realizado o estudo *in vitro* com linhagens tumorais triplo negativo (MDA-MB-231) e não triplo negativo (MCF-7) e seu impacto na polarização de macrófagos (RAW 264.7)

O câncer de mama triplo negativo, da sigla CMTN, é um dos subtipos moleculares altamente agressivo, e representa 15% do total de casos de câncer de mama, caracterizado por sua heterogeneidade e por apresentar terapias limitadas (Yin *et al.*, 2020). Considerando o eixo IL-33/ST2 como tendo um papel complexo no microambiente tumoral foi investigado a sua influência no contexto do CMTN. Nesse contexto, os nossos resultados da expressão de IL-33 e ST2 por imunofluorescência apresentaram um padrão variável entre as amostras, para a IL-33 observamos um range de 0,94% a 169,4% de expressão. Por sua vez, para o receptor ST2 foi mostrado um intervalo de 0,33 a 117,4% de variação de expressão. Além da imunofluorescência, foi investigado por imuno-histoquímica a expressão e a localização das referidas proteínas. Assim, na avaliação da expressão de IL-33 e ST2 nas células tumorais por imunohistoquímica foi evidenciado a imunomarcagem nuclear, citoplasmática e membranar variando em intensidade de escores. Diferentemente dos controles positivos (linfonodos) que apresentaram apenas a imunomarcagem citoplasmática.

O aumento da IL-33 em pacientes com câncer de mama durante a quimioterapia neoadjuvante na população brasileira já foi estudado pelo grupo de pesquisa liderado por Souto e colaboradores da Universidade Federal de Pernambuco. A pesquisa foi um estudo de coorte com 68 pacientes brasileiras com câncer de mama e comparou com voluntários não câncer. Os primeiros resultados evidenciam que a expressão gênica do RNAm da *Il-33* foi maior nos pacientes com câncer de mama antes da quimioterapia versus o grupo não câncer (Albuquerque *et al.*, 2023). Adicionalmente, ao analisar pelo subtipo de câncer de mama observa-se que o subtipo molecular triplo negativo apresenta um aumento da expressão gênica da IL-33 na mama desses pacientes versus o controle e subtipo molecular luminal. Porém, não teve aumento da expressão da IL33 no subtipo de HER2+ (Albuquerque *et al.*, 2023). Traçando um paralelo com

os nossos resultados, podemos reforçar a hipótese da liberação no microambiente tumoral de IL-33 na mama das pacientes e não necessariamente a nível sistêmico plasmático. No meio extracelular, a IL-33 atua como alarmina na imunidade inata. Contudo, não podemos esquecer que é uma citocina nuclear auxiliando a ativação da inflamação por outros mecanismos, como ativação de NFκB e MAPK (Milovanovic *et al.*, 2012).

No estudo de Yang e colaboradores (2015) foi observada uma maior concentração plasmática de IL-33 e ST2 solúvel nas pacientes com câncer de mama antes do tratamento a base de quimioterapia antineoplásica, em comparação ao grupo ao controle (voluntários sem câncer). Contudo, os próprios autores admitiram uma limitação do estudo quanto à avaliação das variáveis clínicas-patológicas, incluindo o subtipo molecular do câncer de mama. Em vista disso, a dosagem da citocina IL-33 nos pacientes com câncer de mama triplo negativo e luminais antes e após a quimioterapia neoadjuvante foi realizada neste estudo por meio da técnica de Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Os nossos resultados mostram que não houve reação colorimétrica, e, por isso, não foi possível quantificá-la a nível sistêmico no plasma. Tal resultado foi o mesmo encontrado por outro trabalho do LAFICA, no qual Choquenaira-Quispe (2023) também não conseguiu mensurar níveis plasmáticos da IL-33 nessas mesmas pacientes. Portanto, tais achados sugerem uma baixa concentração dessa alarmina no plasma, tanto em CMTN quanto nos Luminais antes ou após o protocolo AC-T (Ciclofosfamida, doxorrubicina e taxol).

