

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

ADMA POLIANA DE BORBA CECILIO DA SILVA

IMPACTO DO EXCESSO DE PESO NOS DETERMINANTES CLINICOPATOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS DE CITOCINAS, ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICOS E MARCADORES TUMORAIS

Francisco Beltrão – PR

JANEIRO/2023

ADMA POLIANA DE BORBA CECILIO DA SILVA

**IMPACTO DO EXCESSO DE PESO NOS DETERMINANTES
CLINICOPATOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA E SUA
ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS DE CITOCINAS, ESTRESSE
OXIDATIVO SISTÊMICOS E MARCADORES TUMORAIS**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador (a): Dra. Carolina Panis

FRANCISCO BELTRÃO – PR

JANEIRO/2023

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

de Borba Cecilio da Silva, Adma Poliana
Impacto do excesso de peso nos determinantes
clínicopatológicos do câncer de mama e sua associação com os
níveis de citocinas, estresse oxidativo sistêmicos e
marcadores tumorais / Adma Poliana de Borba Cecilio da
Silva; orientadora Carolina Panis. -- Francisco Beltrão,
2023.

91 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Francisco
Beltrão) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Saúde, 2023.

1. Obesidade. 2. Câncer de mama. 3. Resposta Imune. I.
Panis, Carolina, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

IMPACTO DO EXCESSO DE PESO NOS DETERMINANTES CLINICOPATOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS DE CITOCINAS, ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICOS E MARCADORES TUMORAIS

ADMA POLIANA DE BORBA CECILIO DA SILVA

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo (a) Orientador (a) e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Profa. Dra. Carolina Panis
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Membro da banca: Profa. Dra. Franciele Ani Caovilla Follador
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Membro da banca: Profa. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

FRANCISCO BELTRÃO, PR

Janeiro/2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha gratidão por me permitir encerrar mais uma etapa da minha vida, pelas oportunidades incríveis que me concedeu desde o início da minha caminhada acadêmica e, por me dar sabedoria para reconhecer e aproveitar cada uma delas.

Agradeço, de maneira especial, ao meu esposo Aldrei Oliveira da Silva, pelos 14 anos de caminhada diária, por me apoiar em cada temporada, desde o cursinho até o presente momento com o mestrado e, por sonhar comigo em cada uma delas. Obrigada por ser meu maior incentivador e impulsionador, estar sob seus cuidados me traz a proteção necessária e o lugar seguro para que eu possa avançar em direção aos meus sonhos.

Também, desejo registrar minha gratidão a minha família, ao meu pai Josias Cecilio, minha mãe Ester de Borba Cecilio, meus irmãos Peterson e Pâmela Cecilio. Vocês sempre sonharam comigo, me incentivaram e souberam entender minhas ausências em cada estação da minha jornada acadêmica.

Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia de Tumores que foram primordiais na coleta e processamento de cada amostra aqui estudada. De modo especial, quero agradecer a minha amiga e irmã Jaqueline Jumes, por mais uma vez, percorrer esse trajeto até a finalização do mestrado comigo. Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha história acadêmica e me inspiraram a continuar buscando o conhecimento.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde pela organização e manutenção do programa em uma universidade pública, com poucos recursos, mas com a qualidade preservada apesar das adversidades. Ao Hospital do Câncer de Francisco Beltrão– CEONC, que foi minha segunda casa na graduação e proporcionou a presente pesquisa. A banca examinadora Professora Dra. Franciele Ani Caovilla Follador e Professora Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla, por aceitarem o convite feito e por contribuir tão generosamente com o presente trabalho.

Finalizo agradecendo a minha professora orientadora Dra. Carolina Panis, responsável por me fazer amar a pesquisa acadêmica, desde o segundo ano de faculdade e ser um exemplo profissional como professora e pesquisadora.

DEDICATÓRIA

A Deus, meu pai, amigo e mestre soberano.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- O EQUILÍBRIO DA RESPOSTA PRÓ-INFLAMATÓRIA E ANTI-INFLAMATÓRIA REGULAM O RESULTADO NEOPLÁSICO.....	29
FIGURA 2- MODELO DO ESTUDO.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CLASSIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA DE ACORDO COM PERFIL DE EXPRESSÃO DE RE, RP, AMPLIFICAÇÃO DE HER2 E ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO KI67.....	19
TABELA 2- ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO DE ÓBITO E RECIDIVA DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER DE MAMA SEGUNDO A PORTARIA CONJUNTA Nº4 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (GOLDHIRSCH ET AL., 2011).....	20
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DE PESO PELO IMC CONFORME OMS.	21
TABELA 4- VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS COLETADAS DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS DAS MULHERES DA AMOSTRA ESTUDADA.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IL-4 – Interleucina 4

IL-12- Interleucina 12

NO - Óxido nítrico.

NOx - Metabólitos do NO

BRCA1 - *Breast Cancer gene 1*

BRCA2- *Breast Cancer gene 2*

DNA - Ácidos desoxirribonucleicos

RE - Receptores de estrógeno

PR - Receptores de progesterona

HER2 - Amplificação do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2

OMS - Organização Mundial de Saúde

IMC - Índice de massa corpórea

WCRF - *World Cancer Research Fund*

AICR - *American Institute for Cancer Research*

VIGITEL- Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

IL-10- Interleucina 10

IL-3- Interleucina 13

IL-6- Interleucina 6

IFN- γ - Interferon gama

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Th0 - Células T auxiliares virgens

Th1- Células T auxiliares 1

Th2 - Células T auxiliares 2

IL-5 - Interleucina 5

CCL11- Eotaxina-1

MCP-1/CCL2 - Proteína quimiotática de monócitos

IL-4R - Receptor de interleucina 4

APCs - Células apresentadoras de antígenos ativadas

NK - Células *Natural Killers*

IL-12R - Receptor de interleucina 12

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RNS - Espécies reativas de nitrogênio

NF-κB - Fator nuclear kappa B

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TTM - tecido tumoral

iNOS- isoforma induzível de óxido nítrico sintase

Fator de crescimento transformador beta - TGF-β1

IMPACTO DO EXCESSO DE PESO NOS DETERMINANTES CLINICOPATOLÓGICOS DO CÂNCER DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS NÍVEIS DE CITOCINAS, ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICOS E MARCADORES TUMORAIS

Resumo:

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente entre as mulheres no mundo. Embora a obesidade consista em uma doença pró-inflamatória e seja considerada um agente crítico para o desenvolvimento do câncer de mama, o impacto do estado obesogênico na regulação das respostas imunes antitumorais e sua influência sobre os determinantes clínicos de prognóstico da doença ainda é pouco discutido. Assim, este estudo tem por objetivo avaliar o impacto do excesso de peso nos determinantes clinicopatológicos do câncer de mama e sua correlação com níveis circulantes de citocinas e de estresse oxidativo sistêmicos. O presente trabalho é um estudo observacional transversal realizado no Hospital do Câncer de Francisco Beltrão – PR, com 195 mulheres diagnosticadas com câncer de mama antes do início do tratamento, no período de maio de 2015 a janeiro de 2022, com análise de informações clinicopatológicas, dosagem de níveis circulantes de citocinas (IL-4 e IL-12), determinação do perfil redox (hidroperóxidos e metabólitos do óxido nítrico - NOx) e expressão tecidual tumoral de iNOS, TGF- β 1, CD4 e CD8. As participantes foram subdivididas em dois grupos de acordo com o IMC: normal (até 24,9 Kg/m²) e excesso de peso (IMC \geq 25,0 kg/m²). Posteriormente, esses grupos foram comparados, tanto no aspecto clinicopatológico como nas dosagens séricas (citocinas e perfil redox) e expressão do infiltrado tumoral de iNOS, TGF- β 1, CD4 e CD8). A frequência de mulheres com grau histológico 3 foi maior no grupo excesso de peso. Os níveis de IL-4 estavam aumentados significativamente no grupo excesso de peso e foram associados subtipos moleculares luminais B, presença de metástase linfonodal e idade ao diagnóstico \leq 50 anos. As dosagens de IL-12 elevaram-se somente no grupo excesso de peso e metástase linfonodais. Os níveis de NOx no grupo excesso de peso esteve aumentando em pacientes com subtipo Luminal B, auto grau histológico e metástases linfonodais. Níveis de hidroperóxido ao comparar pacientes normotróficos e com excesso de peso apresentaram diferenças significantes com

aumento em tumores menores que 2 cm em comparação com pacientes normotróficos com o mesmo perfil de tamanho do tumor. A expressão de iNOS esteve aumentada em biópsias tumorais de pacientes com CM e excesso de peso em comparação as mulheres eutróficas, assim como, o infiltrado de CD4 foi significativamente aumentado no grupo excesso de peso. Em conjunto, nossos dados fornecem evidências que pode haver uma correlação entre respostas imunes sistêmicas e no tecido tumoral influenciadas pelo excesso de peso quando a doença já se encontra estabelecida, com aumentos de IL-4 e NOx, assim como expressão de iNOs e CD4 no ambiente tumoral.

Palavras-chave: câncer de mama; obesidade; perfil redox; perfil inflamatório; citocinas.

IMPACT OF EXCESS WEIGHT ON THE CLINICOPATHOLOGICAL DETERMINANTS OF BREAST CANCER AND ITS ASSOCIATION WITH CYTOKINE LEVELS, SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS AND TUMOR MARKERS

Abstract

Breast cancer is the most incident neoplasm among women in the world. Although obesity consists of a pro-inflammatory disease and is considered a critical agent for the development of breast cancer, the impact of the obesogenic state on the regulation of antitumor immune responses and its influence on clinical determinants of disease prognosis is still little discussed. . Thus, this study aims to evaluate the impact of excess weight on clinicopathological determinants of breast cancer and its change with circulating levels of cytokines and systemic oxidative stress. The present work is a cross-sectional observational study carried out at the Hospital do Câncer de Francisco Beltrão - PR, with 195 women diagnosed with breast cancer before the start of treatment, from May 2015 to January 2022, with analysis of clinicopathological information, measurement of circulating levels of cytokines (IL-4 and IL-12), experience of the redox profile (hydroperoxides and metabolites of nitric oxide - NOx) and tumor tissue expression of iNOS, TGF- β 1, CD4 and CD8. Participants were subdivided into two groups according to BMI: normal (up to 24.9 kg/m²) and overweight (BMI \geq 25.0 kg/m²). Subsequently, these groups were compared, both in terms of clinicopathology and serum levels (cytokines and redox profile) and expression of iNOS, TGF- β 1, CD4 and CD8 in the tumor infiltrate. The frequency of women with histological grade 3 was higher in the overweight group. IL-4 levels were significantly increased in the overweight group and were associated with luminal B molecular subtypes, presence of lymph node metastasis, and age at diagnosis \leq 50 years. IL-12 dosages increased only in the overweight and lymph node metastasis group. NOx levels in the overweight group were increasing in patients with Luminal B subtype, histological self grade and lymph node metastases. Hydroperoxide levels when comparing normotrophic and overweight patients showed significant differences with increase in tumors smaller than 2 cm compared to normotrophic patients with the same tumor size profile. The expression of iNOS was increased in tumor biopsies from

patients with BC and overweight compared to eutrophic women, as well as the CD4 infiltrate was significantly increased in the overweight group. Together, our data provide evidence that there may be a correlation between systemic and tumor tissue immune responses influenced by excess weight when the disease is already established, with increases in IL-4 and NOx, as well as expression of iNOs and CD4 in the tumor environment.

Keywords: breast cancer; obesity; redox profile; inflammatory profile; cytokines

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	17
1.2 A OBESIDADE COMO FATOR DE RISCO E AGRAVANTE DE PROGNÓSTICO PARA O CÂNCER DE MAMA.....	21
1.3 IMPACTO DA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE BAIXO GRAU DA OBESIDADE NA CARCINOGENESE MAMÁRIA E NA RESPOSTA ANTITUMORAL CONTRA O CÂNCER DE MAMA.....	24
1.4 IMPACTO DA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE BAIXO GRAU DA OBESIDADE NO MICROAMBIENTE TUMORAL.....	33
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 GERAL	36
2.2 ESPECÍFICOS	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS	37
3.2 CARACTERIZAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA	37
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	39
3.4 DOSAGEM DE CITOCINAS SÉRICAS E DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO	39
3.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO TUMORAL DE iNOS, TGF- β 1, CD4 E CD8 POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	40
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICAS E DESENHO DO ESTUDO	41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
5. ARTIGO CIENTÍFICO: EXCESS BODY WEIGHT SIGNIFICANTLY INFLUENCES TUMOR AND SYSTEMIC LEVELS OF INFLAMMATORY RESPONSE MEDIATORS IN POOR PROGNOSIS BREAST CANCER.....	54
6. ANEXOS.....	80

1. INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente entre as mulheres no mundo, e também a causa mais frequente de morte por câncer nessa população. Estima-se que no ano de 2020, 15,5% das mortes por câncer no sexo feminino ocorreram em consequência da neoplasia mamária (IARC, 2020).

No Brasil, o câncer de mama configura-se como a neoplasia maligna mais incidente em mulheres em todas as regiões do território nacional. As taxas elevam-se nas regiões com maior desenvolvimento socioeconômico, como Sul e Sudeste, e diminuem na região Norte e Nordeste. Em 2022, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que ocorrerão 66.280 casos novos da doença (INCA, 2022).

Dentre os fatores de risco relacionados ao câncer de mama, o estilo de vida é considerado uma das causas modificáveis mais importantes na prevenção da sua etiologia (ANOTHAISINTAWEE, 2013; IARC, 2021). De acordo com a American Cancer Society, o sobrepeso e a obesidade aumentam o risco de desenvolvimento de 13 tipos de cânceres, incluindo o câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Além disso, após o diagnóstico do câncer de mama, a obesidade continua a desempenhar um papel importante nos determinantes clínicopatológicos da doença, sendo associada ao pior prognóstico, independente do status da menopausa (CALLE, et al., 2003; EWERTZ, et al., 2011; KAWAI, et al., 2012).

Nesse sentido, a obesidade é reconhecida como uma comorbidade complexa associada a mudanças comportamentais das células tumorais da mama e do microambiente circundante. Quatro mecanismos são propostos para explicar o seu papel na gênese e promoção do câncer de mama, incluindo: 1) produção de hormônios estrogênicos através da aromatização dos hormônios androgênicos, 2) sinalização de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1); 3) níveis alterados de adipocinas, adiponectina, leptina e 4) inflamação crônica sistêmica adiposa e estresse oxidativo (ATOUM; ALZOUGHLOOL; AL-HOURANI, 2020; AVGERINOS, *et al*, 2019; GARCÍA-ESTÉVEZ, L. *et al.*, 2021).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que existe forte influência dos níveis trófico-adiposos no desfecho clínico do câncer de mama. Rech e colaboradores (2021) evidenciaram que mais da metade das mulheres com câncer de mama tinham prevalência de sobrepeso/obesidade e, estava fortemente associada à ocorrência de câncer de mama de pior prognóstico, com o desenvolvimento de tumores triplo negativos, alto grau histológico e elevado risco de recorrência. Na mesma população de mulheres estudadas, Kawassaki (2019) apontou que a prevalência de sobrepeso/obesidade, nesta população com pior prognóstico, parece estar associada a alterações no eixo do cortisol, um hormônio que regula diretamente as respostas imunes antitumorais e os estados inflamatórios.

Embora a obesidade consista em uma doença pró-inflamatória e seja considerada um agente crítico para o desenvolvimento do câncer de mama, o impacto do estado obesogênico na regulação das respostas imunes antitumorais desencadeados contra o câncer de mama e, sua influência sobre os determinantes clínicos de prognóstico da doença, ainda é pouco discutido (WANG; et al.,2019; ZHANG, et al., 2020).

Assim, o presente estudo propõe avaliar o impacto do excesso de peso/obesidade nos determinantes clinicopatológicos do câncer de mama e sua possível associação com níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos circulantes, incluindo citocinas e metabólitos do estresse oxidativo.

1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente entre as mulheres em todo o mundo. Em 2020, 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama com 685 mil óbitos no mesmo ano (IARC,2020).

O câncer de mama é responsável por mais anos de vida perdidos ajustados por incapacidade em todo o mundo do que qualquer outro tipo de neoplasia. Ocorre em todos os países do mundo e pode acometer mulheres em qualquer faixa etária após a puberdade, com taxas crescentes na vida adulta (IARC, 2020).

No Brasil, além de configurar o tipo de câncer mais incidente no sexo feminino em todas as regiões, excluindo o câncer de pele não melanoma, também é a principal causa de morte por câncer em mulheres (INCA, 2019). No período entre 2016 a 2020,

os óbitos por neoplasia mamária ocuparam o primeiro lugar no país entre as causas de morte por câncer no sexo feminino, representando 16,3% do total, seguindo a tendência mundial para o mesmo período (INCA, 2022).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são amplamente conhecidos e documentados na literatura. Sabidamente, o perfil genético, idade da menarca, status menopausal, paridade, idade do primeiro filho, ocorrência prévia de câncer e estilo de vida são determinantes biológicos importantes para a iniciação da doença (ANOTHASINTAWEE, *et al.*, 2013; IARC, 2021; INUMARU; SILVEIRA; NAVES, 2011).

Embora a identificação de fatores genéticos hereditários tenha sido fundamental para a compreensão da doença, as mutações genéticas conhecidas, como aquelas que ocorrem nos genes BRCA1 e BRCA2 (*Breast Cancer gene 1 e 2*), representam somente 5-10% das causas da carcinogênese mamária (SHAH; ROSSO; NATHANSON, 2014). Os outros 90% dos casos envolvem danos ao material genético, de origem física, química ou biológica, que se acumulam ao longo da vida (ADAMI; *et al.*, 2001).

O câncer é definido como uma desordem genética causada por mutações nos ácidos desoxirribonucleicos (DNA) que são adquiridas ou induzidas. Essas alterações genéticas, em conjunto com modificações epigenéticas, alteram a expressão ou função de genes que regulam processos celulares fundamentais, como crescimento, sobrevivência e senescência, resultando na multiplicação desordenada de células com características malignas que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2013).

Nesse contexto, o câncer de mama, também possui sua gênese a partir de modificações genéticas que se traduzem em alterações no padrão de multiplicação celular, apresentando um comportamento biológico semelhante aos demais diferentes tipos de tumores sólidos. Contudo, do ponto de vista clínico, o câncer de mama é considerado uma doença heterogênea que varia conforme a apresentação clinicopatológica, subtipo molecular, prognóstico e tratamento. As características do tumor variam com base no seu estadiamento, grau histológico e expressão de diferentes receptores moleculares (KREIPE, 2012; VIALE, 2012;).

Molecularmente, os tumores mamários são classificados conforme a expressão de receptores hormonais, como os receptores de estrógeno (RE), progesterona (PR), e pela amplificação do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (*HER2*)

(KREIPE, 2012; VIALE, 2012). Também se considera nesta classificação a capacidade proliferativa celular tumoral, definida pelo índice de proliferação celular ki67 (GERDES; *et al.*, 1984).

