

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

LAUREN TRITINAGLIA

**IMUNOSSENCÊNCIA EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA EXPOSTAS A MAUS
TRATOS NA INFÂNCIA**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

LAUREN TRINTINAGLIA

**IMUNOSSENEESCÊNCIA EM MULHERES COM CÂNCER DE
MAMA EXPOSTAS A MAUS TRATOS NA INFÂNCIA**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós- Graduação em
Gerontologia Biomédica da
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul como requisito
para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer

Porto Alegre

2018

Ficha Catalográfica

T833i Trintinaglia, Lauren

Imunossenescência em mulheres com câncer de mama expostas a maus tratos na infância / Lauren Trintinaglia . – 2018.

77 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer.

1. Maus tratos na infância. 2. Câncer de mama. 3. Imunossenescência. 4. Linfócitos T. I. Bauer, Moisés Evandro. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

LAUREN TRINTINAGLIA

**IMUNOSSENESCÊNCIA EM MULHERES COM CÂNCER DE
MAMA EXPOSTAS A MAUS TRATOS NA INFÂNCIA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Cristina Bonorino

Prof. Denise Cantarelli Machado

Prof. Dr. Moisés Evandro Bauer

Porto Alegre

2018

DEDICATÓRIA

A todos.

*Não apenas pela ajuda prestada,
mas, acima de tudo, pela companhia.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Itamar e Sirlei Trintinaglia, por permitirem estudar, exercer e aprimorar aquilo que me completa.

A minha dinda Salete e meu irmão Gabriel, que sempre me ajudaram à sua maneira.

A Fernando Delazeri, meu porto seguro.

Ao professor Moisés Evandro Bauer por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e pelo conhecimento adquirido.

Aos meus colegas de laboratório Laura Esteves Petersen, Jaqueline Boher Schuch, Giselle Funchal, Talita Baptista, Carine Hartmann, Marcelo Anzolin e Julia Motta. Vocês são extraordinários.

Ao setor de hematologia do laboratório Weinmann, pela torcida constante.

Aos amigos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista.

A CAPES pela bolsa concedida.

Minha gratidão.

“Talent is luck. The important thing in life is courage.”

(Woody Allen)

RESUMO

Introdução: Indivíduos que foram expostos a maus tratos na infância apresentam um perfil de sensibilidade ao estresse mais acentuado, quando comparado a aqueles que cresceram em um ambiente adequado. Esse perfil está relacionado com a desregulação do sistema imunológico, sendo caracterizado pela presença de um aumento de marcadores de senescência celular e reativações de infecções virais latentes. O acontecimento de novas experiências traumáticas, como o diagnóstico do câncer de mama, pode acarretar em um aumento dos níveis relacionados ao estresse, provocando alterações imunológicas importantes. Nesse estudo nós investigamos a presença de marcadores de imunossenescência em mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama com ou sem histórico de câncer de mama. **Métodos:** Vinte e nove pacientes recém diagnosticadas com câncer de mama foram recrutadas para esse estudo, sendo que quinze mulheres reportaram presença de maus tratos na infância (CM+), enquanto quatorze não vivenciaram situações envolvendo abuso ou negligência nesse mesmo período (CM-). Para compor o grupo controle, foram selecionadas vinte e sete mulheres sem câncer de mama e que negaram a presença de maus tratos. Os linfócitos foram isolados das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), e imunofenotipados por citometria de fluxo para investigar a presença dos seguintes subgrupos: células B, CD4+, CD8+, células NK, células T ativadas, células T reguladoras, células T recém diferenciadas, células T intermediárias, células T senescentes e com perfil de exaustão. A sorologia IgG para citomegalovírus (CMV) foi realizada através do método ELISA. **Resultados:** Os grupos CM+ e CM- não apresentaram diferenças significativas em relação ao estadiamento da doença ou histórico familiar. Nas subpopulações de linfócitos encontramos uma redução significativa de células T recém diferenciadas ($p < 0.0001$), nos grupos CM+ e CM-, enquanto células T intermediárias ($p < 0.0001$), senescentes ($p < 0.0001$) e de exaustão ($p < 0.0001$) apresentaram-se aumentadas nos mesmos grupos. Ao analisar a média da intensidade de fluorescência (MFI) encontramos uma expressão diminuída de CD27 em células T CD4 nos controles quando comparado as mulheres com câncer de mama expostas e não expostas a maus tratos ($p = 0.002$). Não observamos diferenças entre os