A sinalização parácrina da IL-33 é resultado do estresse celular durante a necrose (Kakkar *et al.*, 2012), o que acontece durante a quimioterapia, esses achados podem ser explicados pela sua localização nuclear e não pela função de alarmina no meio extracelular. Por esta razão, Travers *et al.* (2018) investigaram sobre o significado funcional da localização nuclear e da sua ligação a cromatina em células epiteliais, uma vez que, outras alarminas com papel dual como é o caso da HMGB1, que possui a capacidade de atuar em fatores de transcrição por se ligar à DNA. A IL-33 nuclear participa da compactação da cromatina resultando na redução da liberação de IL-33 durante os processos de necrose (Travers *et al.* 2018)

Diferentemente de outras citocinas, a IL-33 possui extensas modificações pós-traducionais, tornando-a capaz de ativar células que possuem o seu receptor. Na apoptose, a IL-33 é clivada pelas caspases 3 e 7, resultando em formas incapazes de ativar o receptor ST2 (Travers *et al.*, 2018). A IL-33 é uma citocina amplamente expressa em células endoteliais e que difere da IL-1 e IL-18 (todas da família da IL-1) devido a que a clivagem via caspase leva a ativação dessas duas últimas citocinas. Portanto, tais estudos podem explicar nossos achados,

uma vez que, as linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) presentes neste trabalho são epiteliais e foram incubadas com quimioterápicos indutores de morte celular (doxorubicina e paclitaxel) Por isso, ao analisar qualitativamente as imagens obtidas por fluorescência é possível observar que ao incubar o PTX a MDA-MB-231 observa-se uma redução de 23% na fluorescência de IL-33, evidenciando o efeito desse quimioterápico no aumento da necrose celular. Entretanto, tais dados não deram significantes. Contudo, ao analisar a linhagem MCF-7 (não triplo negativo) foi notória a redução da área fluorescente de PTX em comparação com os grupos DOX ou PTX+DOX, sugerindo o processo de necrose celular pelo PTX, resultando na liberação da IL-33 nuclear e tornando-a incapaz de ativar o seu receptor ST2 celular, uma vez que pode ter sido clivada pelas caspases 3 e 7.

A doxorubicina (DOX) é uma antraciclina comumente utilizada para tratar neoplasias, e por isso o seu uso é frequentemente abordado nos esquemas terapêuticos. Contudo, seu uso clínico requer bastante cuidado, em decorrência da sua cardiotoxicidade, e subsequente insuficiência cardíaca (Yao *et al.*, 2017). Nesse contexto, em um estudo *in vitro* envolvendo cardiomiócitos, foi avaliado o papel cardioprotetor da IL-33, Yao e colaboradores (2017) evidenciaram que a IL-33 exógena atenua a apoptose de miócitos induzida por DOX. Nesse aspecto, nossos achados corroboraram com esse estudo, uma vez que as linhagens tumorais incubadas com DOX obtiveram uma maior expressão da IL-33, quando comparada ao grupo PTX ou até mesmo PTX+DOX.

Diante disso, foi hipotetizado que existiria a participação de células imunológicas do estroma na produção da IL-33 no microambiente tumoral diferente do cenário sistêmico. Por essa razão, iniciou-se a experimentação *in vitro* nos macrófagos.

Dentre as células imunológicas da imunidade inata, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) exercem um papel importante no microambiente tumoral, sendo classificados nos fenótipos M1 (pró-inflamatório e anti-tumoral) ou M2 (anti-inflamatória e pró-tumorigênica), dependendo do contexto um desses fenótipos predomina. Assim, a plasticidade dos macrófagos está diretamente relacionada com os estímulos inerentes do sistema imunológico. Em modelos experimentais *in vitro*, o estímulo de citocinas do fenótipo Th1, como IFN- $\gamma$ , TNF, ou o lipopolissacarídeos (LPS) resulta no perfil M1. A população de macrófagos M1 quando ativados secretam citocinas pró-inflamatórias (como, por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6) e quimiocinas, as quais promovem o recrutamento de NK, além de intensificar e ativar linfócitos Th1. Ademais, o perfil M1 produz óxido nítrico sintase (iNOS), que participa do metabolismo da arginina, convertendo-a em óxido nítrico e citrulina. Portanto, esse fenótipo está associado aos processos inflamatórios induzidos pelo perfil Th1 (Yunna *et*

*al.*, 2020).

Por outro lado, o perfil M2 é ativado pelas citocinas do perfil Th2, tais como, IL-4 e IL-13, e por quimiocinas (CCL17, CCL22, CCL24 e CCL1). Esse fenótipo é caracterizado pela expressão de CD206, produção de citocinas (IL-10 e TGF- $\beta$ ) e arginase-1 (Arg1) (Yunna *et al.*, 2020).