A análise conjunta desses fatores permite realizar a classificação molecular do câncer de mama, proposta pelo 15th *St. Gallen International Breast Cancer Consensus Conference*, em cinco subtipos moleculares principais do câncer de mama detalhados na Tabela 1 (CURIGLIANO; *et al.*, 2017).

Tabela 1- Classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama de acordo com perfil de expressão de RE, RP, amplificação de HER2 e índice de proliferação ki67.

Classificação	Perfil de expressão	Ki67
Luminal A	RE+ / RP+/ HER2-	<14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+ / HER2-	>14%
Luminal-HER	RE+ / RP+ / HER2 amplificado	qualquer valor
HER2+	RE- / RP- / HER2 amplificado	qualquer valor
Triplo negativo	RE- / RP- / HER2-	qualquer valor

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano 2.

Fonte: adaptado de Curigliano, *et al.* (2017).

A classificação dos subtipos moleculares representou um grande avanço no tratamento do câncer de mama. Além de auxiliar nas decisões terapêuticas dirigidas a cada subtipo molecular, tem valor prognóstico, na sobrevida e preditivo da resposta à quimioterapia (ROUZIER; *et al.*, 2005; VALLE-SOLÍS; *et al.*, 2019).

Além disso, em virtude das inúmeras variáveis de risco existentes e suas diferentes combinações, calcular o risco individual de cada portadora de neoplasia mamária é um desafio, no entanto, imprescindível para estimar o risco de recidiva e avaliação da melhor orientação terapêutica adjuvante (SBOC, 2011).

Conforme critérios de risco de recorrência e óbito, classifica-se a paciente com câncer de mama nos riscos baixo, intermediário e alto. Na Tabela 2 estão detalhados os critérios para classificação de risco de óbito e recidiva de acordo com o consenso de especialistas de *St Gallen* (GOLDHIRSCH; *et al.*, 2011) e adotados para uso pelo Ministério da Saúde.

Tabela 2- Estratificação de risco de óbito e recidiva de pacientes diagnosticadas com câncer de mama segundo a Portaria Conjunta N^o4 do Ministério da Saúde (Goldhirsch et al., 2011).

Categoria	Características
Baixo risco	<p>Linfonodo negativo e todos os seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamanho do tumor ≤ 2 cm, ▪ Grau 1, ▪ Ausência de extensa invasão vascular e peritumoral, ▪ RE e/ou RP positivos, ▪ HER2 negativo, ▪ Idade ≥ 35 anos.
Risco intermediário	<p>Linfonodo negativo e pelo menos um dos seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamanho do tumor > 2 cm, ou ▪ Grau 2-3, ou ▪ Presença de extensa invasão vascular e peri-tumoral, ou ▪ RE e RP ausentes, ou ▪ HER2 gene superexpresso ou amplificado, ou ▪ Idade < 35 anos.
Alto risco	<p>Linfonodo positivo (1 a 3 LN) e todos os seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ RE e RP positivos, ▪ HER2 gene negativo, <p>Linfonodo positivo (1-3 LN) e pelo menos um dos seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ RE e RP ausente, ou ▪ HER2 gene superexpresso ou amplificado <p>Linfonodo positivo (4 ou mais envolvidos).</p>

pT: Tamanho tumoral; RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; HER-2:receptor de crescimento epidérmico humano 2.

Fonte: Goldhirsch et al., 2011.

Apesar das pesquisas sobre o impacto da obesidade no câncer de mama terem demonstrado epidemiologicamente uma correlação de causalidade e aumento na mortalidade após o diagnóstico, existem atualmente poucos estudos disponíveis na literatura que avaliam o real impacto do excesso de peso nos determinantes

clinicopatológicas do câncer de mama e no seu prognóstico (CHAN; *et al.*,2014).

Ademais, o impacto da obesidade em outras doenças como no diabetes e nas doenças cardíacas encontra-se bem estabelecido, porém, no câncer esta questão ainda é pouco considerada na prática clínica (GONZALEZ; *et al.*, 2017).

1.2 A obesidade como fator de risco e agravante de prognóstico para o câncer de mama

A obesidade é definida como uma doença nutroneurometabólica, com excessiva concentração de gordura corporal em consequência do desbalanço energético, associada principalmente a hábitos de vida, sedentários e consumo exacerbado de alimentos. Fatores genéticos, metabólicos, ambientais, sociais, culturais, econômicos, estilo de vida e demográficos são alguns dos determinantes para o excesso de peso e gênese da doença (RIBAS-FILHO & SUEN, 2018; SOUZA; *et al.*, 2018).

A obesidade também é reconhecida como uma doença crônica não transmissível que aumenta a prevalência de outras doenças crônicas como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, doenças osteometabólicas, doenças pulmonares e alguns tipos de neoplasias (RIBAS-FILHO & SUEN,2018).

O diagnóstico da doença obesidade e do sobrepeso, segundo a diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS), é realizado através da avaliação do índice de massa corpórea (IMC) (WHO, 1998). No cálculo são levados em consideração a altura e o peso do indivíduo segundo a fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso (quilogramas)}}{\text{altura X altura (metros)}}$$

A partir do IMC, a OMS classifica o indivíduo em faixas de níveis tróficos conforme descrito na Tabela 3 (WHO, 1998).

Tabela 3 - Classificação de peso pelo IMC conforme OMS.

IMC	CLASSIFICAÇÃO
Menor que 18,5	Baixo peso

Entre 18,6-24,9	Eutróficos
Entre 25-29,9	Sobrepeso
Entre 30 – 34,9	Obesidade grau I
Entre 35-39,9	Obesidade grau II
Entre 35- 39,9	Obesidade grau III

Fonte: WHO, 1998.

Dados da OMS no ano de 2016, mostram que a obesidade representava 13% da população adulta com prevalência em 11% dos homens e 15% das mulheres. Outros 39% apresentavam excesso de peso que somados com a obesidade totalizavam 52% da população mundial acima do peso, a maioria da população mundial em 2016 vivia em países onde o sobrepeso e a obesidade matam mais pessoas do que o baixo peso (NCD-RisC, 2017; WHO,2020).

No Brasil, dados da Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL) apontam que a prevalência da obesidade está em escala de crescimento, em paralelo ao panorama mundial. A frequência de adultos com excesso de peso, entre os anos de 2006 a 2020, teve um aumento de 14,9% no período analisado, alcançando ao patamar de 57,5% em 2020. Esse aumento foi observado em ambos os sexos, porém, mais evidente entre as mulheres, variando de 38,5%, em 2006, a 56,2% em 2020. A frequência de adultos com obesidade aumentou no período, representando 21,5% da população em 2020, também com maior aumento entre as mulheres, variando de 12,1%, em 2006 para a 22,6% em 2020. (BRASIL, 2022).

O estilo de vida é considerado um dos fatores modificáveis mais importantes na prevenção da etiologia do câncer de mama. Dentre esses fatores, a obesidade chama atenção por configurar-se como uma condição modificável e passível de ser combatida (ANOTHASINTAWEE; *et al.*, 2013; IARC, 2021).

Contudo, estudos epidemiológicos que sugerem a obesidade como fator de risco para a gênese do câncer de mama ainda são conflitantes. Inumaru e colaboradores (2011) em uma metanálise sobre fatores de risco para desenvolvimento de neoplasias mamárias, concluiu que os resultados referentes à gordura corporal são contraditórios, na pré- e na pós-menopausa. No entanto, a *World Cancer Research Fund* (WCRF) e o *American Institute for Cancer Research* (AICR) consideram o excesso de gordura corporal na pós-menopausa como fator de risco significativo para

o desenvolvimento do câncer de mama (GARCÍA-ESTÉVEZ, *et al.*, 2021; LAUBY-SECRETAN; *et al.*, 2016; WCRF, 2007).

Na pré-menopausa há evidências recentes de risco aumentado para o desenvolvimento do subtipo molecular triplo negativo, considerado o mais agressivo por não ter terapêutica alvo específica como os demais subtipos moleculares (TORRES-DE LA ROCHE; *et al.*, 2020).

A literatura mostra ainda que a vigência de obesidade no câncer de mama está associada à piora da sobrevida e aumento da mortalidade (CHAN; *et al.*, 2014; PROTANI, COORY, MARTIN, 2010;). Chan e colaboradores (2014) publicaram uma meta-análise que reuniu 82 estudos com 213.075 sobreviventes de câncer de mama, demonstrando que a obesidade relaciona-se à piora da sobrevida global por câncer de mama indiferente do status menopausal e do período em que o IMC é verificado.

A obesidade também está ligada à piora do prognóstico por câncer de mama na pré e pós-menopausa (CALLE, *et al.*, 2003; EWERTZ, *et al.*, 2011; KAWAI, *et al.*, 2012;). O IMC elevado é relacionado a tumores de maior tamanho independente do status menopausal, maior invasão linfonodal e metástase (BARONE, *et al.*, 2020; BIGLIA, *et al.*, 2013;), assim como, aumento da recorrência local e à distância (PANG; WEI; KARTSONAKI, 2022) e menor resposta ao tratamento (CHAN, *et al.*, 2014; EWERTZ, *et al.*, 2011; RAMAN, *et al.*, 2016; VAYSSE, MULLER, FALLONE, 2019), com aumento da mortalidade (MOORE, *et al.*, 2019).

Pacientes obesas com câncer de mama são mais propensas a desenvolver tumores em graus mais elevados no momento do diagnóstico em comparação a mulheres eutróficas (AYOUB; *et al.*, 2019; BLAIR; *et al.*, 2019). Entre os subtipos moleculares, a obesidade parece impactar mais o subgrupo triplo negativo, com repercussões negativas na sobrevida global e a sobrevida livre de doença (HARBORG; *et al.*, 2021; TURKOZ; *et al.*, 2013) e pior prognóstico (HAO; *et al.*, 2015).

Tais dados demonstram que a obesidade afeta o desfecho do câncer de mama e tornam-se preocupantes quando observamos os crescentes aumentos da obesidade e sobrepeso na população mundial nas últimas décadas. De forma global entre 1975 e 2016, a obesidade somada ao sobrepeso aumentou 29,8% para 36,9% em homens e 29,8% para 38% em mulheres, atingindo as cifras de 2 bilhões de indivíduos acima do peso no mundo (WHO, 2020).

1.3 Impacto da inflamação crônica de baixo grau da obesidade na carcinogênese mamária e na resposta antitumoral contra o câncer de mama

A maioria dos tumores de mama na pós-menopausa apresentam receptores hormonais positivos. Como os ovários cessam a produção de estrogênios após menopausa, é proposto que um dos fatores para o desenvolvimento e manutenção do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa seja pela produção de estrogênios pelo tecido adiposo (SIMPSON; *et al.*,2005; SONNE-HANSEN & LYKKESFELDT, 2005). Tal síntese ocorre através da enzima aromatase, que converte hormônios andrógenos em estrógenos, sendo influenciada pela obesidade e pelo envelhecimento (BULUN & SIMPSON,1994).

Contudo, o mecanismo da manutenção da produção de estrógenos no tecido adiposo na pós-menopausa não é o único fator associado à obesidade que afeta a iniciação e progressão da carcinogênese mamária. Evidências apontam que há outras vias exclusas ao estrogênio envolvidas na ligação entre obesidade e carcinogênese da mama, como a hiperinsulinemia, aumento da sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), níveis alterados de adipocinas, adiponectina, leptina e inflamação crônica sistêmica e estresse oxidativo (ATOUM; ALZOUGHLOOL; AL-HOURANI; 2020; AVGERINOS; *et al.*, 2019; IYENGAR; HUDIS; DANNENBERG; 2013; ZHAO; *et al.*,2021).

Ademais, os estudos epidemiológicos citados acima, reiteram que a obesidade piora os desfechos clínicos da doença, independente do status menopausal. Esses dados em conjunto evidenciam que há mais mecanismos biológicos relacionados ao impacto da obesidade na manutenção e propagação do câncer de mama, não se restringindo apenas ao metabolismo dos hormônios sexuais (CHAN; *et al.*,2014; BIGLIA; *et al.*, 2013; CALLE; *et al.*, 2003; KAWAI; *et al.*, 2012, EWERTZ; *et al.*, 2011).

No passado, com exceção do papel da aromatização androgênica em estradiol, a massa adiposa era considerada um órgão bioquimicamente inerte (FANTUZZI; *et al.*, 2005). Contudo, a obesidade está associada à inflamação no tecido adiposo, classificada como crônica e subclínica, com infiltração de macrófagos nos depósitos adiposos tanto em sítios subcutâneos quanto viscerais (OLEFSKY & GLASS, 2010).

Nesse cenário, um dos mecanismos propostos para explicar o impacto do ambiente obesogênico no desenvolvimento e manutenção do câncer é justamente a ocorrência da inflamação crônica de baixo grau e estresse oxidativo, presente nos indivíduos obesos (AVGERINOS, *et al.*, 2019; BULLÓ, *et al.*, 2007; KOLB; SUTTERWALA; ZHANG, 2016; OLEFSKY & GLASS, 2010). Os macrófagos ativados pela inflamação crônica são a principal fonte de fatores de crescimento e de citocinas que afetam profundamente as células endoteliais, epiteliais e mesenquimais do microambiente tumoral, representando células chaves do sistema imune precursores desta inflamação crônica (COUSSENS & WERB, 2002; KOLB, SUTTERWALA, ZHANG, 2016).

A inflamação crônica sistêmica é marcada por níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios circulantes que são propostos como promotores da tumorigênese, crescimento e manutenção das células tumorais (OLEFSKY & GLASS, 2010; PIERCE; *et al.*, 2009; VAN KRUIJSDIJK; VAN DER WALL; VISSEREN, 2009). Adicionalmente, o tecido adiposo produz e libera uma variedade de substâncias pró e anti-inflamatórias, como leptina, adiponectina, resistina, visfatina, interleucinas (IL) 4, IL-10, IL-3, IL-12, IL-6, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), dentre outras (LEE; LEE; CHOUE, 2013; SCHMIDT; *et al.*, 2015; TRAYHURN & WOOD, 2004).

Propõem-se que a inflamação atue como promotora da carcinogênese por ativar as células inflamatórias e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em danos oxidativos e redução do reparo do DNA. Essas alterações no genoma humano levam a suspensão dos programas de morte e/ou reparo celular, levando a replicação do DNA e proliferação de células mutantes que perderam o controle normal do crescimento (COUSSENS & WERB, 2002).

O estresse oxidativo é definido como uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) que não são neutralizadas pela ação de antioxidantes, resultando em uma perturbação do equilíbrio redox celular (JONES, 2006; PISOSCHI & POP, 2015).

Em células cronicamente inflamadas, a produção de grandes quantidades de ROS e RNS, promove o desequilíbrio redox, onde a resposta antioxidante endógena não é capaz de evitar os danos oxidativos irreversíveis ao DNA, lipídios e proteínas. Tais danos podem causar alterações genéticas e/ou epigenéticas levando à desregulação de oncogenes e genes supressores de tumor, impulsionando o início da

carcinogênese (CRUJEIRAS; *et al.*, 2013; MURATA; *et al.*, 2012).

A inflamação crônica do tecido adiposo, além da produção de diversas citocinas, têm o potencial de elevar a geração de ROS e RNS, criando um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral em indivíduos obesos (AVGERINOS, *et al.*, 2019; BHARDWAJ & BROWN, 2021; COUSSENS & WERB, 2002; LORINCZ & SUKUMAR, 2006).

As células epiteliais da mama estão inseridas no tecido adiposo, o que permite a interação parácrina entre as células epiteliais e as células do compartimento adiposo. No contexto da obesidade essa interação parece estar aumentada pelo excesso da massa gordurosa, permitindo que os fatores do tecido adiposo contribuam com o início e progressão do câncer de mama por diversos mecanismos (BHARDWAJ & BROWN 2021).

Quando a neoplasia mamária se encontra instalada, o desequilíbrio redox persiste. Marcadores circulantes de estresse oxidativo, como hidroperóxidos, considerados importantes indicadores de oxidação lipídica, são frequentemente observados no sangue de pacientes com câncer de mama (PANIS; *et al.*, 2012, 2016).

Outra molécula importante no equilíbrio redox é o óxido nítrico (NO), principal progenitor comum para todas as espécies reativas do nitrogênio. O NO juntamente com seus metabólitos nitrogenados (NOx), consistem em moléculas essenciais tanto para a invasão e progressão tumoral, como para sua supressão (MISHRA; PATEL; BANERJEE, 2020; VANNINI; KASHFI; NATH, 2015). Em concentrações mais baixas, o NO promove a carcinogênese, enquanto em concentrações elevadas, torna-se citotóxico para células cancerígenas e induz apoptose, tornando-se uma molécula de particular interesse no ambiente tumoral (MISHRA; PATEL; BANERJEE, 2020; VAHORA; *et al.*, 2016).

Um recente estudo com camundongos, relatou que o NO intratumoral está elevado em camundongos obesos e com tumores maiores, em comparação com animais controle. (YADAV A; *et al.*, 2022). O papel dicotômico do NO foi evidenciado no câncer de mama, sendo determinado, entre outros fatores, pelos tipos de células que constituem o microambiente tumoral (MISHRA; PATEL; BANERJEE, 2020).

Nesse sentido, outra evidência importante, descreve que o desequilíbrio redox, parece estar mais elevado em células de câncer de mama associadas a obesidade, pelo aumento da oxidação dos ácidos graxos, em comparação a células não expostas ao ambiente obesogênico (DAI; *et al.*, 2022).

Além disso, a leptina derivada de adipócitos do tecido mamário, aumenta a atividade oxidativa dos ácidos graxos em modelos com células-tronco cancerígenas mamárias (WANG; *et al.*, 2018). Em contraste com a leptina, a adiponectina está reduzida na obesidade e parece inibir fortemente a proliferação de células tumorais parcialmente pela inibição do NF- κ B (fator nuclear kappa B) um fator de transcrição que regula positivamente a proliferação tumoral e aumentar os níveis de expressão do gene supressor tumoral p53 (BROWN, 2021; CAO, LUO, KARIN, 2007; KELESIDIS; KELESIDIS; MANTZOROS, 2006;).

Através da transcrição gênica, a via NF- κ B, promove a proliferação celular tumoral, suprime a apoptose, acelera a migração e invasão celular e estimula a angiogênese. Especificamente no câncer de mama a via de sinalização NF- κ B revelou ser anormalmente ativada e intimamente associada à metástase e prognóstico ruim, assim como o bloqueio desta via aumentou os efeitos antitumorais e antimetastáticos. (ZENG; *et al.* 2021; ZHANG; LENARDO; BALTIMORE, 2017).