grupos CM+ e CM- em relação a sorologia IgG para citomegalovírus entre os grupos CM + e CM - ($p=0.24$), entretanto foi presenciado entre os controles e indivíduos com maus tratos ($p= 0.008$). Conclusão: nossos achados sugerem que a presença de maus tratos não está diretamente associada com um perfil de imunossenescência em mulheres recém diagnosticada com câncer de mama. Entretanto, quando avaliamos mulheres com câncer de mama e indivíduos saudáveis esse perfil senescente torna-se evidente. Logo, torna-se necessário a realização de novos estudos para explorar o impacto da presença de marcadores de senescência no tratamento e prognóstico do câncer de mama.

Palavras-Chaves: Maus tratos na infância, Câncer de mama, Imunossenescência, Linfócitos T.

ABSTRACT

Introduction: Individuals who have experienced childhood maltreatment (CM) present a higher sensitive profile to stress. This profile have been associated with dysregulation of the immune system, characterized by reactivation of herpesvirus and increased cellular senescence markers. New traumatic or stressful experiences, such as breast cancer diagnosis, in those sensitized individuals can trigger an increase in stress levels possibly leading to important immunological changes. Here we investigate the presence of immunosenescence markers in women newly diagnosed with breast cancer with and without history of CM. **Methods:** Twenty-nine women newly diagnosed with breast cancer, without start the treatment, were recruited. Fifteen with history of CM (CM+) and fourteen without history of CM (CM-). Twenty-seven women without breast cancer and CM were selected as the control group. Peripheral blood was assessed by lymphocyte subsets by flow cytometry (B cells, CD4+, CD8+, NK cells, activated T cell, regulatory T cell, early and intermediated T cell, senescent and exhaustion T cells. CMV serology was determinate by ELISA method. **Results:** The groups CM+ and CM- present similar cancer stage and family history of breast cancer. In peripheral lymphocyte subpopulations we found significantly reduced Early-differentiated T cell ($p < 0.0001$), while intermediate-differentiated T cell ($p < 0.0001$), senescence T cell ($p < 0.0001$) and exhaustion t cells ($p < 0.0001$) were increased in CM+ and CM- patients. The mean fluorescent intensity (MFI) was analyzed and the CD27 expression on CD4 T cells was found lower in controls as compared to CM+ and CM- groups ($p = 0.002$). There was no difference of CMV IgG levels between CM + and CM- groups ($p = 0.24$), but between controls and CM groups, this association becomes significant ($p = 0.008$). **Conclusion:** Our findings suggest that the presence of CM is not directly related with immunosenescence in women newly diagnosed with breast cancer. However, when evaluated women with breast cancer and healthy controls, this senescent profile is evident. Future longitudinal studies are necessary to explore the role of senescent cells in the disease progression and treatment response.

Key Words: Childhood Maltreatment; Breast Cancer; Immunosenescence; Cytomegalovirus; T Lymphocytes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Maus Tratos na Infância	16
2.2 Maus Tratos na Infância e Estresse Crônico	16
2.3 Câncer	19
2.4 Câncer de Mama	20
2.5 Maus Tratos na Infância e Câncer de Mama	20
2.6 Imunossenescência	23
2.7 Citomegalovírus	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivo Específicos	27
4 MÉTODOS	28
4.1 Sujeitos.....	28
4.2 Coleta de sangue periférico e isolamento das células mononucleares (PBMCs).....	29
4.3 Imunofenotipagem	29
4.4 Sorologia para Citomegalovírus.....	30
4.5 Análise de Estatística	30
4.6 Considerações Éticas.....	31
5 ARTIGO CIENTÍFICO	32
Abstract	34
INTRODUCTION.....	35
MATERIALS AND METHODS.....	35
Subjects	35
Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).....	36
Immunophenotyping	36
CMV serology	36
Statistical analyses	37
Results	37
Sociodemographic and clinical characteristics.....	37
Major lymphocyte subsets.....	37
Lymphocyte subsets with senescence profile.....	38
Expression levels of cell-surface markers	38
Influence of CMV on antibody titers	38