Para investigar a origem da IL-33 no microambiente tumoral desses pacientes hipotetizou-se que os macrófagos estariam atuando como um dos protagonistas na produção dessa interleucina. Ao realizar a imunofluorescência nas células tumorais das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 para o eixo IL-33/ST2, foi evidenciado uma expressão parácrina de IL-33, bem como do seu receptor ST2, independentemente da incubação com a quimioterapia. Foi notório um aumento da expressão de IL-33 no grupo incubado com doxorrubicina, assim como em sua combinação com paclitaxel, em ambas as linhagens, em relação ao grupo apenas com paclitaxel de forma significativa. Nossos achados foram também evidenciados por Choquenaira-Quispe (2023) onde demonstrou o aumento da IL-33 após a inoculação com doxorrubicina isoladamente.

Os resultados obtidos da qPCR mostraram que os macrófagos (RAW 264.7) estimulados com o sobrenadante da linhagem triplo-negativo (MDA-MB-231) teve aumento na expressão de *iNOS* nos grupos DMEM, PTX, DOX e PTX+DOX em relação a célula no estado basal (M0). Já a linhagem não-triplo (MCF-7) incubada com PTX ( $p < 0,05$ ) conseguiu estimular o aumento da expressão de *iNOS* na RAW 264.7. Sabe-se que a doxorrubicina é uma forte indutora de iNOS, uma vez que, favorece a degradação do complexo inibitório I $\kappa$ B $\alpha$  facilitando a translocação do fator NF- $\kappa$ B para o núcleo e por fim, ativando a transcrição do gene *iNOS* (Boo *et al.*, 2009). Dessa forma, tem-se sugerido que uma parte do efeito citotóxico da doxorrubicina seria o aumento da síntese de NO e TNF-alfa. O óxido nítrico desempenha um importante papel no crescimento, diferenciação e apoptose celular.

Nesse sentido, é válido mencionar a participação do paclitaxel, uma vez que, o PTX pode induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF-alfa, das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) em monócitos (Wanderley *et al.*, 2018). Dessa forma, no presente estudo, foi observado o aumento da expressão de *TNF-alfa* significativa em macrófagos previamente incubados com PTX e DOX em comparação ao grupo basal (M0), principalmente, com a DOX.

Nessa perspectiva, vale ressaltar a quimiorresistência provocada pelos fármacos citotóxicos é um dos principais obstáculos. Em um estudo feito por Zhang e colaboradores, foi relacionado a gravidade da doença e a resistência à DOX. Ao realizar o *knockdown* da expressão

de TNF alfa transmembranar (tmTNF-alfa) na linhagem tumoral MDA-MB-231 (triplo negativo) observou-se um aumento na sensibilidade dessas células à DOX. Esse mesmo autor investigou a participação do TNF-alfa transmembranar na patogênese do câncer de mama. Nesse sentido, os autores identificaram a expressão de tmTNF-alfa em 84% de 25 casos de CMTN, sugerindo que o TNF-alfa seja um possível biomarcador e alvo no tratamento desses pacientes (Zhang *et al.*, 2018). Tais achados corroboram com os nossos dados obtidos tanto na expressão gênica por qPCR, como a dosagem de proteína por imunoenensaio para o TNF-alfa, uma vez que, foi observada o aumento da expressão de TNF-alfa na RAW 264.7 (linhagem macrófagos) que teve contato com o sobrenadante da MDA-MB-231, previamente incubada com DOX, evidenciando que o fatores solúveis liberados pela célula tumoral combinados com o quimioterápico estimularam o macrófago a aumentar essa expressão.

A dosagem de nitrito mostra a produção indireta de óxido nítrico pelas linhagens tumorais e também pelos macrófagos após serem incubadas com diversos estímulos. Nossos resultados mostraram um aumento da produção de NO após a incubação com LPS e o sobrenadante da linhagem triplo negativo nos macrófagos. Tais achados estão alinhados com os resultados encontrados na Imunofluorescência Indireta (IFI), uma vez que todos os sobrenadantes da MDA-MB-231, na ausência e presença da quimioterapia, foram capazes de induzir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, indicando a polarização dos macrófagos para o perfil M1. Nesse contexto, a IFI corroborou com tais achados, uma vez que foi observada a ativação dos macrófagos para o perfil M1, indicada através da expressão de iNOS. Cabe ressaltar, que foram realizados os ensaios com os devidos controles experimentais. No controle negativo não foi observado a produção de iNOS e Arginase-1, enquanto no controle positivo foi evidente apenas a produção de iNOS pela RAW 264.7.