A ativação do NF- κ B ocorre, dentre outros fatores, pela inflamação, estresse oxidativo e o dano persistente ao DNA celular, por meio da geração de estresse oxidativo (HALLIWELL B & GUTTERIDGE, 2015; KARIN & GRETEN 2005). Indivíduos com obesidade apresentam super regulação de genes pertencentes à via de estresse NF- κ B (LÊ; *et al.*,2011). Tais evidências em conjunto, sugerem que o estresse oxidativo influenciado pelo tecido gorduroso, representa uma via de ativação da sinalização NF- κ B, que por sua vez representa um importante fator tumorigênico.

Apesar destas evidências isoladas, não se sabe de que forma a obesidade influencia nos níveis circulantes de citocinas e de estresse oxidativo, e como isso se correlaciona com os aspectos clinicopatológicos do câncer de mama. Nesse sentido, devido aos crescentes aumentos da obesidade nas últimas décadas e sua possível relação com a fisiopatogenia e progressão no câncer de mama, se faz importante investigar os mecanismos pelas quais essas duas doenças se relacionam.

Embora a obesidade consista em uma doença pró-inflamatória e seja considerada um agente crítico para o desenvolvimento do câncer de mama, o impacto do estado obesogênico na regulação negativa das respostas imunes antitumorais, bem como seus mecanismos específicos, permanecem pouco estabelecidos (ZHANG; *et al.*, 2020; WANG; *et al.*, 2019).

É proposto que a resposta inflamatória nos tumores persista pela ativação constante dos fatores desencadeantes - como a inflamação crônica – e/ ou de uma

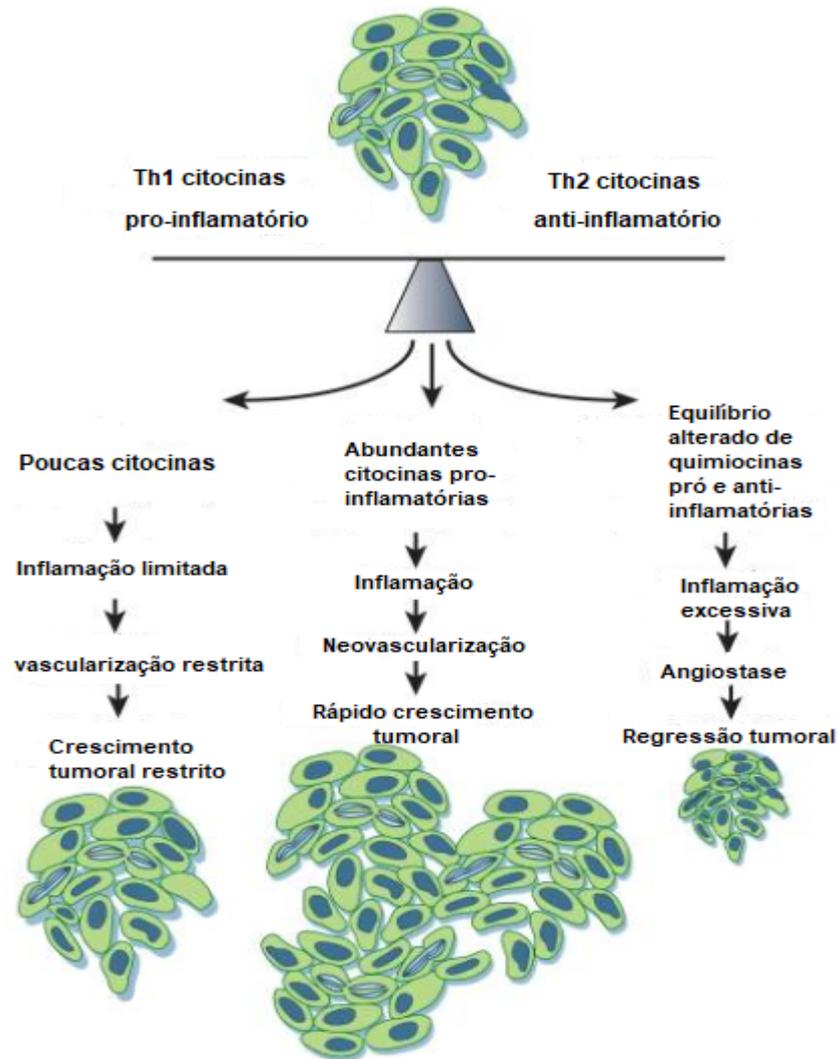
falha dos mecanismos necessários para a resolução da resposta inflamatória (COUSSENS & WERB, 2002).

Nesse sentido, sabe-se que a ativação da sinalização das células T auxiliares virgens (Th0) e sua diferenciação nos diferentes padrões de polarização de células efetoras em Th1 - padrão pró-inflamatório ou Th2 - padrão anti-inflamatório, representam um fator limitante ou promotor do desenvolvimento e progressão tumoral (BASU; *et al.*, 2021; DENARDO & COUSSENS, 2007)

Enquanto as células do padrão Th1 estimulam a resposta imune antitumoral, as células Th2 induzem a resposta pró-tumorigênica imunossupressora (BASU; *et al.*, 2021). Além disso, o equilíbrio de citocinas produzidos por esses diferentes padrões celulares de resposta imune representam um fator crítico para regulação do combate imunológico as células cancerígenas no ambiente tumoral (COUSSENS & WERB, 2002; BALKWILL & MANTOVANI, 2001).

A figura 2 demonstra que o balanço de citocinas e quimiocinas em qualquer tumor é crítico para regular o tipo e a extensão do infiltrado inflamatório que se forma e a resposta perante o tumor. Tumores que produzem pouca ou nenhuma citocina ou uma superabundância de citocinas anti-inflamatórias induzem respostas inflamatórias e vasculares limitadas, resultando em crescimento tumoral restrito. Em contraste, a produção de uma abundância de citocinas pró-inflamatórias pode levar a um nível de inflamação que potencializa a angiogênese, favorecendo o crescimento neoplásico. Alternativamente, equilíbrio de citocinas pró-inflamatórias versus anti-inflamatórias estão associados a citotoxicidade, angiostase e regressão tumoral.

Figura 1- O equilíbrio da resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória regulam o resultado neoplásico.



Fonte: adaptado de Coussens & Werb, 2002.

Mosmann (1986) foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar que após a ativação de células T orientadas pelo sistema imune, as células virgens (Th0) diferenciam-se em subconjuntos específicos caracterizados por suas funções e perfis de produção de citocinas. Assim os linfócitos Th1 são induzidos pela IL-12, e tendem a produzir mais IL-12 e interferon gama (IFN- γ), citocinas envolvidas na imunidade celular. Já os linfócitos do padrão Th2 conduzem primariamente a imunidade humoral com a produção de IL-4 e IL-10 (MOSMANN, 1986).

Com o avançar das pesquisas, outras interleucinas foram sendo descobertas para cada padrão de resposta imune. A imunidade adaptativa do padrão de resposta Th1 é caracterizada pela presença de citocinas como o IFN- γ , TNF α , IL-12 entre outras quimiocinas. (BINDEA; *et al.*, 2010; DENARDO & COUSSENS,2007). Já as citocinas padrão Th2 incluem a IL-4, IL-5, IL-10, Eotaxina-1 (CCL11), entre outras, que parecem promover a progressão do tumor mamário. (DENARDO & COUSSENS,2007; PARDOLL; 2009).

Os subconjuntos de células e a produção de citocinas Th1 e Th2 são frequentemente regulados de maneira inversa, comumente quando um grupo de citocinas está mais elevado o padrão contrário está em níveis mais baixos (KIDD, 2003). Um exemplo disso é a expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1/CCL2), produzida em locais de lesão tecidual, que induz simultaneamente a expressão da citocina IL-4 enquanto diminui a expressão de IL-12 (CHENSUE; *et al.*,1995). O efeito final desta alteração facilita a mudança de uma resposta inflamatória do tipo Th1 para uma resposta inflamatória do tipo TH2. (COUSSENS & WERB, 2002).

Isso se torna particularmente importante quando observamos que vias de resposta imune mediadas por células Th2, especialmente os linfócitos T que expressam IL-4, promovem indiretamente a invasão e subsequente metástase de adenocarcinomas mamários, em contraste com as vias de resposta imune de células Th1 que se acredita serem tumor inibitório (DENARDO,2009; PARDOLL, 2009). Além disso, a expressão de IL-12 provenientes de células padrão Th1 inibem a diferenciação de células Th2, enquanto a IL-4 inibe a diferenciação de Th1 (KIDD, 2003).

Especificamente no câncer de mama, o padrão Th2 parece estar associado ao desenvolvimento de tumores de pior prognóstico. Níveis séricos de 27 citocinas avaliados em pacientes com câncer de mama antes do tratamento indicam que existe predomínio de um agrupamento de citocinas relacionadas ao subtipo Th2, associado ao prognóstico ruim (ABEEN; *et al.*,2018).

A manutenção dos efeitos negativos do padrão Th2 nesta resposta parece persistir mesmo após iniciado o tratamento quimioterápico. Um estudo com pacientes com câncer de mama em tratamento antineoplásico demonstrou que o grupo com melhor sobrevida apresentava baixos níveis de citocinas padrão Th2, enquanto o grupo que apresentou a pior sobrevida abrangeu altos níveis de citocinas pró-tumorais

(PACCAGNELLA; *et al.*, 2022).

A IL-4 é um importante citocina secretada principalmente por linfócitos T CD 4+ ativados e mastócitos. A IL-4 representa a citocina chave na diferenciação de células Th2, também aumenta a expressão dos principais complexos de histocompatibilidade e do receptor de IL-4 (IL-4R) nos tecidos e células imunes (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2012; SETRERRAHMANE & Xu,2017).

Os IL-4R são encontrados principalmente em células T, basófilos, mastócitos, células naturais killers, assim como células tumorais de colón, próstata e mama (SUZUKI; *et al.*, 2015). A expressão de IL-4R em células de câncer mamário em roedores demonstrou ser importante promotor de crescimento tumoral e metástases pulmonares e hepáticas, com aumentos na proliferação e sobrevivência de células neoplásicas (VENMAR; *et al.*, 2014).

Investigações em células de cânceres epiteliais de cólon, mama e pulmão evidenciaram que estas expressam altos níveis de proteínas antiapoptóticas (PED, cFLIP, Bcl-xL e Bcl-2) e que a amplificação da expressão dessas proteínas foi aumentada pela produção de IL-4 no ambiente tumoral. Antagonicamente, o bloqueio da IL-4 resultou em uma diminuição significativa na taxa de crescimento de células cancerosas epiteliais e as sensibilizou, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TODARO; *et al.*, 2019).

Um estudo com mulheres diagnosticadas com câncer de mama antes do início do tratamento, evidenciou que a produção elevada de citocinas ao padrão Th2, incluindo a IL-4, estava associada ao desenvolvimento de tumores de pior prognóstico (ABEEN; *et al.*, 2018). Tal cenário parece persistir na vigência do tratamento radioterápico e quimioterápico, com dosagens mais elevadas de padrão Th2, incluindo IL-4, associados a pior sobrevida (PACCAGNELLA; *et al.*, 2022).

Esses dados em conjunto, levantam um alerta sobre o impacto da obesidade nas respostas imunes antitumorais, visto que, como demonstrado acima a IL-4 é produzida ativamente pelo tecido adiposo, assim como possui receptores em células tumorais e possivelmente orquestra a resposta pró-metastática e proliferativa no câncer de mama. Contudo, não há na literatura estudos disponíveis que correlacionam obesidade, níveis de IL-4 e seu impacto no câncer de mama.

Uma citocina fundamental nas respostas antitumorais e que age antagonicamente com a IL-4 é a IL-12. Produzida por células apresentadoras de antígenos ativadas (APCs), como células dendríticas e macrófagos. Possui a função

de estimular a diferenciação dos linfócitos T no padrão Th1, assim como inibe a ativação do padrão Th2. A IL-12 induz nas células efectoras Th1 a secreção de citocinas do IFN- γ , favorecendo a imunidade mediada por células (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2012; DJURETIC; *et al.*, 2007; MANETTI; *et al.*, 1993).

Assim, a IL-12 é reconhecida como uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, realizando um papel fundamental na regulação da inflamação. Sua liberação por APCs após a detecção de antígenos estranhos resulta na imediata ativação e proliferação de células T e das células Natural Killers (NK), com consequente produção de IFN- γ (ASTE-AMEZAGA; *et al.*, 1994; GATELY; *et al.*, 1994; MEDZHITOV, 2001; MURPHY; *et al.*, 1994)

A capacidade da IL-12 em aumentar a secreção de IFN – γ , promove as vias supressoras de tumores e potencializam respostas citotóxicas por células Natural Killers (NK) e células T, através da produção das citocinas citolíticas como perforina, granzima e ligante FAS (TUGUES; *et al.*, 2015; LASEK ; ZAGOZDZON; JAKOBISIAK, 2014).

O receptor da IL-12 (IL-12R) é composto por duas subunidades, a IL-12R β 1 e IL-12R β 2, e a expressão de ambas as subunidades do receptor é necessária para ativação do receptor. O complexo IL-12R é encontrado em células NK e T ativadas (PRESKY; *et al.*, 1996; ROGGE; *et al.*, 1999.). O IFN- γ secretado através da estimulação da IL-12, também está associado a inibição da angiogênese tumoral (TUGUES; *et al.*, 2015).

Estudos em camundongos demonstraram que a IL-12 suprime significativamente o crescimento de tumores e promove a apoptose tumoral, com aumento da capacidade das células T, desencadeando mudanças programáticas em células apresentadoras de antígenos supressivas dentro dos tumores (KERKAR; *et al.*, 2011; YANG; *et al.*, 2016). Outra análise com modelos de tumores pouco imunogênicos, evidenciou que a ativação da IL-12 em camundongos imunocompetentes portadores de tumor ativou o estado imunológico inflamatório resultou em regressão completa do tumor, mesmo em depósitos tumorais distantes (NAKAO; *et al.*, 2020).

Contudo, os níveis séricos de IL-12 e de IFN- γ parecem estar diminuídos em pacientes com câncer de mama em comparação aos controles saudáveis, independentemente do status da quimioterapia, indicando que tanto a ação pró - inflamatória como a antineoplásica estão diminuídas nos tumores de mama (TZANG;

et al., 2020).

Em pacientes obesas, o perfil pró-inflamatório predomina sobre o anti-inflamatório, onde há a presença de IL-12 aumentada (MATIA-GARCIA; *et al.*, 2021; MOHAMED; *et al.*, 2020; SCHMIDT; *et al.*, 2015). No entanto, semelhantemente a IL-4 não há na literatura estudos disponíveis que correlacionam obesidade, níveis de IL-12 e seu impacto no câncer de mama.

Por fim, considerando-se que a inflamação consiste em um processo que envolve as vias de sinalização mediadas por citocinas e pelo estresse oxidativo, e que a obesidade é um fator crucial na geração e perpetuação deste cenário no câncer de mama, faz-se necessário o entendimento da sua contribuição na geração destes marcadores inflamatórios sistêmicos nestas pacientes, bem como a avaliação do seu impacto no perfil clinicopatológico da doença.

1.4 Impacto da inflamação crônica de baixo grau da obesidade no microambiente tumoral.

A infiltração imune do tumor de mama está claramente associada a uma melhor resposta ao tratamento e resultados no CM (SAVAS; SALGADO; DENKERT, 2016). A conexão entre obesidade e câncer de mama atribuída à inflamação sistêmica crônica de baixo grau parece ser iniciada pelo acúmulo de gordura, que atrai células inflamatórias que secretam citocinas e fatores de crescimento com potencial pró-tumorigênico (QUAIL & DANNENBERG, 2019).

Cabe ressaltar que as citocinas no tecido tumoral (TTM) podem inibir o desenvolvimento do tumor, mas de maneira alternativa possuem potencial de contribuir para a inflamação crônica que suporta o crescimento do tumor de maneira autócrina e parácrina, associado a resultados ruins (KARTIKASARI; HUERTAS; MITCHEL, 2021).

Nesse sentido, ressaltamos em nossa revisão quatro marcadores tumorais, a isoforma induzível de óxido nítrico sintase (iNOS), fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1), células CD4 e CD8, que estão associados a desfechos clínicos diversos no câncer de mama e que possuem relação com as citocinas e marcadores redox citados acima.

Assim, foi relatado na literatura que o processo de metástase é iniciado pela transição epitelial para mesenquimal, e essa sinalização parece ser ativada pela presença de TGF- β 1 em células tumorais (XU, LAMOUILLE, DERYNCK, 2009). Contudo, a ação específica celular do TGF- β no câncer se manifesta como efeitos distintos, em estágios iniciais da doença suprime o crescimento tumoral e em estágio mais avançados está associada ao aumento da inflamação e da angiogênese (DIETZ, 2010; KATZ; LI; CHEN, 2013).

Ademais, o TGF- β 1 regula negativamente os níveis de IL-12, estando associado à supressão tumoral com polarização para o padrão Th2 (TUGUES; BURKHARD; OHS, 2015). Recente estudo que avaliou marcadores sistêmicos e tumorais em 192 pacientes com câncer de mama evidenciou que a expressão de níveis de TGF- β 1 estão aumentados na mama em associação com excesso de gordura corporal (CHO; IYENGAR; ZHOU, 2021).

Outro marcador presente no tecido tumoral a iNOS é uma enzima responsável pela produção de NO nos tecidos, que possui características pró-inflamatória implicada na inflamação crônica e cicatrização de feridas (NATHAN & XIE, 1994). Estudo com mulheres com câncer de mama demonstrou que iNOS foi expressa 70% dos tumores de mama e estava associado a tumores triplo negativos e baixa sobrevida (GLYNN; BOERSMA; DORSEY, 2010). A iNOS também foi identificada como um biomarcador da progressão da doença do câncer de mama e da sobrevida do paciente (BULUT, ERDEN, SAK, 2005; BOERSMA, DORSEY, 2010).

A radioterapia e a inibição da iNOS em modelos murinos de câncer de mama e pulmão, suprimiram o crescimento do tumor e aumentaram o tempo de sobrevida, concomitante ao aumento de células CD8 no ambiente tumoral (XU, LUO, YUAN, 2020). Apesar dessas evidências convincentes, não encontramos na literatura estudos da expressão de iNOS associado a obesidade e câncer de mama.

Em relação ao infiltrado de células T, a literatura demonstra que elevações de células CD8+ no ambiente tumoral tem efeitos antitumorais no câncer de mama e está relacionado a melhor prognóstico (MAIMELA; LIU; ZHANG, 2018). Em pacientes com câncer de mama triplo-negativos a baixa densidade de CD8 + prevê independentemente a mortalidade e, a redução de 10% de CD8+ no infiltrado tumoral resultou em 20% de aumento no risco de mortalidade (VIHERVUORI; AUTERE; REPO, 2019).