Discussion.....	39
References	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
7 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS E APÊNDICES	63

1 INTRODUÇÃO

A exposição a um evento estressor nos primeiros anos do desenvolvimento infantil pode acarretar em distúrbios psicossociais e em um maior acometimento por patologias crônicas na vida adulta (Fagundes, Glaser e Kiecolt-Glaser, 2013; Coelho *et al.*, 2014), ocasionando assim, um perfil de vulnerabilidade quando comparado a indivíduos que cresceram em um ambiente adequado (Crosswell *et al.*, 2014). Dessa forma, a presença desse estresse precoce é capaz de alterar distintos sistemas, entre eles o imunológico, neurológico e endocrinológico, sendo necessários estudos para avaliação do impacto desse agente estressor nessas populações adultas específicas (Bower *et al.*, 2014).

A presença de situações relacionadas a maus tratos no período de desenvolvimento infantil pode acarretar em alterações cerebrais relacionadas ao estresse, originando assim uma sensibilidade mais exacerbada a agentes estressores (Fagundes, Glaser e Kiecolt-Glaser, 2013; Mcfarland *et al.*, 2016), fazendo com que ocorra reações mais acentuadas a situações específicas que podem ocasionar em uma má adaptação a condição na qual o indivíduo se encontra. Assim, adultos que apresentaram traumas nos primeiros anos de vida, quando confrontados com novas experiências traumáticas apresentam um maior risco de sofrimento psicológico e desenvolvimento de patologias relacionadas (Goldsmith *et al.*, 2010; Fagundes *et al.*, 2012). Além disso, observa-se a negligência de condições de hábitos saudáveis nessa população, relacionando-se com padrões de sono anormais, má nutrição, atividade física deficiente e consumo elevado de álcool e tabaco (Fagundes, Glaser e Kiecolt-Glaser, 2013). Dessa forma, por se apresentarem mais psicologicamente e fisicamente sensíveis a condições de estresse, esses indivíduos possuem menos habilidades sociais e emocionais para o estabelecimento de relações significativas de apoio para auxiliá-los a lidar com situações estressantes ocorridas na idade adulta (Fagundes, Glaser e Kiecolt-Glaser, 2013).

A presença de um perfil mais sensível ao estresse em adultos que sofreram alguma adversidade precoce pode estar associada com o surgimento de maior risco de desregulação do sistema imunológico (Morey *et al.*, 2015), acarretando no aumento de citocinas pró inflamatórias, respostas a infecções virais latentes, além de estimular o processo de imunossenescência (Crosswell *et al.*, 2014).

Devido à presença desses fatores, a presença de maus tratos na infância pode estar relacionada com o desenvolvimento de casos oncológicos, assim como, situações de prognóstico insatisfatório (Crosswell *et al.*, 2014). Logo, devido a presença desse estado pró-inflamatório que pode persistir durante toda a vida do indivíduo, podemos associar que a ocorrência de um estresse crônico na infância pode afetar o sistema imune de uma maneira similar aos efeitos observados na idade cronológica, agindo assim constantemente no processo de aceleração do envelhecimento imunológico. Dessa forma, o presente estudo apresenta o objetivo de avaliar a presença de marcadores de imunossenescência em mulheres com câncer de mama que foram expostas a maus tratos na infância.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Maus Tratos na Infância

A presença de maus tratos no período da infância pode ser resultante da ocorrência de atos de omissão ou agressividade exercidos pelos responsáveis do menor e tendem a resultar em danos significativos para a saúde da criança (Coelho *et al.*, 2014). Esses atos abrangem casos de abuso físico, que podem resultar em contusões, fraturas, queimaduras e até morte, abuso sexual e abuso emocional, que se refere a situações de humilhação, insultos e ameaças vivenciadas pela criança (Ramiro *et al.*, 2010). Além disso, atitudes relacionadas a negligência física, na qual as necessidades básicas, como alimentação, vestuário e higiene pessoal do menor de idade não são supridas e a negligência emocional, na qual a criança sofre privação de afeto, são consideradas formas de maus tratos infantis (Cohen *et al.*, 2017).