O macrófago possui uma plasticidade celular e consegue apresentar diversos fenótipos, nesse sentido, investigou-se a possível participação do macrófago M2. Os nossos resultados demonstraram uma diminuição da expressão de arginase-1, CD-206 e metaloproteinase (MMP)-9, marcadores desse perfil M2. Dessa forma, nossos achados verificam o perfil do macrófago M1 no contexto analisado.

Outras células do microambiente tumoral, como os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) foi bem descrita no cenário do subtipo triplo negativo tornando-se hoje mandatório quantificar os TILs no laudo anatomopatológico. Dessa forma, o papel do linfócito é orquestrador da modulação do microambiente tumoral, muito provavelmente, até maior quando comparado com os macrófagos infiltrantes de tumor. Li e colaboradores (2016) avaliaram os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) em pacientes com câncer de mama que foram submetidos

a quimioterapia neoadjuvante (QTneo). Destes, foi observado um aumento de TILs nos pacientes que tiveram uma melhor resposta QTneo e uma melhor sobrevida em pacientes com CMTN. Por outro lado, a presença de TILs e CD8<sup>+</sup> no contexto do CMTN, principalmente em tumores metastáticos, é inferior quando comparados a estágios iniciais (Li *et al.*, 2016).

Em outro estudo, houve um aumento da IL-33 e TGFβ no estroma do paciente com CMTN versus o luminal. Além disso, a quantificação da IL-33 high foi associada a uma resposta patologia completa (RCp) maior no triplo negativo e menor nos luminais. Nesse mesmo estudo, investigaram o papel do linfócito T regulador por meio da quantificação do fator de transcrição mestre FOXP3<sup>+</sup>. Os resultados mostraram que o grupo IL-33 high/ TGFβ high apresentou um prognóstico favorável significativo que o grupo de pacientes com CMTN com FOXP3 high (Goda *et al.*, 2022). De certa forma, esse achado está alinhado com os nossos resultados. Visto que, o aumento da IL-33 apresenta melhor resposta a quimioterapia e menor recidiva. Por outro lado, analisamos a expressão gênica do *Tgfb* na linhagem de macrófagos incubadas com o sobrenadante das células tumorais e observamos que não houve diferença significativa. Como perspectiva futura, valeria dosar no plasma de pacientes e no sobrenadante das células o TGFβ.

No estudo de Gao *et al.* (2015) foi evidenciado o papel da IL-33 na resposta imunológica anti-tumoral. Para investigar esse papel, umas das estratégias experimentais utilizadas pelo grupo de pesquisa foi o transplante de células tumorais da linhagem 4T1 na gordura mamária de camundongos BALB/c, cujo resultado encontrado foi o potente efeito anti-tumoral da IL-33 quando expressa em células tumorais e a promoção do microambiente imunogênico tumoral por linfócitos do tipo Th1. Isso ocorreu em decorrência da produção de moléculas efetoras do tipo 1, como IFN-γ e granzimas, por células CD8<sup>+</sup> e NK infiltrantes do tumor. Os autores ainda enfatizaram a aplicação clínica dessa interleucina como adjuvante para imunoterapia contra o câncer (Gao *et al.*, 2015). Além do mais, existem outros trabalhos publicados pelo mesmo grupo de pesquisa, em que mostraram a relação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e Th1 na produção de maiores níveis de IFN-γ em resposta à IL-33. Nesse contexto, sabe-se que o Interferon-γ é a principal citocina produzida pela resposta Th1, a qual resulta na ativação de macrófagos e NK (Gao *et al.*, 2015).

O câncer de mama triplo negativo por apresentar alta agressividade se torna mais desfavorável seu prognóstico quando associada a mutação do gene de reparo BRCA. Mehta e colaboradores demonstraram que pacientes com CMTN e mutação de BRCA1 tem maior infiltração de linfócitos e macrófagos associados ao tumor quando comparados com pacientes sem a mutação (BRCA-1 wild type). Os autores usaram marcadores de Células T reguladoras, como FOXP3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> e macrófagos como CD68<sup>+</sup> e CD163<sup>+</sup>. Os autores acima mencionados,

realizaram uma abordagem experimental utilizando modelo murino de tumor de mama e a modulação farmacológica com inibidor de PARP, conhecido como Olaparibe. Os resultados apresentaram um aumento de F4/80+CD45+ e co-estimuladores como CD80 após o tratamento com olaparibe nos camundongos, indicando o potencial indutor do fenótipo anti-tumoral pelos macrófagos e co-estimuladores (Mehta *et al.*, 2021).