Um estudo precursor com ratos, evidenciou que a obesidade induzida por dieta rica em gordura prejudica a função das células T CD8 + no ambiente tumoral murino acelerando o crescimento tumoral (RINGEL; DRIJVERS; BAKER, 2020). De modo semelhante, outro estudo mostrou que a obesidade diminui a função das células T CD8 + em modelos tumorais murinos de mama e que a inibição da oxidação de ácidos graxos aumenta as células CD8 + efetoras levando a inibição tumoral (ZHANG, *et al.*, 2020).

Quando analisados os infiltrados de CD4 no ambiente tumoral obeso, observou-se um aumento significativo na porcentagem de células CD4 + intratumorais em camundongos obesos em comparação com camundongos magros (MAIMELA; LIU; ZHANG, 2018.). Em mulheres com câncer de mama para cada aumento de 10 unidades (kg/m²) no IMC, ocorre o aumento de 1,6% no tecido tumoral (ASAD, DAMICIS, HENG, *et al.*, 2022.). Assim, esses dados em conjunto, demonstram que o perfil do infiltrado imune das mulheres com excesso de peso apresenta aumento de CD4+, mas esse aumento não caracteriza aumento das células CD8+, que em finalidade pode prejudicar as respostas imunes efetoras citotóxicas antitumorais.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o impacto do excesso de peso corporal nos desfechos clinicopatológicos do câncer de mama e sua associação com os níveis de citocinas, estresse oxidativo sistêmicos e marcadores tumorais.

2.1 Específicos

- a) Determinar o perfil clinicopatológico das portadoras de câncer de mama atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão, categorizando-as segundo os níveis tróficos adiposos para comparação entre os grupos eutróficas e aquelas com sobrepeso/obesidade.
- b) Quantificar os níveis circulantes das citocinas interleucina 4 (IL-4) e interleucina 12 (IL-12) e comparar os resultados entre os grupos eutróficas e aquelas com sobrepeso/obesidade.
- c) Quantificar os níveis circulantes hidroperóxidos plasmáticos e metabólitos do óxido nítrico (NOx) e comparar os resultados entre grupos eutróficas e aquelas com sobrepeso/obesidade.
- d) Investigar a expressão de marcadores inflamatórios no tecido tumoral por imunofluorescência fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1), NO sintase induzível (iNOS) e células CD4 e CD8, em biópsias de grupos eutróficas e aquelas com sobrepeso/obesidade.

3. METODOLOGIA

3.1 População de estudo e aspectos éticos

O presente trabalho é um estudo observacional transversal realizado no Hospital do Câncer de Francisco Beltrão – PR (CEONC), responsável pelo atendimento dos pacientes pertencentes à 8ª Regional de Saúde do Paraná.

Esta pesquisa compreendeu o período de maio de 2015 a janeiro de 2022 e, incluiu mulheres com indicação de cirurgia oncológica conforme avaliação prévia de médicos cirurgiões oncológicos da instituição, com coleta de amostras para análise antes do início do tratamento.

Durante o período observado, foram triadas 605 pacientes, e após a confirmação do diagnóstico pela biópsia, foram incluídas no estudo somente as participantes com diagnóstico confirmado de câncer de mama, que possuíam amostras sanguíneas e tecido tumoral disponíveis para pesquisa em banco de amostras séricas e com informações clinicopatológicas completas em prontuário médico.

Os critérios exclusão, foram o resultado de biópsias inconclusivas ou com diagnósticos que excluam câncer de mama, inconsistência de dados em prontuário médico, perda de seguimento no período analisado.

Esta proposta encontra-se aprovada no Comitê de ética Institucional sob o número CAAE 35524814.4.0000.0107, parecer número 810.501. Foram consideradas apenas as pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos I e II).

3.2 Caracterização clinicopatológica

Foram coletadas informações, em prontuário médico das variáveis clinicopatológicas conforme detalhado na tabela 4.

Tabela 4- Variáveis clinicopatológicas coletadas dos prontuários médicos das mulheres da amostra estudada.

Dados clinicopatológicos	Classificação
Subtipo molecular	Luminal A Luminal B Luminal-HER HER+2 Triplo Negativo
Agressividade do subtipo molecular	Triplo negativo e Luminal B: agressividade elevada. Demais subtipos: baixa agressividade
Tamanho do tumor	< 2 cm ≥ 2 cm
Grau histológico	Grau 1 Grau 2 Grau 3
Grau histológico agrupados	Grau 1 e 2= baixo grau Grau 3 = alto grau
Idade ao diagnóstico	< 49 anos ≥ 50 anos
Faixa etária ao diagnóstico	< 30 anos 30-34 anos 35-39 anos 40-44 anos 45-49 anos 50-55 anos 55-59 anos >60 anos
Estratificação de risco de óbito e recidiva	Baixo Intermediário Alto

Estratificação de risco de óbito e recidiva segundo a Portaria Conjunta N°4 do Ministério da Saúde e Goldhirsch et al., 2007.

A combinação destes dados representa importantes indicadores no prognóstico, resposta terapêutica e sobrevida das pacientes com câncer de mama.

3.3 Coleta das amostras de sangue

No dia do procedimento cirúrgico foram obtidos os termos de consentimento livre esclarecido (anexo I e II) e coletadas amostras de 10 mL de sangue periférico armazenados em tubos contendo EDTA. O plasma foi obtido por meio de centrifugação à 4000 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos, e conservados à -20°C até o momento das análises.

3.4 Dosagem de citocinas séricas e dos níveis de estresse oxidativo

A dosagem das citocinas IL-4 e IL-12 foi realizada através de kits comerciais pelo método de enzimaímunoensaio (*ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) através de kit comercial (e-Biosciences, USA). Alíquotas de plasma foram incubadas em placa contendo anticorpo de captura específico para cada citocina, seguidas de sucessivas lavagens e incubação com anticorpo secundário marcado com estreptavidina. Para detecção da reação, foi adicionado substrato específico e a placa lida a 642 nm. Os resultados foram calculados em pg/mL a partir de dados de uma curva padrão para cada citocina. O limite de detecção do kit é de 2 pg/mL.

A determinação dos níveis plasmáticos de hidroperóxidos foi realizada através de quimiluminescência de alta sensibilidade (QL), adaptado de Gonzalez Flecha et al. (1991) por Panis et al. (2012), através de reação mediada por tert-butil. Alíquotas de 125 µL de plasma foram adicionadas a 855 µL de tampão fosfato monobásico (10 mM, pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de solução de tert-butil (3 mM) e monitorada em luminômetro Glomax 20/20 (Promega, USA), para avaliação do perfil de emissão de fótons. Os resultados obtidos pela integral da curva de emissão foram expressos em unidades relativas de luz (RLU).

Para a mensuração dos níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), foi utilizado o método de conversão de nitrato a nitrito, pela reação de cádmio-cobre e detecção de nitrito total pelo método de Griess conforme descrito por Panis et al. 2012. Para desproteinização, alíquotas de 60 µL de plasma foram adicionados de 50 µL de sulfato de zinco (ZnSO₄, 75 mM), centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos, e em seguida misturados com 70 µL de hidróxido de sódio (NaOH 100 mM), com nova etapa

de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado, e adicionou-se 50 µL de tampão glicina-NaOH 45g/L pH 9,7.

Os grânulos de cádmio, utilizados para a reação de conversão de nitrato à nitrito, foram ativados em solução de sulfato de cobre 5mM, por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas com os grânulos ativados por 10 minutos. Após adição de 50 µL de amostra em microplaca de 96 poços, adicionou-se 50 µL de reagente de Griess (Sulfanilamida 0,4 g em 20 mL de ácido fosfórico 5% - protegido de luz; e naftiletildietilamida - NEED: 40 mg em 20 mL de H₂O destilada. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a medida da absorbância a 550 nm foi realizada em leitora de microplacas (Polaris, Brasil) e os resultados expressos em µM de nitrito com base em uma curva padrão.

3.5 Avaliação da expressão tumoral de iNOS, TGF-β1, CD4 e CD8 por imunofluorescência

Para as investigações de iNOS, TGF-β1, CD4 e CD8 em amostras de tumor foram analisados por imunofluorescência, obtidas de cortes de 3 µm de espessura utilizando-se micrótomo Leica RM 2045 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), dispostos em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxisilano. As lâminas foram mantidas por 24 horas em estufa a 65°.

Posteriormente, realizou-se banho de desparafinização química, por 5 minutos em solução de xileno, etanol e água, consecutivamente. As lâminas foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos para bloquear a peroxidase endógena. Os cortes foram lavados entre cada etapa com solução salina (cloreto de sódio - NaCl 150 mM em pH 7,6) e Tween 20 a 1%. O bloqueio de sítios de ligação não específicos também foi realizado com solução de leite em pó a 5% por 15 min. Então, mesa 2. Em seguida, as lâminas foram lavadas e normalmente incubadas por 1 hora com anticorpo secundário diluído. Os cortes foram tratados com 4,6 diamidinofenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), solução de 5 mg/mL, por 30 min para contracoloração nuclear e montados em glicerol.

As imagens foram capturadas em um microscópio de fluorescência Motic BA410E acoplado a uma câmera MOTICAM ProS5 Plus e software de aquisição e processamento de imagens Motic Images Plus 3.0 ML. As lâminas foram lidas usando

um filtro de excitação DAPI com ampliação de 200 ou 400 ×. Os seguintes ajustes foram predefinidos: exposição automática, ganho + 20 e deslocamentos zero. As imagens obtidas foram armazenadas no formato BMP, resolução 2048 × 1536 pixels. As Recomendações de Relatórios para Estudos Prognósticos de Marcadores Tumorais (REMARK) foram seguidas.

3.6 Análise estatísticas e desenho do estudo

As variáveis clinicopatológicas das pacientes foram categorizadas e tabuladas em planilhas do programa Microsoft Excel®. Para melhor compreensão do impacto do excesso de peso sobre o câncer de mama as pacientes foram subdivididas em dois grupos de acordo com o IMC: normal (até 24,9 Kg/m²) e excesso de peso corporal (IMC ≥ 25,0 kg/m²).

As frequências das categorias de cada variável foram comparadas para as pacientes pertencentes a ambos os grupos utilizando o teste Qui-quadrado para aderência. Além disso, fez-se uso deste mesmo teste para comparar os grupos segundo as categorias de cada variável. Os testes foram feitos com 5% de significância estatística.

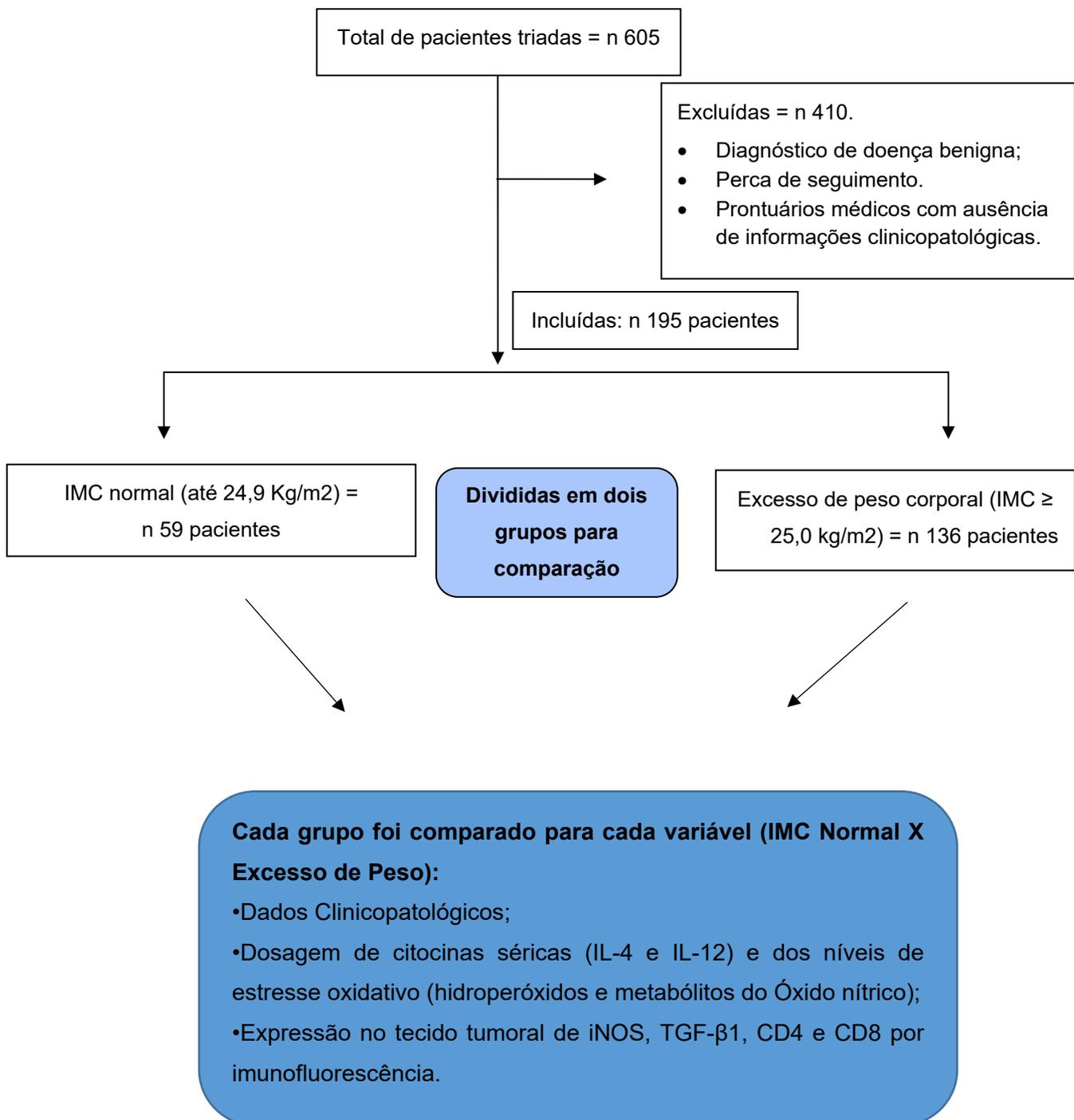
Para cada variável clinicopatológica foi realizado ainda o teste de Qui-quadrado para independência, afim de analisar a associação entre as categorias e os grupos. Em situações de ferimento do pressuposto de frequência mínima esperada igual a 5, foi utilizado como teste de associação o método de Monte Carlo, também com 5% de significância. O objetivo desse teste é o mesmo que o do Qui-quadrado para independência, entretanto é estatisticamente mais robusto quando os pressupostos não são verificados.

Após as análises estatísticas clinicopatológicas primárias, as participantes do estudo foram avaliadas conforme o perfil de IMC, as variáveis clinicopatológicas e os níveis dos marcadores plasmáticos sistêmicos e do tecido tumoral.

Para a análise estatísticas das dosagens de substâncias supracitadas, manteve-se a subdivisão em dois grupos de acordo com o IMC: normal (até 24,9 Kg/m²) e excesso de peso corporal (IMC ≥ 25,0 kg/m²) e, foram comparados a dosagens entre os subgrupos normal versus excesso de peso em cada desfecho clínico-patológico.

As dosagens séricas e de tecido tumoral foram analisadas estatisticamente no software GraphPad Prism .9.0. A distribuição dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Assim, as variáveis com distribuição normal foram analisadas com testes paramétricos. Quando a suposição de normalidade não foi atendida, foram utilizados testes não paramétricos. Assim, foram utilizados o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos. Considerou-se como significante valores de $p \leq 0,05$.

Figura 2- Modelo do estudo.



4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular & Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 560p.

ABEEN, S. *et al.* Noninvasive profiling of serum cytokines in breast cancer patients and clinicopathological characteristics. **Oncoimmunology**, Philadelphia, v. 8, n. 2, e1537691, Nov. 2018.

ADAMI, H. O. *et al.* Primary and secondary prevention in the reduction of cancer morbidity and mortality. **Eur J Cancer**, Oxford, v. 37, p. 118-127, Sep. 2001. Suppl. 8.

ANOTHASINTAWEE, T. *et al.* Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Asia Pac J Public Health**, Hong Kong, v. 25, n. 5, p. 368-387, May 2013.

ASAD, S., DAMICIS, A., HENG, Y.J., *et al.* Association of body mass index and inflammatory dietary pattern with breast cancer pathologic and genomic immunophenotype in the nurses' health study. **Breast Cancer Res**. V. 24(1), p.78. Nov. 2022.

ASTE-AMEZAGA, M. *et al.* Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. **Cell Immunol**, New York, v. 156, n. 2, p. 480-492, July 1994.

ATOUM, M. F.; ALZOUGHLOOL, F.; AL-HOURANI, H. Linkage Between Obesity Leptin and Breast Cancer. **Breast Cancer (Auckl)**, Auckland, v. 14, Jan. 2020.

AVGERINOS K.I. *et al.* Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. **Metabolism**, v. 92. P. 121-135. Mar. 2019.

AYOUB, N. M. *et al.* Impact of Obesity on Clinicopathologic Characteristics and Disease Prognosis in Pre- and Postmenopausal Breast Cancer Patients: A Retrospective Institutional Study. **J Obes**, New York, v. 2019, Article ID 3820759, Mar. 2019.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, London, v. 357, n. 9255, p. 539-545, Feb. 2001.

BARONE, I. *et al.* The weight of obesity in breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives. **Semin Cancer Biol**, London, v. 60, p. 274-284, Feb. 2020.

BASU, A. *et al.* Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. **Front Immunol**, Lausanne, v.12, e669474, May 2021.

BHARDWAJ, P.; BROWN, K. A. Obese Adipose Tissue as a Driver of Breast Cancer Growth and Development: Update and Emerging Evidence. **Front Oncol**, Lausanne, v. 11, e638918, Mar. 2021.

BIGLIA, N. *et al.* Body mass index (BMI) and breast cancer: impact on tumor histopathologic features, cancer subtypes and recurrence rate in pre and

postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, London, n. 29, v. 3, p. 263-267, Mar. 2013.

BINDEA, G. *et al.* Natural immunity to cancer in humans. **Curr Opin Immunol**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 215-222, Apr. 2010.

BLAIR, C. K. *et al.* Obesity and survival among a cohort of breast cancer patients is partially mediated by tumor characteristics. **NPJ Breast Cancer**, New York, v. 5, n. 33, p. 1-7, Oct. 2019.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. **Vigitel Brasil 2006-2020: estado nutricional e consumo alimentar. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica do estado nutricional e consumo alimentar nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal entre 2006 e 2020.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_2006_2020_morbidade_referida.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_2006_2020_morbididade_referida.pdf). Acesso em: 18 de agosto de 2022.

BROWN, K.A. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer. **Nat Rev Endocrinol**. V. 17, p. 350-363. Apr. 2021.

BULLÓ, M. *et al.* Inflammation, obesity and comorbidities: The role of diet. **Public Health Nutr**, Oxford, v. 10, n. 10A, p. 1164–1172, Oct. 2007.