As situações que envolvem casos de abuso e negligência geralmente não ocorrem como incidentes únicos, mas com frequência e além disso, esses indivíduos tendem a ser expostos a diversas modalidades de maus tratos (Ramiro *et al.*, 2010). Dessa maneira, percebe-se que a vivência dessas situações de estresse crônico nos primeiros anos de desenvolvimento pode induzir um perfil de suscetibilidade a doenças, assim como alterações comportamentais, tornando-se um problema de saúde pública (Ramiro *et al.*, 2010; Kelly-Irving *et al.*, 2013; Bower *et al.*, 2014)

2.2 Maus Tratos na Infância e Estresse Crônico

Podemos perceber que situações que acarretam estresse estão frequentemente presentes no cotidiano de inúmeras pessoas. Entretanto, a maneira em que esses indivíduos reagem a esses acontecimentos tendem a se apresentar de forma distinta, levando em consideração, por exemplo, eventos ocorridos previamente e a capacidade de resiliência mediante a esse agente estressor (Gunnar e Quevedo, 2007). Dessa forma,

quando observado do ponto de vista biológico, situações de estresse abrangem a ativação de distintos sistemas necessários para a sobrevivência nessas circunstâncias, porém a estimulação constante desses mecanismos tende a acarretar no aparecimento de patologias crônicas e distúrbios psicológicos (Gunnar e Quevedo, 2007; Nusslock e Miller, 2016). Logo, crianças que foram expostas a situações de estresse crônico, como maus tratos, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, asma, transtorno bipolar, depressão e câncer quando adultos (Gunnar e Quevedo, 2007; Berens *et al.*, 2017; Elwenspoek *et al.*, 2017).

As respostas a agentes estressores, em mamíferos, estão associadas a dois sistemas distintos, porém interligados: o sistema nervoso simpático e *eixo* hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (Gunnar e Quevedo, 2007). O sistema nervoso simpático faz parte do sistema nervoso autônomo, e está envolvido com a estimulação simpática das glândulas adrenais, acarretando na produção de catecolaminas que realizam a mobilização de recursos metabólicos e a resposta de “luta ou fuga” (Gunnar e Quevedo, 2007; Nusslock e Miller, 2016; Berens *et al.*, 2017). Entretanto, o eixo HPA é caracterizado pela produção de glicocorticoides (cortisol) através da estimulação do córtex adrenal. Dessa forma, esse processo é caracterizado pela liberação do fator de liberação da corticotropina (CRF) e da arginina vasopressina (AVP) pelas células neurosecretoras do núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo na microcirculação porta da hipófise. Na adeno-hipófise, ou hipófise anterior, elas estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Este último promove, no córtex supra-renal, a liberação do cortisol. O cortisol apresenta funções centrais e periféricas mediadas via dois tipos de receptores específicos: receptor mineralocorticoide e receptor glicocorticóide (Gunnar e Quevedo, 2007; Nusslock e Miller, 2016). Logo, a regulação do sistema nervoso simpático e o eixo HPA convergem a nível do hipotálamo, que integra funções endócrinas e autônomas com comportamento (Gunnar e Quevedo, 2007; Nusslock e Miller, 2016; Danese e Baldwin, 2017)

Adultos que sofreram condições de estresse crônico nos primeiros anos de desenvolvimento tendem a apresentar alterações em sistemas envolvidos na regulação do estresse, como o eixo HPA, acarretando na alteração da síntese de glicocorticoides, que assim como as catecolaminas, são moduladores de inflamação. Além disso, esse trauma ocorrido no período da infância pode influenciar no desenvolvimento do sistema imunológico promovendo um aumento da resposta inflamatória que pode persistir até a idade adulta (Gunnar e Quevedo, 2007; Danese e Baldwin, 2017)