Sabe-se que a liberação de IL-33 está associada ao estresse oxidativo e necrose tecidual. Portanto, considerando que a inflamação exerce um importante papel na imunidade, tem-se intensificado estudos relacionados às respostas inflamatórias associadas ao tumor, microambiente tumoral e tumorigênese. Nesse contexto, tem-se observado que atividade pleiotrópica da IL-33 depende do tipo de câncer. Por essa razão, nos últimos anos, tem-se estudado o eixo IL-33/ST2 no diagnóstico, prognóstico ou metástase no contexto de cânceres (Yang *et al.*, 2015).

A presença desta citocina no microambiente tumoral CMTN pode regular negativamente a biologia do tumor. Estudos para verificar a presença dos macrófagos nos pacientes é algo a se investigar no futuro próximo. Assim, entendemos que o papel da IL-33 e sua associação com o macrófago M1 pode ser tornar um biomarcador de preditor da resposta ou de prognóstico.

## **6 CONCLUSÃO**

A alta expressão de IL-33 está significativamente associada a uma melhor resposta a quimioterapia e menor recorrência do tumor em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

A ativação das células tumorais pela quimioterapia induziu uma polarização de fenótipo de macrófagos M1, considerado anti-tumoral.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R.B. *et al.* Interleucina-33 expressão no tratamento resultados e prognóstico no brasil mama câncer pacientes em fase de internação neoadjuvante Quimioterapia. **Rev. Internacional de Ciências Moleculares**, v. 14, p. 1-12, 2023.
- ARAS, S.; ZAIDI, M. R.. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 117, n. 11, p. 1583-1591, 24 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.356>.
- BARROS, D. P. *et al.* Câncer de mama e fatores de risco modificáveis no Brasil: uma revisão de literatura. In: GALÃO, A. O.; CAPP, E. **Promoção e Proteção da Saúde da Mulher 2023/2**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2024. p. 111-124. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/274422/001199723.pdf?sequence=1>. Acesso em: 10 set. 2024.
- BENSE, R. D. *et al.* Relevance of tumor-infiltrating immune cell composition and functionality for disease outcome in breast cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v. 109, n. 1, p. 1-9, 2017.
- BOO, S *et al.* INOS activity is necessary for the cytotoxic and immunogenic effects of doxorubicin in human colon cancer cells. **Molecular Cancer**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-18, 19 nov. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-8-108>.
- BORGES, U. S. **Estudo da expressão do antígeno ki-67 nos subtipos de câncer de mama luminal a e triplo negativo**. Orientador: Pedro Vitor Lopes Costa. 2017. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.
- BOUTILIER, A.J.; ELSAWA, S.F. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 13, p. 6995, 29 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22136995>.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Câncer de Mama**. Brasília, 2024. Disponível em: [https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2024/RRPCDTCncerdeMama\\_CP.pdf](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2024/RRPCDTCncerdeMama_CP.pdf). Acesso em: 20 set. 2024.
- BRITO, B. T. *et al.* Análise geral do diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer de mama no Brasil: Uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 5, p. 1-11, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/45748>. Acesso em: 10 maio de 2024.
- CHOQUENAIRA-QUISPE, C. **A doxorubicina e o paclitaxel, usados na quimioterapia neoadjuvante para câncer de mama, ativam receptores Toll-like e proteínas de sua sinalização, PI3K e AKT**. Orientador: Roberto César Pereira Lima Junior. 2024. 130 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

CIRQUEIRA, M. B. *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, n. 10, 2011. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/upload/S/0100-7254/2011/v39n10/a2965.pdf>. Acesso em: 5 out. 2024.

DIAS, M. B. K. *et al.* Adequação da oferta de procedimentos para a detecção precoce do câncer de mama no Sistema Único de Saúde: um estudo transversal, Brasil e regiões, 2019. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 40, n. 5, 2024. Disponível em: <https://www.scielosp.org/article/csp/2024.v40n5/e00139723/pt/>. Acesso em: 10 out. 2024.

FANG, M. *et al.* IL33 Promotes Colon Cancer Cell Stemness via JNK Activation and Macrophage Recruitment. **Cancer Research**, [S.L.], v. 77, n. 10, p. 2735-2745, 14 maio 2017. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-1602>.