BULUN, S. E.; SIMPSON, E. R. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis indicates that levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of women increase with advancing age. **J Clin Endocrinol Metab**, New York, v. 78, n. 2, p. 428-432, Feb. 1994.

BULUT, A.S., ERDEN, E., SAK, S.D., *et al.* Significance of inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant breast epithelium: an immunohistochemical study of 151 cases. **Virchows Arch**.v.447(1), p. 24-30. Jul. 2005.

CALLE, E. E. *et al.* Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. **N Engl J Med**, Boston, n. 348, v. 17, p. 1625-1638, Apr. 2003.

CAO, Y.; LUO, J. L.; KARIN, M. I κ B kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 40, p. 15852-15857, Oct. 2007.

CHAN, D. S. M. *et al.* Body mass index and survival in women with breast cancer-systematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. **Ann Oncol**, London, v. 25, n. 10, p.1901-1914, Oct. 2014.

CHENSUE, S. W. *et al.* Regulação in vivo da produção de IL-12 de macrófagos durante a formação de granulomas mediados por citocinas tipo 1 e tipo 2. **J Immunol**, Rockville, v. 155, p. 3546–3551, 1995.

CHO, B.A., IYENGAR, N.M., ZHOU, X.K. Blood biomarkers reflect the effects of obesity and inflammation on the human breast transcriptome. **Carcinogenesis**. v. 42(10), p.1281-1292. Oct. 2021.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 860-867, Dec. 2002.

CRUJEIRAS, A. B. *et al.* Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: A potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. **Free Radic Res**, Yverdon, v. 47, p. 243-256, Apr. 2013.

CURIGLIANO, G. *et al.* De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017. **Ann Oncol**, London, v. 28, n. 8, p. 1700-1712, Aug. 2017.

DAI, J. Z. *et al.* YAP Dictates Mitochondrial Redox Homeostasis to Facilitate Obesity-Associated Breast Cancer Progression. **Indian J Cancer**, Mumbai, v. 9, n. 12, e2103687, Apr. 2022.

DENARDO, D. G. *et al.* CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 16, n. 2, p. 91-102, Aug. 2009.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Res**, London, v. 9, n. 4, e212, Aug 2007.

DIETZ, H.C. TGF-beta in the pathogenesis and prevention of disease: a matter of aneurysmic proportions. **J Clin Invest**. v.120(2), p. 403-407. 2010.

DJURETIC, I. M. *et al.* Os fatores de transcrição T-bet e Runx3 cooperam para ativar Ifng e silenciar Il4 em células T helper tipo 1. **Nat Immunol**, New York, v. 8, n. 2, p. 145-153, Fev. 2007.

EWERTZ, M. *et al.* Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. **J Clin Oncol**, New York, v. 29, n. 1, p. 25-31, Jan. 2011.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, St Louis, v. 115, n. 5, p. 911-919, May 2005.

GARCÍA-ESTÉVEZ, L. *et al.* Obesity and Breast Cancer: A Paradoxical and Controversial Relationship Influenced by Menopausal Status. **Front Oncol**. Aug. 2021.

GATELY, M. K. *et al.* Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. **Int Immunol**, Oxford, v. 6, n. 1, p.157-167, Jan. 1994.

GERDES, J. *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol**, Rockville, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, Oct. 1984.

GLYNN, S.A., BOERSMA, B.J., DORSEY, T.H. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. **J Clin Invest**. v.120(11)p. 3843–3854. Nov. 2010;

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, London, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, Aug. 2011.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radic Biol Med**, Los Angeles, v. 10, p. 93–100, Jan. 1991.

GONZALEZ, N. *et al.* Regulação do tecido adiposo visceral e epicárdico para prevenir lesões cardiovasculares associadas à obesidade e diabetes. **Cardiovasc Diabetol**, London, v. 16, p. 44, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015. 896p.

HAO, S. *et al.* Overweight as a Prognostic Factor for Triple-Negative Breast Cancers in Chinese Women. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, e0129741, June 2015.

HARBORG, S. *et al.* Overweight and prognosis in triple-negative breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **NPJ Breast Cancer**, New York, v. 7, n. 1, p.119, Sep. 2021.

IARC - International Agency For Research On Cancer. **Cancer today**. Lyon: WHO, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 25 julho 2022. Base de dados.

IARC - International Agency For Research On Cancer. **IARC monographs of carcinogenic risks to humans and handbooks of cancer prevention**. Lyon: IARC, 2021. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans>. Acesso em: 25 jul 2022.

INCA - Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. **Estimativa 2020: Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//...> Acesso em: 25 de julho de 2022. Base de dados.

INCA - Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva. **Atlas da mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>. Acesso em: 25 jul 2022. Base de dados.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 30 de agosto de 2022.

INUMARU, L.E.; SILVEIRA, E.A.; NAVES, M.M. Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática **Cad Saúde Pública**. v.7. Mai. 2011.

IYENGAR, N. M.; HUDIS, C. A.; DANNENBERG, A. J. Obesity and inflammation: new insights into breast cancer development and progression. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, Alexandria, v. 33, p. 46-51, Mai. 2013.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 8, p. 1865-1879, Oct. 2006.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: ligando inflamação e imunidade ao desenvolvimento e progressão do câncer. **Nat Rev Immunol**, London, v. 5, p. 749-759, 2005.

- KARTIKASARI, A.E.R., HUERTAS, C.S., MITCHEL, A., et al. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. **Front Oncol.** v.7, p.142. Jul. 2021
- KATZ, L.H., LI, Y., CHEN, J.S, *et al.* Targeting TGF- β signaling in cancer. **Expert Opin Ther Targets.** v. 17 (7),p.743-760. 2013;
- KAWAI, M. *et al.* Body mass index and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women. **BMC Cancer**, London, n. 12, v. 149, Apr. 2012.
- KAWASSAKI, A. C. B. **Exposição aos agrotóxicos e níveis plasmáticos de cortisol, citocinas e perfil redox em pacientes com câncer de mama.** 2019. 105 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.
- KELESIDIS, I.; KELESIDIS, T.; MANTZOROS, C. S. Adiponectina e câncer: uma revisão sistemática. **Br J Cancer**, London, v. 94, n. 9, p. 1221-1225, 2006.
- KERKAR, S. P. *et al.* IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 121, n. 12, p. 4746-4757, Dec. 2011.
- KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Altern Med Rev**, Dover, v. 8, n. 3, p. 223-246, Aug. 2003.
- KOLB, R.; SUTTERWALA, F. S.; ZHANG, W. Obesity and cancer: Inflammation bridges the two. **Curr Opin Pharmacol**, Oxford, v. 29, p. 77-89, Aug. 2016.
- KREIPE, H. H. Translationale Forschung und Diagnostik beim Mammakarzinom. **Der Pathologe**, Berlin, v. 33, p. 282-290, Oct. 2012. Suppl. 2.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 1421p.
- LASEK, W.; ZAGOZDZON, R.; JAKOBISIĄK, M. Interleucina 12: ainda um candidato promissor para imunoterapia tumoral? **Cancer Immunol Immunother**, Berlin, v. 63, p. 419-435, 2014.
- LAUBY-SECRETAN, B. *et al.* Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. **N Engl J Med**, Boston, v. 375, n. 8, p. 794-798, Aug 2016.
- LÊ, K. A. *et al.* Subcutaneous adipose tissue macrophage infiltration is associated with hepatic and visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and stimulation of NF- κ B stress pathway. **Diabetes**, New York, v. 60, n. 11, p. 2802-2809, Nov. 2011.
- LEE, H.; LEE, I. S.; CHOUE, R. Obesity, inflammation and diet. **Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr**, Seongnam, v. 16, n. 3, p. 143-152, Sep. 2013.
- LORINCZ, A. M.; SUKUMAR, S. Ligações moleculares entre obesidade e câncer de mama. **Endocr Relat Cancer**, Bristol, v. 13, p. 279-292, 2006.
- MAIMELA, N.R., LIU, S., ZHANG, Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. **Comput Struct Biotechnol** . v.17,p.1-13. Nov. 2018.
- MANETTI, R. *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **J Exp Med**, New York, v. 177, n. 4, p. 1199-204. Apr. 1993.

- MATIA-GARCIA, I. *et al.* Th1/Th2 Balance in Young Subjects: Relationship with Cytokine Levels and Metabolic Profile. **J Inflamm Res**, Auckland, v. 14, p. 6587-6600, Dec. 2021.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, London, v. 1, n. 2, p.135-145, Nov. 2001.
- MISHRA, D.; PATEL, V.; BANERJEE, D. Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cancers: Emphasis on Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*, Auckland, v. 14, e1178223419882688, Jan. 2020.
- MOHAMED, A. A. *et al.* Inflammatory and endothelial dysfunction indices among Egyptian females with obesity classes I-III. **Biosci Rep**, London, v. 40, n. 9, BSR20192910, Sep. 2020.
- MOORE, A. H. *et al.* Obesity and mortality after locoregional breast cancer diagnosis. **Breast Cancer Res Treat**, Dordrecht, v.172, n. 3, p. 647-657, Dec. 2018.
- MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, Rockville, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, Apr. 1986.
- MURATA, M. *et al.* Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. **J Biomed Biotechnol**, Cairo, v. 2012, e623019, Jan. 2012.
- MURPHY, E. E. *et al.* B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. **J Exp Med**, New York, v. 180, n. 1, p. 223-231, July 1994.
- NAKAO, S. *et al.* Intratumoral expression of IL-7 and IL-12 using an oncolytic virus increases systemic sensitivity to immune checkpoint blockade. **Sci Transl Med**, Washington, v. 12, n. 526, eaax7992, Jan. 2020.
- NATHAN, C & XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**. V.78 (6), p. 915-918. Set. 1994;
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. **Lancet**, London, v. 390, n. 10113, p. 2627-2642, Dec. 2017.
- OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol**, Palo Alto, v. 72, p.219-246, Oct. 2010.
- PACCAGNELLA, M. *et al.* Circulating Cytokines in Metastatic Breast Cancer Patients Select Different Prognostic Groups and Patients Who Might Benefit from Treatment beyond Progression. **Vaccines (Basel)**, Basel, v. 10, n. 1, p.78, Jan. 2022.
- PANG, Y.; WEI, Y.; KARTSONAKI, C. Associations of adiposity and weight change with recurrence and survival in breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer**, Tokyo, n. 29, v. 4, p. 575-588, July 2022.
- PANIS, C. *et al.* Can Breast Tumors Affect the Oxidative Status of the Surrounding Environment? A Comparative Analysis among Cancerous Breast, Mammary Adjacent Tissue, and Plasma. **Oxid Med Cell Longev**, New York, v. 2016, p. 1–9, Nov. 2016.

- PANIS, C. *et al.* Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**, Dordrecht, v. 133, p. 89-97, May 2012.
- PARDOLL, D. Metastasis-promoting immunity: when T cells turn to the dark side. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 16, n. 2, p. 81-82, Aug. 2009.
- PIERCE, B. L. *et al.* Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **J Clin Oncol**, New York, v. 27, n. 21, p. 3437-3444, July 2009.
- PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, Paris, v. 97, p. 55-74, June 2015.
- PRESKY, D. H. *et al.* Um complexo receptor de interleucina 12 funcional é composto por duas subunidades de receptor de citocina do tipo beta. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 14002–14007, 1996.
- PROTANI, M.; COORY, M.; MARTIN, J.H. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat**, Dordrecht, v. 123, n. 3, p. 627–635, Oct. 2010.
- QUAIL, D.F. & DANNENBERG, A.J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. **Nat Rev Endocrinol**. v. 15(3), p.139-154. Mar. 2019.
- RAMAN, R. *et al.* Effect of body mass index- and actual weight-based neoadjuvant chemotherapy doses on pathologic complete response in operable breast cancer. **Clin Breast Cancer**, Dallas, n.16, v. 6, p. 480–486, Dec. 2016.
- RECH, D. *et al.* Clinicopathological correlation between trophic-adipose levels and poor prognosis outcomes in Brazilian women diagnosed with breast cancer. **Brazilian Journal of Oncology**, São Paulo, v. 17, e20210027, Sep. 2021.
- RIBAS-FILHO, D.; SUEN, V. M. M. **Tratado de nutrologia**. 2. ed. Barueri: Manole, 2018. 672p.
- RINGEL, A.E., DRIJVERS, J.M., BAKER, G.J., *et al.* Obesity Shapes Metabolism in the Tumor Microenvironment to Suppress Anti-Tumor Immunity. **Cell**. V.23, p.1848-1866. Dec, 2020.
- ROGGE, L. *et al.* Os anticorpos para a cadeia beta 2 do receptor de IL-12 marcam células Th1 humanas mas não células Th2 in vitro e in vivo. **J Immunol**, Rockville, v. 162, p. 3926-3932, 1999.
- ROUZIER, R. *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 11, n. 16, p. 5678-5685, Aug. 2005.
- SAVAS, P., SALGADO, R., DENKERT C, *et al.* Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. **Nat Rev Clin Oncol**.,v. 13, p.228-241.Dez. 2016.
- SBOC - Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. **Manual de Condutas 2011**. São Paulo, SP: SBOC, 2011. Disponível em:

<https://www.sboc.org.br/servicos/consensos-e-guias>. Acesso em: 28 de agosto de 2022.

SCHMIDT, F. M. *et al.* Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical activity. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 3, e0121971, Mar. 2015.

SETRERRAHMANE, S.; Xu, H. Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. **Mol Cancer**, London, v. 16, n. 1, p.153, Sep. 2017.

SHAH, R.; ROSSO, K.; NATHANSON, S.D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. **World J Clin Oncol**, Pleasanton, v. 5, n. 3, p. 283–298, Aug. 2014.

SIMPSON, E. R. *et al.* Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. **Endocr Rev**, New York, v. 26, n. 3, p. 322-330, May 2005.

SONNE-HANSEN, K.; LYKKESFELDT, A. E. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. **J Steroid Biochem Mol Biol**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 25-34, Jan. 2005.

SOUZA, S. A. *et al.* Obesidade adulta nas nações: uma análise via modelos de regressão beta. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 8, e00161417, Mar. 2018.

SUZUKI, A. *et al.* Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 79-88, Sep. 2015.

The American Cancer Society. **The Cancer Atlas: Body weight, physical activity, diet & alcohol**. Atlanta, USA: The American Cancer Society, 2021. Disponível em: https://canceratlas.cancer.org/wp-content/uploads/2019/09/CA3_BodyWeightPhysicalActivityDietAlcohol.pdf. Acesso em: 02 de Setembro de 2022.

TODARO, M. *et al.* Correction to: Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. **Cell Death Differ**, London, v. 26, n. 12, p. 2808-2809, Dec. 2019.

TORRES-DE LA ROCHE, L. A. *et al.* The Association between Obesity and Premenopausal Breast Cancer According to Intrinsic Subtypes - a Systematic Review. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, Stuttgart, v. 80, n. 6, p. 601-610, June 2020.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br J Nutr**, Cambridge, v. 92, n. 3, p. 347-355, Sep. 2004.

TUGUES, S. *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression. **Cell Death Differ**, London, v. 22, n. 2, p. 237-246, Feb. 2015.

TUGUES, S., BURKHARD, S.H., OHS, I., *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression. **Cell Death Differ**. v. 22(2),p. 237-246. Set. 2015

TURKOZ, F. P. *et al.* The prognostic impact of obesity on molecular subtypes of breast cancer in premenopausal women. **J BUON**, Nicosia, v. 18, n. 2, p. 335-341, Apr-Jun 2013.

TZANG, B. S. *et al.* Differential associations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines with depression severity from noncancer status to breast cancer course and subsequent chemotherapy. **BMC Cancer**, London, v. 20, n. 1, e686, July 2020.

VAHORA, H. *et al.* O papel potencial do óxido nítrico na interrupção da progressão do câncer através da quimioprevenção. **J Cancer Prev**, Seoul, v. 21, p. 1-12, 2016.

VALLE-SOLÍS, A. E. *et al.* [Supervivencia en cáncer de mama por subtipo mediante inmunohistoquímica: Un estudio retrospectivo]. **Gac Med Mex**, México, v. 155, p. S50-S55, Mar. 2019. Suppl. 1.

VAN KRUIJSDIJK, R. C.; VAN DER WALL, E.; VISSEREN, F.L. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Philadelphia, v. 18, n. 10, p. 2569–2578, Oct. 2009.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biol**, Amsterdam, v. 6, p. 334–343, Dec. 2015.

VAYSSE, C.; MULLER C.; FALLONE F. Obesidade: Um jogador de peso na quimiorresistência do câncer de mama. **Oncotarget**, Albany, v. 10, p. 3207-3208, May 2019.

VENMAR, K.T. *et al.* O receptor de IL-4 ILR4 α regula a colonização metastática por tumores mamários através de múltiplas vias de sinalização. **Cancer Res**, Baltimore, v. 74, p.4329-4340, 2014.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Ann Oncol**, London, v. 23, p. 207–210, Sep. 2012. Suppl. 10.

VIHERVUORI, H., AUTERE, T.A., REPO, H., *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8+ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol**. V.145(12), p.3105-3114. Dec. 2019.

WANG, T. *et al.* JAK/STAT3-Regulated Fatty Acid β -Oxidation Is Critical for Breast Cancer Stem Cell Self-Renewal and Chemoresistance. **Cell Metab**, Cambridge, v. 27, n. 1, p.136-150, Jan. 2018.

WANG, Z. *et al.* Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade. **Nat Med**, New York, v. 25, n. 1, p. 141-151, Jan. 2019.

WCRF/AICR - World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. **Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington DC, USA: American Institute for Cancer Research; 2007. Disponível em: <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/Summary-of-Third-Expert-Report-2018.pdf>. Acesso em: 24 de agosto de 2022.

WHO - World Health Organization. **Obesity and Overweight**. Geneva, Switzerland: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-andoverweight>. Acesso em: 18 de agosto de 2022.

WHO - World Health Organization. **Obesity: preventing and managing the global epidemic – report of a WHO Consultation**. Geneva, Switzerland: WHO, 1998. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42330>. Acesso em: 18 de agosto de 2022.

XU, J., LAMOUILLE, S., DERYNCK, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell Res.** V.19 (2), Feb. 2009.

XU, J., LUO, Y., YUAN, C., et al. Downregulation of Nitric Oxide Collaborated with Radiotherapy to Promote Anti-Tumor Immune Response via Inducing CD8+ T Cell Infiltration. **Int J Biol Sci.** V.16(9), p.1563-1574. Mar. 2020.

YADAV A...; *et al.* J. Activity-Based NIR Bioluminescence Probe Enables Discovery of Diet-Induced Modulation of the Tumor Microenvironment via Nitric Oxide. **ACS Cent Sci.** v. 8.p. 461-47, Apr. 2022.