O aparecimento de uma resposta inflamatória a processos de infecções de fase aguda ou outras patologias é crítico para a sobrevivência (Ehrlich *et al.*, 2016). Portanto, como consequência, essa resposta é iniciada com a ativação das células no sistema imune inato, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células natural killers, além de ser caracterizada pela dilatação de vasos e aumento da pressão sanguínea, assim como, infiltração tecidual por células imunes e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Gunnar e Quevedo, 2007). Entretanto, apesar dessa resposta ser efetiva, ela necessita ser regulada adequadamente para que não ocorra danos ao indivíduo. Logo, uma resposta inflamatória não controlada ou hiperativa pode ocasionar no surgimento de um status de inflamação crônica de baixo grau ou “*inflammaging*”, que tem sido associada ao processo de envelhecimento e extremamente relacionada a indivíduos que sofreram maus tratos na infância (Bauer *et al.*, 2015). Além disso, esse período de estresse crônico infantil pode impactar o sistema imunológico de outra maneira, através da suscetibilidade a infecções, pois crianças que vivenciam a experiência de negligência e abuso tendem a sofrer lesões e estar mais expostas a distintos patógenos, ocasionando assim a presença de infecções virais latentes, que atuam no processo de inflamação e na resposta imune humoral (Berens *et al.*, 2017; Danese e Baldwin, 2017).

A ativação constante do sistema imunológico e das vias relacionadas ao estresse nos primeiros anos de vida podem influenciar diretamente no desenvolvimento cerebral e comportamental desses indivíduos (Danese e Baldwin, 2017). A presença de uma prevalência elevada de distúrbios relacionados a consumo de álcool e tabagismo, assim como condições anormais de sono e alimentação, podem estar relacionadas a alterações nos sistemas de recompensa e a presença desses hábitos pode contribuir significativamente para manutenção do estado de inflamação crônica (Gunnar e Quevedo, 2007; Nusslock e Miller, 2016; Danese e Baldwin, 2017). Dessa maneira, podemos associar a exposição a maus tratos na infância com alterações envolvendo os sistemas endócrino, neuronal e a presença de um estado de inflamação crônica, que podem acarretar no aparecimento de distintas doenças, entre elas o câncer, que ao ser influenciado por esses fatores, pode promover seu crescimento, migração, capacidade de invasão e angiogênese (Berens *et al.*, 2017).

2.3 Câncer

O sistema imune apresenta três funções básicas na prevenção de formação de tumores. A primeira baseia-se na eliminação ou supressão de infecção virais, impedindo assim a gênese de tumores induzidos por vírus. A segunda função corresponde ao processo de eliminação de patógenos e controle da resposta inflamatória, evitando a formação de um ambiente propício para a tumorigênese, logo, a terceira fundamenta-se na possibilidade do sistema imune identificar e eliminar as células cancerosas através da expressão de antígenos específicos (Malaguarnera *et al.*, 2010).

A terceira função está relacionada com um processo de vigilância imunológica, na qual o sistema imune identifica as células cancerosas e as elimina antes que haja danos, entretanto, mesmo ocorrendo esse processo observa-se a formação de tumores na presença de um sistema imunológico funcional. Esse acontecimento pode estar relacionado, primeiramente, por uma deficiência na eliminação íntegra das células oncogênicas. Dessa forma, observa-se um estado de equilíbrio entre o sistema imunológico e o tumor, que continua a sua evolução lentamente acumulando mutações gênicas, sendo que suas células mais imunogênicas são eliminadas por linfócitos T, enquanto os clones resistentes permanecem. Logo, esse processo acarreta no escape do tumor, sendo nessa fase o sistema imunológico não é capaz de conter o crescimento tumoral (Swann e Smyth, 2007; Malaguarnera *et al.*, 2010; Jiang e Shapiro, 2014; Cimino-Mathews *et al.*, 2015).

Entretanto, quando avaliados esses processos em idosos pode-se perceber que a maioria dos componentes relacionados a imunidade estão alterados. As células apresentadoras de antígenos (APC) não apresentam eficácia satisfatória e as células CD4 e CD8 são susceptíveis a imunossenescência (Pawelec *et al.*, 2010; Jiang e Shapiro, 2014). Logo, percebe-se que algumas dessas alterações observadas em idosos têm sido relatadas em pacientes oncológicos com idades não avançadas (Pawelec *et al.*, 2010). Dessa forma, é concebível o conceito de que a presença de imunossenescência pode ser um fator adicional que auxilia a promover o mecanismo de escape do tumor (Malaguarnera *et al.*, 2010).