FERLAY, J. *et al.* Global Cancer Observatory: **Cancer Today**. International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>. Acesso em: 12 ago. 2024.

FEBRONIO, E. M. **Análise farmacocinética pela Ressonância magnética (RM) para detecção de hipóxia tumoral em neoplasia de próstata**. Orientador: Valdair Francisco Muglia. 2023. 73 p. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

FRANÇA, A. C. H.; LACERDA, C. S. S.; LACERDA, W. S. Amamentação, níveis de citocinas e imunofenotipagem de células T reg no câncer de mama. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 16, n. 2, 2024. Disponível em: <http://revista.sear.com.br/rei/article/view/409/497>. Acesso em: 15 out. 2024.

FRAGOMENI, S. M.; SCIALIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29132568/>. Acesso em: 01 out. 2024.

FREITAS, I. L. *et al.* avanços em marcadores tumorais no diagnóstico e tratamento do câncer de mama. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 5, p. 2278–2295, 2024. Disponível em: <https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/2242>. Acesso em: 28 out. 2024.

FREITAS, G. L. **Associação entre o perfil antropométrico, adipocitocinas e a resposta ao tratamento neoadjuvante de pacientes com diagnóstico primário de câncer de mama**. Orientador: Deysi Viviana Tenazoa Wong. 2024. 92 p. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

GAO, X. *et al.* Tumoral Expression of IL-33 Inhibits Tumor Growth and Modifies the Tumor Microenvironment through CD8+ T and NK Cells. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 1, p. 438–445, 2015. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/194/1/438/98237>. Acesso em: 01 jan. 2025.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **Cancer Today**. International Agency for Research on Cancer. Lyon: GCO, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>. Acesso em: 16 set. 2024.

GODA, N. *et al.* A proporção de linfócitos CD8 + para células T reguladoras efectoras supressoras FOXP3 + infiltrantes de tumor está associada à resposta ao tratamento no câncer de mama invasivo. **Discov Oncol**, v. 13, n 1. DOI: 10.1007/s12672-022-00482-5. PMID: 35438346; PMCID: PMC9018954.

GORBACHEVA, A. M.; KUPRASH, D. V.; MITKIN, N. A. Regulation of IL33 Gene Expression by SP1 and Foxa1 in Breast and Lung Cancer Cells. **Molecular Biology**, v. 55, n. 1, p. 92–101, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026893321010064#citeas>. Acesso em: 7 maio 2024.

HAGHBIN, M. *et al.* Comparison of Interleukin-33 Serum Levels in Patients with Breast Cancer and Idiopathic Granulomatous Mastitis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 24, n. 5, p. 1629–1634, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10495896/>. Acesso em: 5 fev. 2024.

INOCÊNCIO, S. *et al.* O USO DE PEMBROLIZUMABE NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 10, n. 11, p. 3667–3679, 2024. Disponível em: <https://periodicorease.pro.br/rease/article/view/16635/9340>. Acesso em: 30 dez. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de mama**. Rio de Janeiro: INCA, 2024a. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>>. Acesso em: 9 out. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **INCA investiga por que há mais casos de câncer de mama agressivo nas brasileiras negras**. Rio de Janeiro: INCA, 2024b. Disponível em <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2024/inca-investiga-por-que-ha-mais-casos-de-cancer-de-mama-agressivo-nas-brasileiras-negras>. Acesso em: 29 nov. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Dados e Números sobre Câncer de Mama - Relatório Anual 2023**. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-de-mama-relatorio-anual-2023>. Acesso em: 29 nov. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Relatório do intervalo entre diagnóstico e início do tratamento do câncer no SUS. Dados do Painel-Oncologia - Ano 2020**. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/relatorio-do-intervalo-entre-diagnostico-e-inicio-do-tratamento-do-cancer-no>>. Acesso em: 30 nov. 2024.

KAKKAR, R.; HEI, H.; DOBNER, S.; LEE, R. T. Interleukin 33 as a Mechanically Responsive Cytokine Secreted by Living Cells. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 287, n. 9, p. 6941-6948, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.298703>.

LARSEN, K. *et al.* The Role of IL-33/ST2 Pathway in Tumorigenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6164146/>. Acesso em: 29 jul. 2024.

LI, X. B. *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. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article/145/6/871/2836652?login=false>. Acesso em: 03 jan. 2025.