YANG, S. X. *et al.* Interleukin-12 activated CD8+ T cells induces apoptosis in breast cancer cells and reduces tumor growth. **Biomed Pharmacother**, New York, v. 84, p. 1466-147, Dec. 2016.

ZENG, A. *et al.* Chlorogenic acid induces apoptosis, inhibits metastasis and improves antitumor immunity in breast cancer via the NF- κ B signaling pathway. **Oncol Rep**, Athens, v. 45, n. 2, p. 717-727, Feb. 2021.

ZHANG, C. *et al.* STAT3 Activation-Induced Fatty Acid Oxidation in CD8+ T Effector Cells Is Critical for Obesity-Promoted Breast Tumor Growth. **Cell Metab**, Cambridge, v. 31, n. 1, p. 148-161, Jan. 2020.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. **Cell**, Cambridge, v. 168, n. 1-2, p. 37-57, Jan. 2017.

ZHAO, C. *et al.* Current Landscape: The Mechanism and Therapeutic Impact of Obesity for Breast Cancer. **Front Oncol**, Lausanne, v.11, e704893, July 2021.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

EXCESS BODY WEIGHT SIGNIFICANTLY INFLUENCES TUMOR AND SYSTEMIC LEVELS OF INFLAMMATORY RESPONSE MEDIATORS IN POOR PROGNOSIS BREAST CANCER.

Adma Poliana de Borba Cecílio da Silva, Hellen dos Santos Jaques, Marina Ferronato, Fernanda Mara Alves, Matheus Iago Colleto, Mariane Okamoto Ferreira, Julia Fernandes Orrutéa, Mariane Mezzoni, Ruan Gabriel Soares da Silva, Daniel Rech and Carolina Panis.

Laboratory of Tumor Biology, State University of West Paraná, UNIOESTE, Francisco Beltrão-Paraná, Brazil.

Correspondence to carolpanis@hotmail.com; carolina.panis@unioeste.br

Funding: Fundação Araucária, Programa de Pesquisa Para o SUS – PPSUS, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Edital Universal).

Conflicts of interest: the authors have no conflicts to declare.

Availability of data and material: All data will be available under a reasonable request.

Authors' contribution: All authors contributed to the study conception and design, material preparation, data collection and analysis. The first draft of the manuscript was written by Adma Poliana de Borba Cecílio da Silva and Carolina Panis, and all authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate: All ethical issues were considered in the study and are reported accordingly in the methods section.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a pro-inflammatory disease critical for developing breast cancer (BC), which impacts the profiles of systemic inflammatory mediators determinants of different disease clinical outcomes remains little explored.

Methods: A total of 195 patients diagnosed with breast cancer were included. Aiming to exclude chemotherapy interference on circulating mediators, samples were collected at diagnosis, out of the treatment period. Patients were classified as normotrophic (BMI up to 24.9 kg/m²) or overweight (BMI \geq 25.0 kg/m²). Serum levels of IL-4, IL-12, hydroperoxides, and nitric oxide metabolites (NOx) were measured. Also, tumor expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), TGF- β 1, CD4+ and CD8+ lymphocytes were evaluated.

Results: IL-4 levels were significantly increased in the BC overweight group, including patients with luminal B tumors, presence of lymph nodal metastasis, and age at diagnosis under 50 years. IL-12 levels were significantly increased in BC overweight patients with lymph nodal metastasis. Hydroperoxides were augmented in BC overweight patients, including those with tumors smaller than 2 cm. NOx levels were also raised in BC overweight patients, including those with luminal B tumors, high-grade tumors, and lymph nodal metastases. The expression of iNOS and TCD4+ lymphocytes were significantly increased in tumor biopsies from BC overweight women.

Conclusions: These data provide a picture of the influence of excess body weight on inflammatory mediators' systemic and tumoral profiles, especially in patients displaying poor outcome BC.

Keywords: obesity, breast cancer, systemic inflammation.

1. INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is a public health problem of high proportions worldwide. It is the most frequent cancer among women worldwide and the most common cause of cancer death in this population (1-2). Among the various risk factors associated with BC development and prognosis, excess body weight has been pointed out as a determinant of poor disease prognosis. Increased mortality, worse survival, growth of larger tumors, greater lymph node invasion, metastasis development, increased recurrence, and lower response to treatment have been widely reported in such patients (3-12).

The obesogenic state affects breast tumor cells and their surrounding microenvironment. Four mechanisms have been proposed to explain its role in the genesis and promotion of breast cancer, including 1) production of estrogen hormones through aromatization of androgen hormones, 2) insulin signaling and insulin-like growth factor 1 (IGF-1); 3) altered levels of adipokines, adiponectin, leptin, and 4) chronic low-grade adipose systemic inflammation and oxidative stress (13). Therefore, adipose tissue has the potential to produce and sustain chronic inflammation, which seems to be the critical link between obesity and cancer (14).

Although obesity consists of a pro-inflammatory disease and is considered a critical agent for BC development (15-17), the impact of the obesogenic state on the regulation of inflammatory responses triggered against BC, as well as its influence on the clinical determinants of the disease prognosis remains to be understood (18,19). Several studies have not considered the influence of pro-inflammatory confounding conditions, such as its behavior under specific clinicopathological features determinant of BC outcome. Also, most of the studies analyze samples of patients under chemotherapeutic treatment or do not mention this in their design, which limits the interpretation of obtained data.

In this context, we investigated the influence of excess body weight on the systemic

and tumor profiles of inflammatory mediators determinants of BC immunobiology, such as cytokines and oxidative stress products. Further, we analyzed such findings in light of the clinicopathological features determinant for BC prognosis.

2. METHODS

2.1 Study design

The Institutional Ethics Committee approved this proposal under CAAE 35524814.4.0000.0107, opinion n° 810.501. All patients included signed the informed consent terms. This study was carried out at Hospital do Cancer Francisco Beltrão (CEONC, Paraná-Brazil), screening patients attended from May 2015 to January 2022. A total of 605 women with suspicious BC were screened, and a total of 195 were diagnosed with unilateral infiltrating ductal carcinoma and entered the study.

To determine the trophic-adipose status of patients, the body mass index (BMI) calculation was used ($BMI = \text{weight (kg)} / \text{height}^2 \text{ (m)}$). All patients with a BMI equal to or less than 24.9 kg/m² were categorized as normotrophic, and the remaining patients were included in the overweight group.

Clinicopathological data were collected from medical records and included molecular BC subtype (analyzed individually or grouped as high aggressiveness – triplenegative + luminal B or low aggressiveness – other subtypes); tumor size (< 2 cm and ≥ 2 cm), histological tumor grade (low grade: 1 and 2, high grade: 3); age at diagnosis (< 50 years or ≥ 50 years) and risk stratification of death and recurrence according to GOLDHIRSCH et al., 2011 (20). The schematic design of the study is showed in Figure 1.

2.2 Measurement of the systemic inflammatory profile: cytokines and oxidative stress levels

Heparinized peripheral blood samples (10 mL) were collected, and plasma was obtained by centrifugation (4,000 rpm for 5 minutes). Samples were frozen until analysis. Interleukin 4 (IL-4) and interleukin 12 (IL-12) were measured by using commercial kits based on the enzyme-linked immunoassay method, following manufacturers' instructions (e-Biosciences, USA). The limit of detection for the kit is 2 pg/mL.

Hydroperoxides were measured by high-sensitivity chemiluminescence (QL), adapted

from Gonzalez-Flecha et al. (21) by Panis et al. (22). Aliquots of 125 μ L of plasma were added to 855 μ L of monobasic phosphate buffer (10mM, pH 7.4). The reaction was started by adding 20 μ L of tert-butyl solution (3 mM) and monitored in a Glomax 20/20 luminometer (Promega, USA) to evaluate the photon emission profile. The results obtained by integrating the emission curve were expressed in relative light units (RLU).

To measure nitric oxide metabolites (NO_x), we used the cadmium-copper reaction and total nitrite detection by the Griess method, as described by Panis et al. (22). Briefly, aliquots of plasma (60 μ L) were deproteinized, and the supernatant was incubated with cadmium granules in a copper sulfate solution. After adding the Griess reagent, samples were read at 550 nm in a spectrophotometer. Results were expressed as μ M.

2.3 Tumor expression of iNOS, TGF- β 1, CD4 and CD8 lymphocytes by immunofluorescence

After deparaffinization, tumor samples were incubated with specific primary antibodies against iNOS (catalog number 610329), TGF- β 1 (catalog number 562545), CD4 (catalog number 555344) and CD8 lymphocytes (catalog number 550372), followed by a secondary immunofluorescent antibody (Alexa Fluor 488 for iNOS and TGF- β 1, and Texas Red for CD4 and CD8 + T lymphocytes). All antibodies were tested and standardized before their use.

Sections were counterstained with 4, 6 diamidinophenylindole (DAPI) for nucleus labeling (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Images were captured on a Motic BA410E fluorescence microscope coupled to a MOTICAM ProS5 Plus camera and Motic Images Plus 3.0 ML image acquisition and processing software. Slides were read using a DAPI excitation filter at 200 or \times 400 magnification. The following adjustments have been preset: auto exposure, +20 gain, and zero offsets. The obtained images were stored in BMP format, with a 2048 \times 1536 pixels resolution.

2.3 Data analysis

The clinical-pathological variables of the patients were categorized and tabulated in Microsoft Excel[®] spreadsheets. The frequencies of the categories of each variable were compared for patients belonging to both groups using the chi-square test for adherence, considering a 5% statistical significance. Data were analyzed using GraphPad Prism .9.0 and SPSS 25.0.0 software. Data distribution was tested using the Shapiro-Wilk test. Thus,

variables with normal distribution were analyzed using parametric tests. When the assumption of normality was not met, non-parametric tests were used. Accordingly, Student's t-test or Mann-Whitney test was used to compare the two groups. In the results section, the data is shown as min-maximum. P values ≤ 0.05 were considered significant

3. RESULTS

The clinicopathological profile of the 195 patients divided according to the classification of normal BMI (up to 24.9 kg/m²) versus excess body weight (BMI ≥ 25.0 kg/m²) is presented in Table 1. The frequency of women with histological grade 3 was higher in the BC overweight patients compared to the normotrophic ones (p=0.0499).

Figure 2 shows BC patients' systemic IL-4 according to BMI categories. IL-4 levels were increased in overweight BC patients compared to the normotrophic BC patients (Figure 2A, range: 10.88-29.71 pg/mL in normotrophic patients and range: 10.90-74.38 pg/mL in the overweight group, p = 0.0329). A significant increase in IL-4 was also observed in overweight BC patients carrying luminal B tumors (Figure 2B, range: 11.84-74.38 pg/mL) compared to the normotrophic BC patients (range: 14.39-26.20 pg/mL, p = 0.0443). Increased IL-4 was also observed in overweight BC patients with lymph nodal invasion (Figure 2C, range: 5.14-74.38 pg/mL) compared to normotrophic BC patients (range: 10.88-29.71 pg/mL, p = 0.0115). BC patients diagnosed before age 50 and overweight had higher levels of IL-4 (range: 16-51 pg/mL) than normotrophic BC patients (Figure 2D, range: 10-29 pg/mL, p = 0.0488). For the other clinical-pathological parameters, no significant variations of IL-4 were observed (p<0.05).

IL-12 (Figure 3) was significantly augmented in overweight BC patients with lymph node metastases (Figure 3B, range: 10.88-18.83 pg/mL for normotrophics and 5.16-74.38 pg/mL for the

overweight group, $p = 0.0115$). For the other clinical-pathological parameters, no significant variations of IL-12 were observed ($p < 0.05$).

The oxidative stress profile (Figure 4) was assessed by measuring the systemic hydroperoxides and NOx levels. Increased hydroperoxide was found in overweight BC patients concerning the normotrophic BC group (Figure 4A, range: 382282-18865527 RLU, and range: 307457-3451196 RLU, respectively, $p = 0.0437$). Also, overweight BC patients with tumors smaller than 2 cm showed higher hydroperoxides when compared to normotrophic BC patients with the same tumor size profile (Figure 4B, range: 441312- 2455082 URL and range: 475943-6220347 URL, respectively, $p = 0.05$). No significant variations of hydroperoxides were observed for the other clinical-pathological parameters ($p < 0.05$).

There was an increase in NOx levels in overweight BC patients compared to normotrophic BC patients (Figure 4C). Also, patients with luminal B tumors had higher levels of NOx (Figure 4D, range: 14.39-26.20 μM in eutrophic patients and range: 11.84-74.38 μM in overweight, $p = 0.0443$). Augmented NOx was also observed in overweight patients with high-grade tumors (Figure 4E, range: 26.76-31.98 μM) compared to eutrophic patients (range: 23.28-102.2 μM , $p = 0.0351$). The same behavior was observed in the presence of lymph nodal metastases (Figure 3F, range: 22.20-56.76 μM for the eutrophic group and range: 25.24-129.2 μM for the overweight group, $p = 0.0155$). For the other clinicopathological parameters, no significant NOx variations were observed ($p < 0.05$).

For tumor tissue analyses (Figure 5 and Table 2), iNOS and CD4+ T lymphocytes had augmented expression in biopsies from BC patients with overweight compared to eutrophic women (iNOS: 66% vs. 90%, $p < 0.001$ and CD4+ T lymphocytes: 20% vs. 34%, $p = 0.0378$, respectively).

4. DISCUSSION

In this study, we characterized some systemic and tumoral inflammatory mediators present in BC patients under poor prognosis conditions. Increased cytokines and oxidative stress markers were found in both systemic and tumor tissue samples of overweight BC patients compared to normotrophic BC women out of the chemotherapeutic regimen. Our findings suggest that excessive BMI propitiates a disbalance in specific cytokines and oxidative stress markers, significantly changing tumor expression under poor prognosis conditions. The connection between obesity and BC is attributed to the sustained lowgrade chronic systemic inflammation induced by excessive fat (14) and the metabolic alterations caused by the adipose tissue that modify the global immune responses and affect the cells of the tumor microenvironment (19). Thus, excessive BMI may affect the systemic production of immune-related mediators and the tumor expression of such molecules to some extent.

The polarization patterns of effector CD4⁺ T cells into Th1 - anti-tumor or Th2 - pro-tumor responses represent a crucial factor for tumor promotion in cancer (23). In this sense, we investigated two antagonistic cytokines, IL-4 and IL-12, which are keys in the differentiation of effector CD4⁺ T cells, and also produced by adipose tissue cells (23, 24). In BC, the Th2 pattern is associated with developing tumors with worse prognosis and survival. (25, 26). Even though reduced IL-12 has been reported in BC patients (27), we did not observe this change when considering the BMI categorization. This finding suggests that excessive BMI may change the dynamics of cytokine production already known for BC.

Overweight BC patients clearly showed a pattern of high production of the Th2 cytokine IL-4. Increased circulating IL-4 was found in overweight BC patients bearing tumors with aggressive features as luminal B molecular subtypes, as well as in those with clinical characteristics of poor prognosis as lymph node metastasis and early age at diagnosis. It

suggests that BC patients with excessive BMI incline the pro-tumor pattern and immune escape, which is a determinant for poor clinical outcomes. However, there are no studies in the literature that analyzed the dosages of standard Th1 and Th2 cytokines in the BC in the presence of excess weight.

In this context, we further examined the cellular profile of tumor infiltrates for CD4 and CD8 lymphocytes. Breast tumor immune infiltrates are associated with the response to treatment and disease outcomes (28). Th1 CD4 T cells are induced by IL-12 and promote the differentiation and expansion of CD8 T cells that are cytotoxic against tumor cells. In contrast, IL-4 polarizes CD4 T cells towards the Th2 pro-tumor pattern (29).

Experimental data indicate that the obesogenic environment significantly increases the percentage of intratumoral CD4⁺ cells and reduces CD8 counting in BC (30, 31). Each increase of 10 units (kg/m²) in BMI in humans results in a 1.6% increase in CD4⁺ infiltration in the BC tissue (32), but no data about cytokines profile is available in this context. We found significantly increased intratumoral CD4⁺ T cells in BC women with excessive BMI, concomitantly to increased circulating levels of IL-4, which suggests a Th2 profile that may be associated with poor prognosis disease.

Moreover, we showed that overweight BC women had more oxidative stress than those with normal weight, characterizing a pro-oxidative environment. A previous study demonstrated that ROS levels are significantly higher in patients with estrogenpositive BC and obesity (33). Although we know that obesity and BC are pathologies that generate redox imbalance independently of each other, studies that evaluate the generation of ROS in obese patients that have BC are still scarce, reinforcing the relevance of our data.

We also observed differences related to NO_x production that implicated this mediator in poor prognosis BC. NO axis is dichotomous in BC, where low levels mediate protective responses, and high levels mediate tumor proliferation (34). Furthermore, high iNOs

functioning increases NO in the tumor environment, enhancing tumor proliferation (35). We observed augmented NOx production in BC patients with excess weight with more aggressive tumors such as the luminal B subtype, histological high-grade, and presence of lymph node metastasis, as well as the elevation of iNOs expression in tumor tissue samples from the excess BMI group.

Our study has limitations, including the modest sample size and the lack of a long-term follow-up to evaluate the impact of excess BMI on features such as disease-free survival, overall survival, and disease recurrence. Also, we did not collect samples for assessing cytokines production over time. Despite this, the main strength of our data is the evaluation of patients without the main confounding factor that bias several BC studies, that is, chemotherapy. Most BC studies do not consider this issue, which generally collects and analyzes samples independent of the treatment's presence. Further, the combined evaluation of systemic and tissue markers concerning the immunoinflammatory response is a strength in the context of excessive body weight not previously addressed.

5. CONCLUSION

Our data demonstrated that excessive BMI impacts the systemic and tumoral profile of cytokines and oxidative stress in breast cancer and seems to be a determinant for poor prognosis outcomes.

TABLES AND FIGURES

Table 1 - Frequency (n) and percentage (%) of clinicopathological variables considering BMI divided into normal and excess body weight (overweight and obesity) groups.

		Normal BMI	Excessive BMI	p-value
Molecular Subtype	Luminal B	20 (33,90)	43 (31,62)	0,7544
	Luminal – HER	1 (1,69)	9 (6,62)	0,1522
	HER2	8 (13,56)	16 (11,76)	0,7260
	triple negative	10 (16,95)	27 (19,85)	0,6347
Molecular subtype aggressiveness	Too much Subtypes	49 (83,05)	10 ^a (80,15)	0,6347
	triple negative	10 (16,95)	27 (19,85)	0,6347
Tumor size(in cm)	< 2	23 (38,98)	37 (27,21)	0,1017
	≥ 2	36 (61,02)	99 (72,79)	0,1017
Histological grade	Grade 1	20 (33,90)	39 (28,68)	0,4659
	Grade 2	31 (52,54)	63 46,32)	0,4247
	Grade 3	8 (13,56)	34 (25,00)	0,0499
	Grade 1 ou 2	51 (86,44)	102 (75,00)	0,0499

Grouped histological grade	Grade 3	8 (13,56)	34 (25,00)	0,0499
Metastasis	No	29 (49,15)	83 (61,03)	0,1233
	Yea	30 (50,85)	53 (38,97)	0,1233
Risk stratification	Low	3 (5,08)	6 (4,41)	0,8370
	Intermediary	29 ^a (49,15)	71 (52,21)	0,6952
	High	27 ^a (45,76)	59 (43,38)	0,7584
Family history	Not	28 (47,46)	66 (48,53)	0,8906
	Yes	31 (52,54)	70 (51,47)	0,8906
Age range at diagnosis (in years)	30-34	3 (5,08)	3 (2,21)	0,2849
	35-39	3 (5,08)	12 (8,82)	0,3681
	40-44	12 (20,34)	16 (11,76)	0,1168
	45-49	5 (8,47)	18 (13,24)	0,3437
	50-54	4 (6,78)	20 (14,71)	0,1217

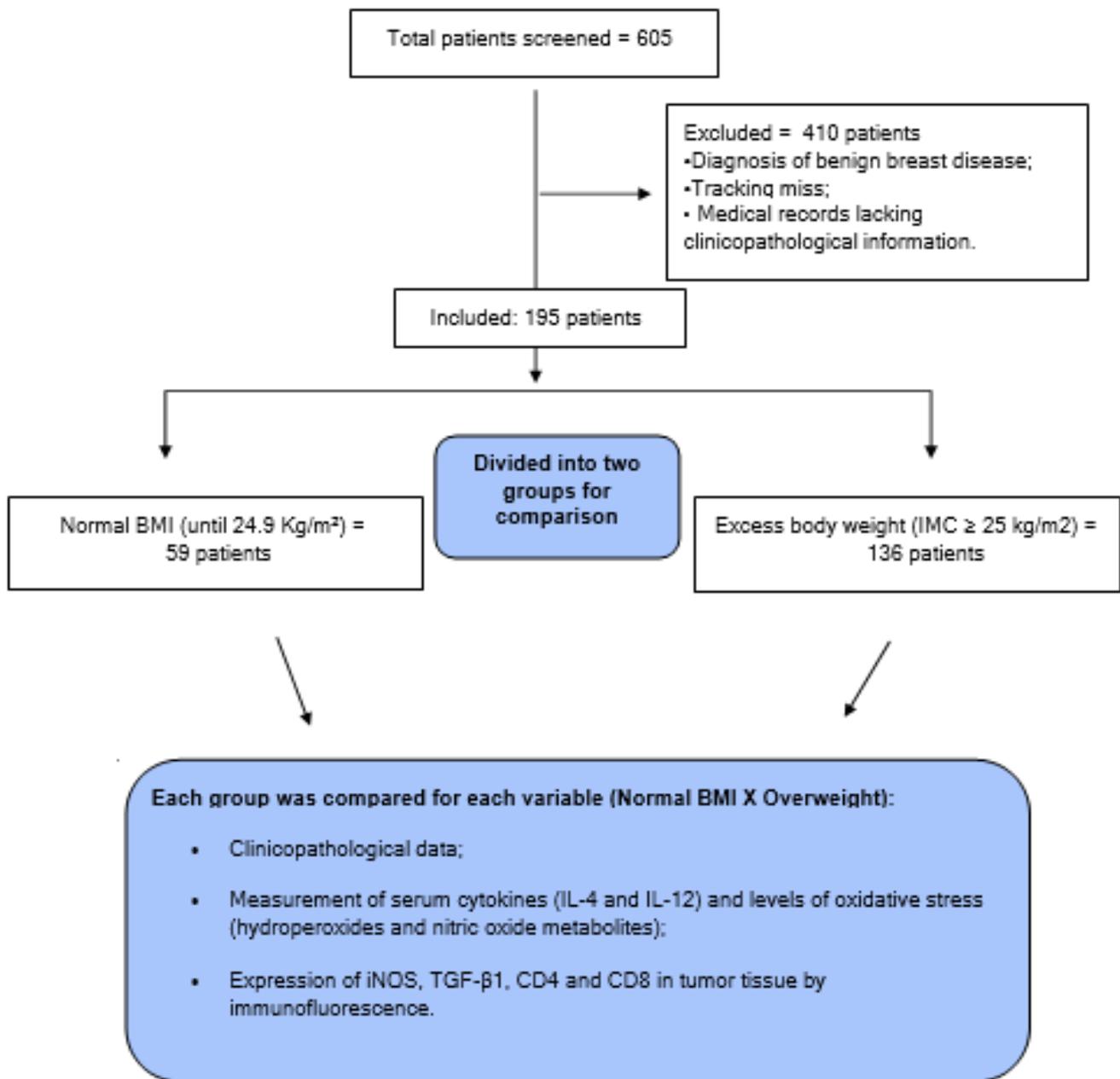


Figure 1 – Design of the study. BMI = Body Mass Index.

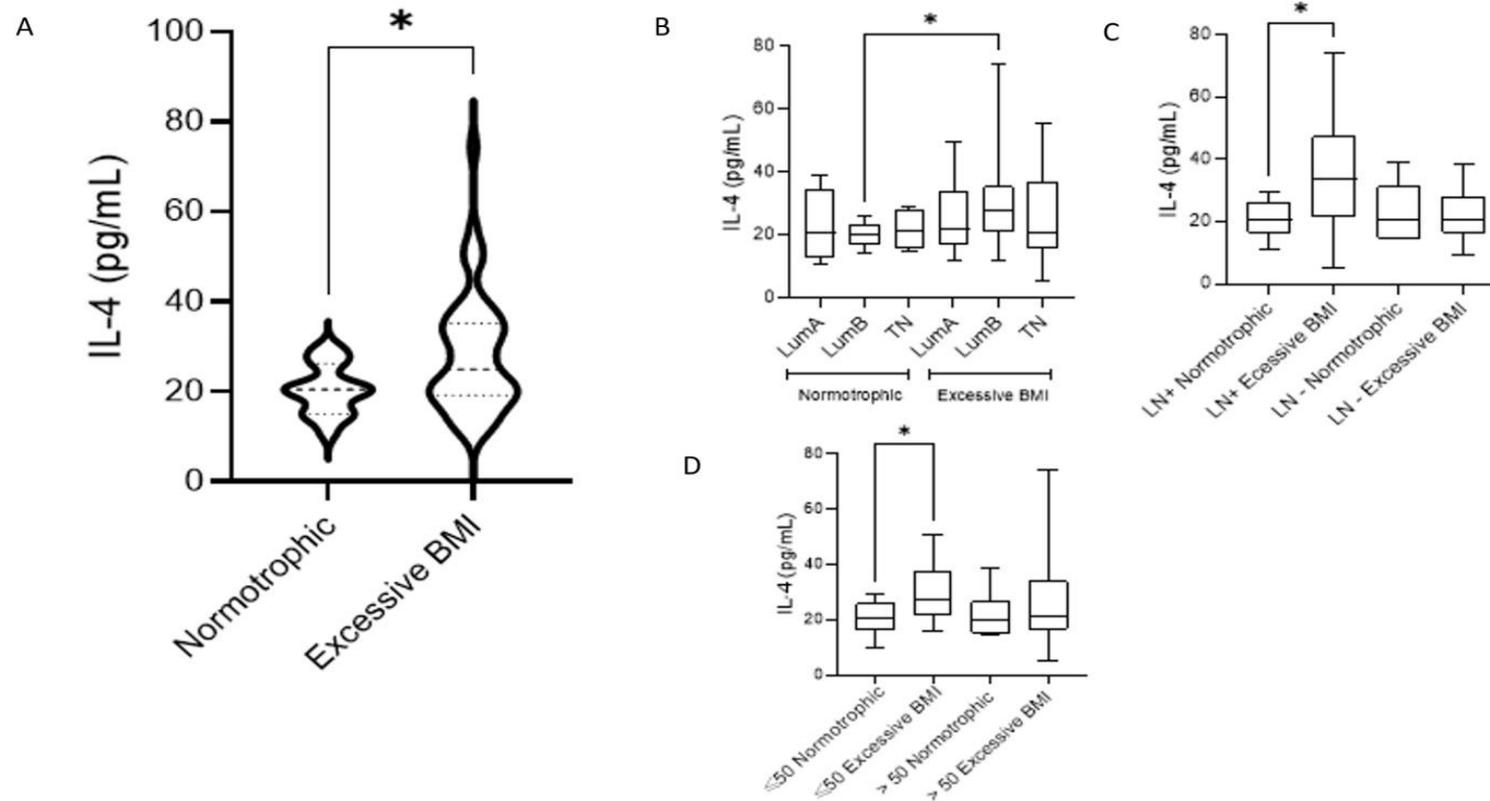


Figure 2- Plasma levels of interleukin 4 (IL-4) in patients with breast cancer distributed according to BMI categories and clinicopathological criteria
 In A, overall IL-4 levels according to BMI categorization as eutrophic or overweight. In B, distribution of levels according to molecular subtype. In C, comparison of IL-4 levels according to the presence of metastases in lymph nodes (LN) and in D according to age at diagnosis (under or equal and over 50 years). LumA = luminal A, LumB = luminal B, TN = triple negative. * indicates statistical difference.

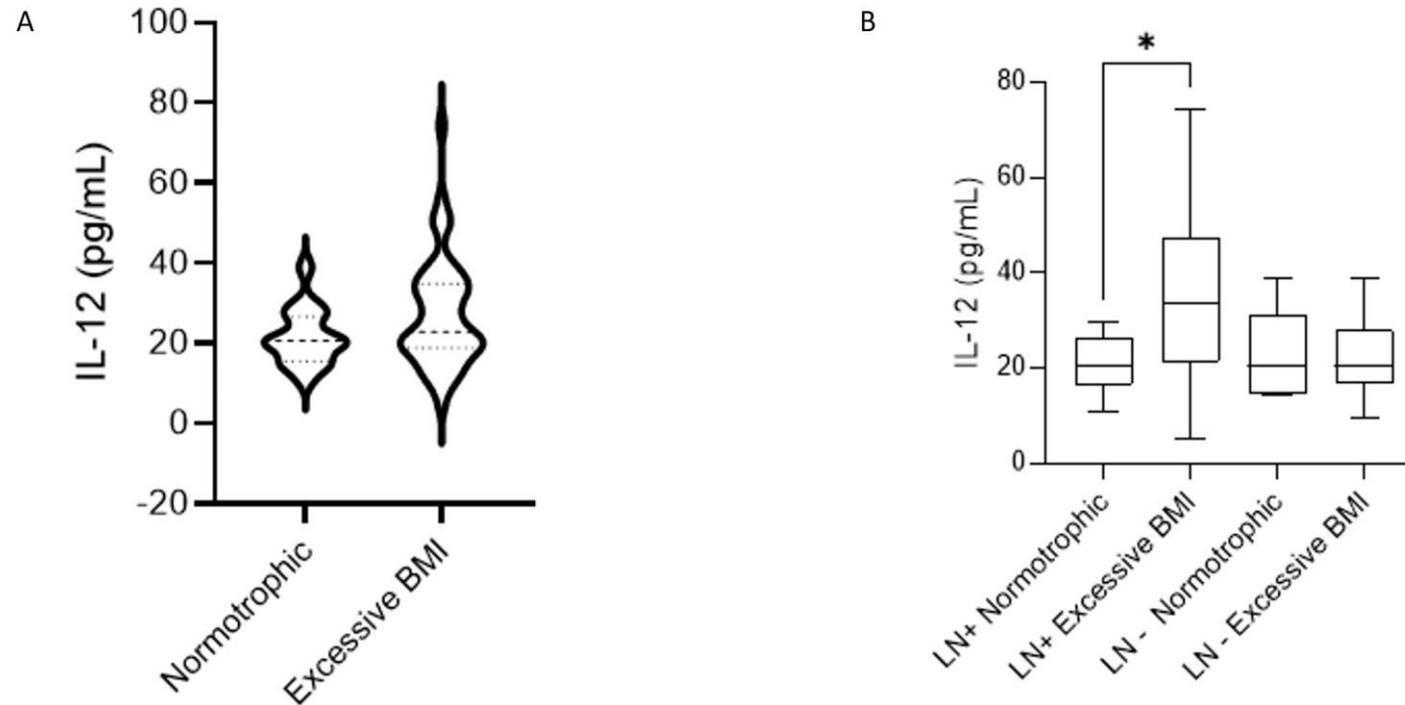


Figure 3 – Plasma levels of interleukin 12 (IL-12) in patients with breast cancer distributed according to BMI categories and clinicopathological parameters. In A, overall IL-12 levels according to BMI categorization as eutrophic or overweight. In B, distribution of levels according to the presence of metastases in lymph nodes (LN). * indicates statistical difference.

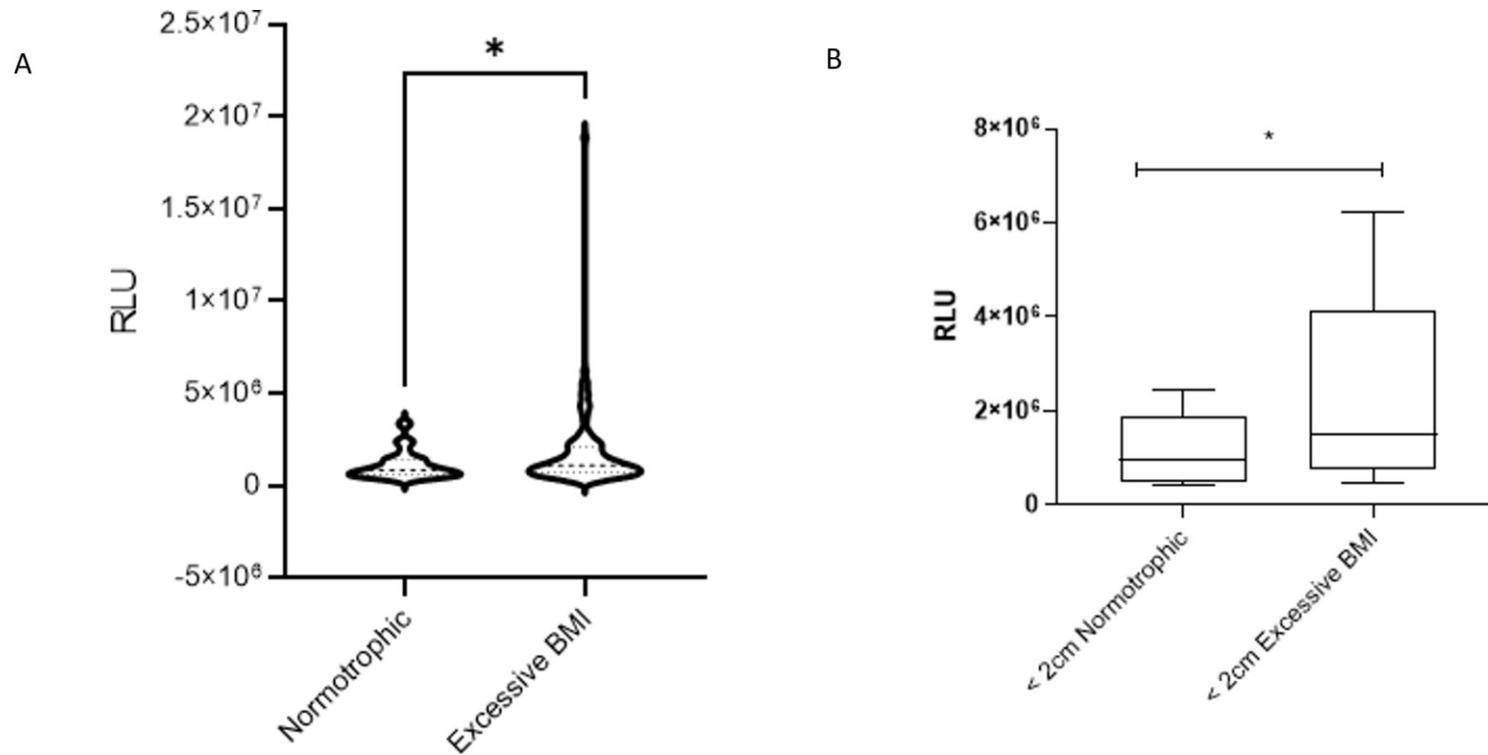


Figure 4– Plasma levels of hydroperoxides in patients with breast cancer distributed according to BMI categories and clinicopathological parameters. In A, overall of hydroperoxides levels according to BMI categorization as eutrophic or overweight. In B, distribution of levels according to tumor size. RLU = integral of the area under the curve measured in relative units of light. * indicates statistical difference.

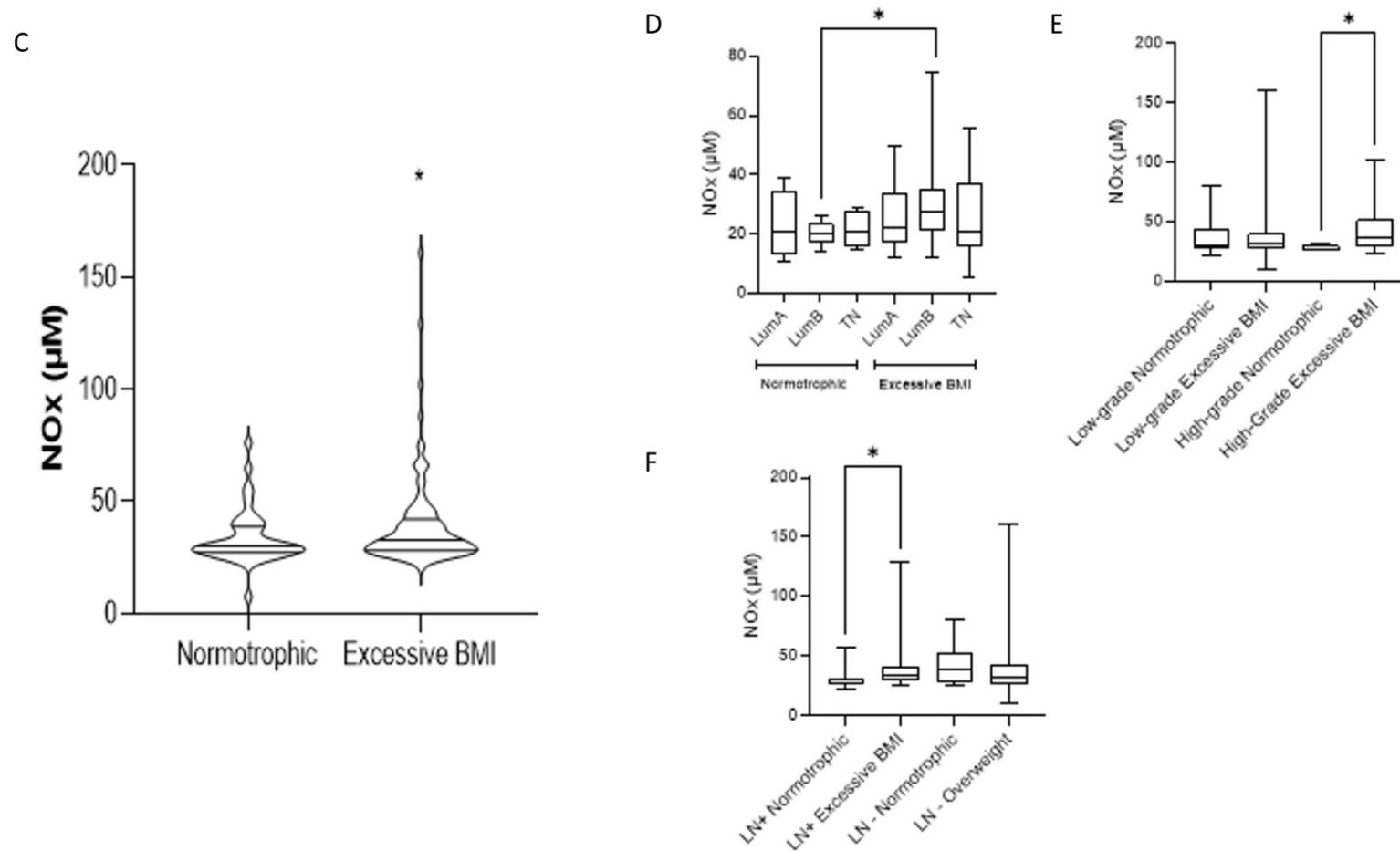


Figure 4 – Plasma levels of nitric oxide (NOx) metabolites in patients with breast cancer distributed according to BMI categories and clinicopathological parameters. In C, general NOx levels according to BMI categorization as eutrophic or overweight. In D, distribution of levels according to molecular subtype. In E, comparison of NOx levels according to histological grade. In F, NOx levels according to the presence of metaplastases in the lymph nodes (LN). LumA = luminal A, LumB = luminal B, TN = triple negative. * indicates statistical difference.