LIMA, J. B.; SILVA, I. C. R.; OLIVEIRA, J. R. Molecular subtypes of breast cancer: clinicopathological characteristics and prognosis: Subtipos moleculares de câncer de mama: características clínico-patológicas e prognóstico. **Concilium**, v. 24, n. 10, p. 581–598, 2024. Disponível em: <https://clium.org/index.php/edicoes/article/view/3881>. Acesso em: 2 nov. 2024.

MAHMOUD, R.; ORDÓÑEZ-MORÁN, P.; ALLEGRUCCI, C. Challenges for Triple Negative Breast Cancer Treatment: Defeating Heterogeneity and Cancer Stemness. **Cancers**, v. 14, n. 17, p. 4280, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/17/4280>. Acesso em: 29 nov. 2024.

MASON, S. *et al.* Platinum-based chemotherapy for early triple-negative breast cancer. **The Cochrane library**, v. 2023, n. 9, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37681577/>. Acesso em: 05 jan. 2025.

MILOVANOVIC, M. *et al.* IL-33/ST2 axis in inflammation and immunopathology. *Immunologic Research*, [S.L.], v. 52, n. 1-2, p. 89-99, 6 mar. 2012. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-012-8283-9>.

MEHTA, A.K. *et al.* Targeting immunosuppressive macrophages overcomes PARP inhibitor resistance in BRCA1-associated triple-negative breast cancer. **Nature Cancer**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 66-82, 14 dez. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s43018-020-00148-7>.

MYMAB BIOLOGICS. **Tissue Microarray – An Innovative Diagnostic and Research Tool**. Serdang: MYmAb Biologics, 2024. Disponível em: <https://www.linkedin.com/pulse/tissue-microarray-innovative-diagnostic-research-tool-mymab-biologics-o7txc>. Acesso em: 29 set. 2024.

NAN, Y. *et al.* Targeting IL-33 reprograms the tumor microenvironment and potentiates antitumor response to anti-PD-L1 immunotherapy. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 12, n. 9, 2024. Disponível em: <https://jitc.bmj.com/content/12/9/e009236>. Acesso em: 29 dez. 2024.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 49-61, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>.

OLIVEIRA, B. R. **Lunatina-1: desvendando o seu mecanismo citotóxico em células de câncer de mama triplo negativo**. Orientador: Thiago Verano-Braga. 2024. 112 p. Tese

(Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2024.

OLIVEIRA, K. L. C. M. C. *et al.* Câncer de mama. *In*: FERREIRA, I. M. O. *et al.* **Livro de Ginecologia**. Brasília: Pasteur, 2024. p. 51-55. Disponível em: <https://editorapasteur.com.br/publicacoes/?isbn=978-65-6029-118-8>. Acesso em: 1 dez. 2024.

OLIVEIRA, J. R. **Relação da expressão do trop2 com fatores clínico-patológicos, sobrevivência e resposta à quimioterapia em pacientes com câncer de mama triplo negativo**. Orientador: Roberto César Pereira Lima Junior. 2024. 52 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

PAN, Y.; YU, Y.; WANG, X.; ZHANG, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, n. 1, 3 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>.

PEDROSA, I. A. **Impacto da interleucina-33 como fator prognóstico no câncer gástrico**. Orientador: José Luiz de Lima Filho. 2017. 49 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35021093>. Acesso em: 29 set. 2024

PISANI, L. F. *et al.* Proinflammatory Interleukin-33 Induces Dichotomic Effects on Cell Proliferation in Normal Gastric Epithelium and Gastric Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/5792>. Acesso em: 22 nov. 2024.

RANK, M. A. *et al.* IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1047–1054, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19361843/>. Acesso em: 13 nov. 2024.

ROSSONI, E. S. S. *et al.* Perfil molecular do câncer de mama triplo negativo: Uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82283–82303, 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/18909/15205>. Acesso em: 25 dez. 2024.

SANTOS, L. S. *et al.* Uso de terapias adjuvantes em cirurgia oncológica no câncer de mama: análise abrangente de literatura. **Studies in Health Sciences**, v. 5, n. 3, 2024. Disponível em: <https://ojs.studiespublicacoes.com.br/ojs/index.php/shs/article/view/6316/4073>. Acesso em:

SCHADENDORF, D. *et al.* Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, 15003, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>

SCHMID, P. *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. **N Engl J Med.**, v. 379, n. 22, p. 2108-2121, 2018.