Table 2. iNOS, TGF- β 1, CD4 + T lymphocytes and CD8 + T lymphocytes profiles in tumorbiopsies from normal and excess body weight breast cancer patients.

Marker	Normal BMI	Excessive BMI	Fisher's P value
iNOS	66%	90%	< 0.001*
TGF- β 1	68%	70%	>0.999
CD4 + T lymphocytes	20%	34%	0.0378*
CD8+ T lymphocytes	25%	32%	0.2146

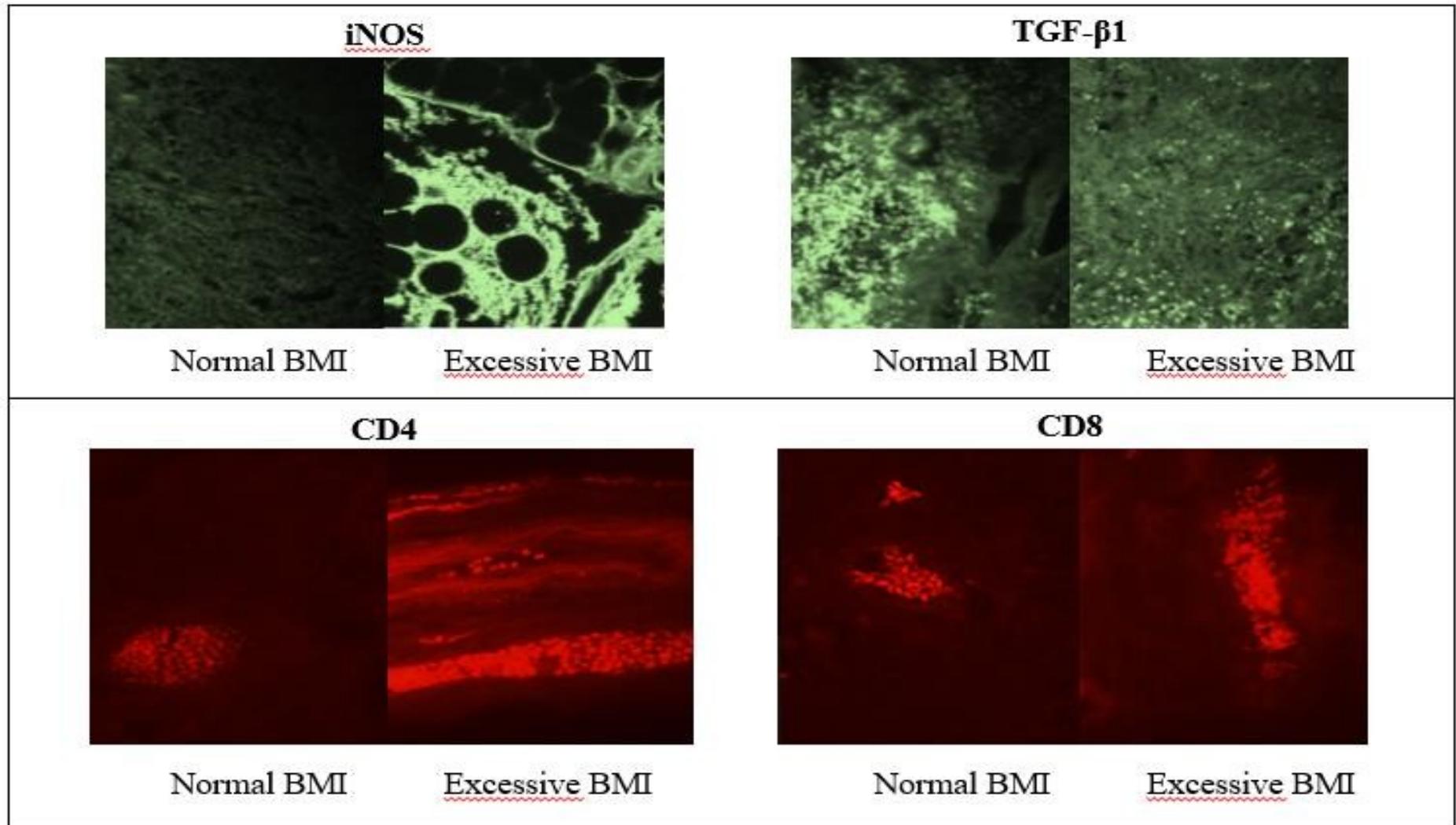


Figure 5 - iNOS, TGF-β1, CD4 + T lymphocytes and CD8 + T lymphocytes expression profile in tumor biopsies from normal and excess body weight breast cancer patients. iNOs = inducible nitric oxide synthase, TGF-β1 = transforming growth factor beta 1, CD4 = CD4+ T lymphocytes, CD8 = CD8+ T lymphocytes, BMI = body mass index

REFERENCES

- 1) IARC - International Agency For Research On Cancer. Cancer today. Lyon: WHO, 2020.
- 2) The American Cancer Society. The Cancer Atlas: Body weight, physical activity, diet & alcohol. Atlanta, USA: The American Cancer Society, 2021.
- 3) RAMAN, R. et al. Effect of body mass index- and actual weight-based neoadjuvant chemotherapy doses on pathologic complete response in operable breast cancer. Clin Breast Cancer, Dallas, n.16, v. 6, p. 480–486, Dec. 2016.
- 4) VAYSSE, C.; MULLER C.; FALLONE F. Obesity: an heavyweight player in breast cancer's chemoresistance. Oncotarget, Albany, v. 10, p. 3207-3208, May 2019.
- 5) KAWAI, M. et al. Body mass index and survival after breast cancer diagnosis in Japanese women. BMC Cancer, London, n. 12, v. 149, Apr. 2012.
- 6) EWERTZ, M. et al. Effect of obesity on prognosis after early-stage breast cancer. J Clin Oncol, New York, v. 29, n. 1, p. 25-31, Jan. 2011.
- 7) HAO, S. et al. Overweight as a Prognostic Factor for Triple-Negative Breast Cancers in Chinese Women. PLoS One, San Francisco, v. 10, n. 6, e0129741, June 2015.
- 8) PROTANI, M.; COORY, M.; MARTIN, J.H. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. Breast Cancer Res Treat, Dordrecht, v. 123, n. 3, p. 627–635, Oct. 2010.
- 9) CHAN, D. S. M. et al. Body mass index and survival in women with breast cancersystematic literature review and meta-analysis of 82 follow-up studies. Ann Oncol, London, v. 25, n. 10, p.1901-1914, Oct. 2014.

- 10) BIGLIA, N. et al. Body mass index (BMI) and breast cancer: impact on tumor histopathologic features, cancer subtypes and recurrence rate in pre and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*, London, n. 29, v. 3, p. 263-267, mar. 2013.
- 11) BARONE, I. et al. The weight of obesity in breast cancer progression and metastasis: Clinical and molecular perspectives. *Semin Cancer Biol*, London, v. 60, p. 274-284, Feb. 2020.
- 12) PANG, Y.; WEI, Y.; KARTSONAKI, C. Associations of adiposity and weight change with recurrence and survival in breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer*, Tokyo, n. 29, v. 4, p. 575-588, July 2022.
- 13) AVGERINOS K.I. et al. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*, v. 92. P. 121-135. Mar. 2019.
- 14) CRUJEIRAS, A. B. et al. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: A potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. *Free Radic Res*, Yverdon, v. 47, p. 243-256, Apr. 2013.
- 15) BHARDWAJ, P; & BROWN, K. A. Obese Adipose Tissue as a Driver of Breast Cancer Growth and Development: Update and Emerging Evidence. *Front Oncol*, Lausanne, v. 11, Mar. 2021.
- 16) RECH, D. et al. Clinicopathological correlation between trophic-adipose levels and poor prognosis outcomes in Brazilian women diagnosed with breast cancer. *Brazilian Journal of Oncology*, São Paulo, v. 17, Sep. 2021.
- 17) OLEFSKY, J. M. & GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*, Palo Alto, v. 72, p.219-246, Oct. 2010.
- 18) ZHANG, C. et al. STAT3 Activation-Induced Fatty Acid Oxidation in CD8⁺ T Effector Cells Is Critical for Obesity-Promoted Breast Tumor Growth. *Cell Metab*, Cambridge, v. 31, n. 1, p. 148-161, Jan. 2020.

- 19) WANG, Z. et al. Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade. *Nat Med, New York*, v. 25, n. 1, p. 141-151, Jan. 2019.
- 20) GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol, London*, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, Aug. 2011.
- 21) GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*, v.10, p. 93–100, 1991.
- 22) PANIS C, et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* v. 133(1). P.89-97. May.2012.
- 23) BASU, A. et al. Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol, Lausanne*, v.12, e669474, May 2021.
- 24) MCLAUGHLIN, T., et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J Clin Invest.* v.3. p.5-13. Jan. 2017.
- 25) PACCAGNELLA, M. et al. Circulating Cytokines in Metastatic Breast Cancer Patients Select Different Prognostic Groups and Patients Who Might Benefit from Treatment beyond Progression. *Vaccines (Basel), Basel*, v. 10, n. 1, p.78, Jan. 2022.
- 26) ABEEN, S. et al. Noninvasive profiling of serum cytokines in breast cancer patients and clinicopathological characteristics. *Oncoimmunology, Philadelphia*, v. 8. Nov. 2018.
- 27) TZANG. B. S. et al. Differential associations of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines with depression severity from noncancer status to breast cancer course and subsequent chemotherapy. *BMC Cancer, London*, v. 20, n. 1, e686, July 2020.

- 28) SAVAS P, SALGADO R, DENKERT C, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(4):228-241. doi:10.1038/nrclinonc.2015.215
- 29) OSTRAND-ROSENBERG S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Feb;18(1):11-8. doi: 10.1016/j.gde.2007.12.007. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18308558; PMCID: PMC2699403.
- 30) NÚÑEZ-RUIZ A, et al. Obesity modulates the immune macroenvironment associated with breast cancer development. *PLoS One.* 2022 Apr 26;17(4):e0266827. doi: 10.1371/journal.pone.0266827. PMID: 35472214; PMCID: PMC9041840.
- 31) ELISIA, INGRID et al. “Exploratory examination of inflammation state, immune response and blood cell composition in a human obese cohort to identify potential markers predicting cancer risk.” *PloS one* vol. 15,2 e0228633. 6 Feb. 2020, doi:10.1371/journal.pone.0228633
- 32) ASAD S, DAMICIS A, HENG YJ, et al. Association of body mass index and inflammatory dietary pattern with breast cancer pathologic and genomic immunophenotype in the nurses' health study. *Breast Cancer Res.* 2022;24(1):78. Published 2022 Nov 14. doi:10.1186/s13058-022-01573-5.
- 33) MADEDDU C., et al. Role of inflammation and oxidative stress in postmenopausal oestrogen-dependent breast cancer. *J Cell Mol Med.* v.18 (12). p.2519-2529. Dec. 2014.
- 34) CHANG, C.F.; DIERS, A.R.; HOGG, N. Cancer cell metabolism and the modulating effects of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* v.79. p.324-3620. Feb.15.
- 35) SOMASUNDARAM, V., et al. Inducible nitric oxide synthase-derived extracellular nitric oxide flux regulates proinflammatory responses at the single cell level. *Redox Biol.*v.28. Jan. 2020.

Conflict of interest statement: The authors have no conflict to declare.

Ethics statement: The Institutional Ethics Committee approved this proposal under CAAE 35524814.4.0000.0107, opinion n° 810.501. All patients included signed the informed consent terms.

Author agreement: All authors agreed to the manuscript submission.

6. ANEXOS

Anexo I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mapeamento do câncer de mama familiar no Sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática: Versão: 1 CAAE: 35524814.4.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 810.501 Data da Relatoria: 25/09/2014

Apresentação do Projeto: Neste estudo pretende-se avaliar todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), em um período de 48 meses. A partir da análise de anotações em prontuários serão selecionadas para investigação dos genes de interesse aquelas mulheres com história de câncer de mama familiar com ou sem exposição ocupacional à agrotóxicos. Atende aos requisitos teóricos metodológicos e éticos. Objetivo da Pesquisa: Mapear os casos de câncer de mama familiar na região Sudoeste do Paraná e identificar possível associação a exposição ocupacional à agrotóxicos. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos diretos aos sujeitos, uma vez que serão estudados materiais coletados durante cirurgias oncológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Relevante para a área de oncologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos apresentados.

Recomendações: Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências. Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado. O projeto não necessita adequações. CASCVEL, 29 de setembro de 2014.

Assinado por: João Fernando Christofolletti (Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIA Bairro: UNIVERSITARIO CEP: 85.819-110 UF: PR

Município: CASCVEL Telefone: (45)3220-3272 E-mail: cep.prppg@unioeste.br

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do Projeto: Mapeamento do câncer de mama familiar no Sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos. Pesquisador responsável: Prof^a Dr^a CAROLINA PANIS – Telefones (43)99165316 e (46) 30571079 Convidamos você a participar de nossa pesquisa que tem o objetivo de identificar os casos de câncer de mama em mulheres que tem história da doença na família, que moram na região Sudoeste do Paraná. Para isso será realizada a coleta de um tubo de sangue (10 mL) e um tubo de saliva (1 mL) para fazer os exames necessários para identificar porque alguns tumores de mama levam à doenças tão agressivas. Durante a execução do projeto também vamos precisar de uma parte do tecido tumoral que o médico irá remover durante a sua cirurgia ou que foi coletado para o diagnóstico da doença (na biópsia). Também precisaremos consultar o prontuário médico, para saber informações sobre sua saúde e sua ocupação de trabalho. Para algum questionamento, dúvida ou relato de algum acontecimento os pesquisadores poderão ser contatados a qualquer momento, pelos telefones (43)99165316 e (46) 30553026. Estamos disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas, a qualquer momento. Desta forma, você está contribuindo para a identificação de fatores que levam à alta incidência de cânceres agressivos na nossa região. Este termo será entregue em duas vias, sendo que uma ficará com você. Você não pagará nem receberá para participar do estudo. Seus dados serão mantidos em sigilo, ou seja, ninguém além dos pesquisadores terá acesso ao material ou informações coletadas. Estes dados serão utilizados somente para fins científicos. Você poderá cancelar sua participação a qualquer momento. Se necessitar de maiores informações, o telefone do comitê de ética é 3220-3272 e da pesquisadora responsável é 46 30553026. A coleta de material será feita dentro do Ceonc, portanto qualquer imprevisto será resolvido imediatamente no local. Ao término do projeto, se a pesquisa identificar que a sua doença se classifica como câncer familiar, você será chamado ao Ceonc para receber esclarecimentos sobre como proceder no acompanhamento da doença nos próximos anos.

Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto. Nome do sujeito de pesquisa ou responsável:

Assinatura:

CPF:

Eu, declaro que forneci todas as informações do projeto ao participante e/ou responsável.

ANEXO III – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

BREAST CANCER.

Dear Dr PANIS,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Obesity Research & Clinical Practice. It has been assigned the following manuscript number: ORCP-D-23-00003.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/orcp/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Obesity Research & Clinical Practice

More information and support

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

#AU_ORCP#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

Anexo IV – Normas da Revista

OBESITY RESEARCH & CLINICAL PRACTICE

Indexed by PubMed, Medline, and Scopus



Article Types

Submitted papers taking heed of the following points will be considered for peer review
 Novelty significant new knowledge that resolves a controversy, shifts a paradigm or impacts on clinical care. Scientific rigour - including following the relevant guidelines: Consort, Strobe, Save etc. People first language Ethical standards need to be met, with funding source and conflicts adequately declared Pilot studies, considered worthy of publication after desk review, will be returned to Authors with a request to resubmit as a Research Letter before being sent for further review. Research Letters will undergo a rapid review and publication time. To increase the usefulness of Obesity Research & Clinical Practice to the readership, submissions in the following categories will be deemed appropriate for consideration by the Editors and Editorial Board:

Original Research Articles: Maximum of 3500 words applied to manuscript text only. Maximum of 5 tables/figures and 35 references. Divide the manuscript into the following sections: Title Page; Structured Abstract; Introduction; Subjects, Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; figures and tables with legends.

Article structure Subdivision - numbered sections: Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Introduction State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Material and methods Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method,

use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described. Results Results should be clear and concise. Discussion This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name (s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights: Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should be submitted in a separate editable file in

the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured Abstract: Original Research Articles An abstract of no more than 250 words for articles (including reviews), or 50 to 100 words for brief communications, should be typed double-spaced on a separate page. It should cover the main factual points, including statements of the problem, methods, results and conclusions.

Keywords: Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements: All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance. **Formatting of funding sources** List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: **Funding:** This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa]. It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in

the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page (s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice-versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet

formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author (s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Authorship

The Corresponding Author must submit a completed Author Consent Form to ORCP with their manuscript. All authors must sign the Author Consent Form. All authors

should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.