SILVA, J. L. **Câncer de mama triplo-negativo: avaliação de fatores clínicos e biomarcadores tumorais**. Orientador: Andréia Cristina de Melo. 2021. 198 p. Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, 2024.

SILVA, G. R. P. *et al.* Tendência da taxa de mortalidade por câncer de mama em mulheres com 20 anos ou mais no Brasil, 2005-2019. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 29, n. 3, 2024. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/5hjZvVH7ZgFrsXVsDsBQDxc/>. Acesso em: 21 nov. 2024.

SILVA, G. V. L. **A interleucina 33 (IL-33) expressa por células mesenquimais é importante para migração leucocitária durante degeneração walleriana do nervo isquiático**. Orientador: Thiago Mattar Cunha. 2021. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

SORLIE, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829800/>. Acesso em: 29 set. 2024

STOJANOVIC, B. *et al.* Decoding the IL-33/ST2 Axis: Its Impact on the Immune Landscape of Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/18/14026>. Acesso em: 20 out. 2024.

SUN, P. *et al.* Serum interleukin-33 levels in patients with gastric cancer. **Digestive diseases and sciences**, v. 56, n. 12, p. 3596–601, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-011-1760-5>. Acesso em: 15 out. 2024

VASCONCELOS, J. L. M. *et al.* Determinantes Clínicos e Moleculares da Resposta ao Tratamento Neoadjuvante em Câncer de Mama: Uma Revisão Sistemática. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1815–1822, 2024. Disponível em: <https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/1424>. Acesso em: 2 nov. 2024.

WANDERLEY, C. W. *et al.* Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Research*, [S.L.], v. 78, n. 20, p. 5891-5900, 15 out. 2018. **American Association for Cancer Research (AACR)**. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-17-3480>.

WANG, K. *et al.* IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 68571–68582, 2017. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/19786/text/>. Acesso em: 30 nov. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Global Breast Cancer Initiative**. Geneva: WHO, 2023a. Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/global-breast-cancer-initiative#:~:text=The%20World%20Health%20Organization's%20Global,would%20save%2002.5%20million%20lives>. Acesso em: 1 dez. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global breast cancer initiative implementation framework: assessing, strengthening and scaling up of services for the early detection**

**and management of breast cancer: executive summary.** Genebra: WHO, 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240067134>. Acesso em:

YAO, Y. *et al.* Interleukin-33 attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through suppression of ASK1/JNK signaling pathway. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 493, n. 3, p. 1288-1295, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.153>.

YANG, Z. P. *et al.* The Association of Serum IL-33 and sST2 with Breast Cancer. **Disease Markers**, v. 2015, p. 1–6, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2015/516895>. Acesso em: 9 dez. 2024.

YI, X. M.; LIAN, H.; LI, S. Signaling and functions of interleukin-33 in immune regulation and diseases. **Cell Insight**, v. 1, n. 4, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10120307/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

YIN, L. *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-020-01296-5>. Acesso em: 15 dez. 2025.

YUNNA, C.; MENGRU, H.; LEI, W.; WEIDONG, C. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 877, p. 173090, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.

XIAO, M. *et al.* Tumor-Associated Macrophages: critical players in drug resistance of breast cancer. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, 17 dez. 2021. **Frontiers Media SA**. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.799428>.

ZHAO, J. *et al.* Global trends in incidence, death, burden and risk factors of early-onset cancer from 1990 to 2019. **BMJ Oncology**, v. 2, n. 1, 2023. Disponível em: <https://bmjoncology.bmj.com/content/2/1/e000049>. Acesso em: 8 dez. 2025.

ZHANG, W. *et al.* Macrophage polarization in the tumor microenvironment: emerging roles and therapeutic potentials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 177, p. 116930, ago. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116930>.

ZHANG, Z. *et al.* Transmembrane TNF-alpha promotes chemoresistance in breast cancer cells. **Oncogene**, [S.L.], v. 37, n. 25, p. 3456-3470, 21 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0221-4>.

TAVARES, D. F. *et al.* O Estado da Arte da Imunoterapia no Tratamento do Câncer de Mama Triplo-Negativo: Principais Drogas, Associações, Mecanismos de Ação e Perspectivas Futuras. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 2, e-061014, 2021.

TRIVERS, J. *et al.* Chromatin regulates IL-33 release and extracellular cytokine activity. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-15, 14 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05485-x>.