Quando avaliado o efeito do estresse sobre o processo de oncogênese pode-se sugerir que a presença de agentes estressores podem acarretar no processo de formação

ou progressão de tumores por causa da sua associação com o processo de desregulação do sistema imunológico (Swann e Smyth, 2007), assim como a sua associação com a via endocrinológica relacionada com a liberação de catecolaminas e cortisol que influenciam o crescimento tumoral (Andersen *et al.*, 1994; Malaguarnera *et al.*, 2001; Malaguarnera *et al.*, 2010).

2.4 Câncer de Mama

Estima-se o aparecimento de mais de 20 milhões de casos de câncer na população mundial para 2025, sendo que a incidência atual corresponde principalmente aos tipos como pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Tratando-se especificamente do sexo feminino, as maiores frequências encontradas recentemente foram relacionadas a neoplasia de mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo de útero (7,9%) e estômago (4,8%) (INCA, 2016).

Em relação ao Brasil, em 2016 foram esperados aproximadamente 57.960 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Dessa forma, desconsiderando os tumores de pele classificados como não melanoma, essa patologia é estimada como a mais frequente em mulheres da Região Sul, sendo previstos para o ano de 2016, 5.210 novos casos no Rio Grande do Sul e 1.140 casos apenas na capital, Porto Alegre (INCA, 2016). Considerado um câncer relativamente raro antes dos 35 anos de idade, é representado como uma patologia heterogênea, que apresenta a sua incidência aumentada especialmente após os 50 anos, além de, expor uma característica multifatorial, envolvendo fatores endócrinos, vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida (INCA 2016).

2.5 Maus Tratos na Infância e Câncer de Mama

O diagnóstico e tratamento relacionados ao câncer originam distintos anseios nos indivíduos envolvidos, entretanto para mulheres diagnosticadas com câncer de mama essas manifestações podem apresentar-se intensificadas (Fagundes *et al.*, 2012). O surgimento de sintomas relacionados a ansiedade, alterações de humor e aumento dos níveis de estresse estão associados independentemente do estágio da doença, sendo observado em mulheres com carcinomas invasivos e não invasivos (Witek Janusek *et al.*, 2013). Entretanto, mesmo após a concretização do tratamento e das interferências relacionas, algumas sobreviventes relatam possuir uma qualidade de vida diminuída (Fagundes *et al.*, 2012), envolvendo dificuldades físicas, fadiga, perturbações na vida cotidiana e distúrbios psicossociais, caracterizados principalmente por depressão e ansiedade (Goldsmith *et al.*, 2010; Mcfarland *et al.*, 2016). Além disso, mulheres com neoplasia de mama que não usufruíram de um suporte familiar durante a condição de estresse traumático ocorrido no diagnóstico e terapêutica apresentam diminuição de perspectiva de vida (Fagundes *et al.*, 2012). Dessa forma, a presença desses fatores pode influenciar a condição de sobrevivência desse paciente, sendo necessário compreender a razão na qual algumas mulheres são mais vulneráveis a manifestações prejudiciais (Fagundes *et al.*, 2012; Witek Janusek *et al.*, 2013).

Mulheres que lidaram com algum trauma nos primeiros anos de desenvolvimento, quando confrontadas com novas experiências traumáticas, como o diagnóstico de câncer de mama, tendem a apresentar um sofrimento psicológico maior, assim como, a presença de níveis de estresse elevados (Goldsmith *et al.*, 2010; Fagundes *et al.*, 2012). Em um estudo proposto por Goldsmith (2010) e col., foi observada a relação entre a ocorrência de maus tratos na infância e a presença de sintomas intrusivos, em pacientes recentemente diagnosticadas com neoplasia mamária. Assim, pode-se apresentar uma associação entre a presença de um agente estressor em um período inicial de desenvolvimento e o acometimento de respostas psicológicas mais graves, ocasionando, dessa forma, uma resposta ineficiente ao tratamento (Crosswell *et al.*, 2014).

Entretanto, existem poucos estudos avaliando o efeito do estresse precoce em pacientes diagnosticados com câncer. Pesquisas indicam que um histórico de maus tratos na infância pode ser avaliado como um fator de vulnerabilidade, originando assim adultos com uma sensibilidade mais exacerbada a agentes estressores (Goldsmith *et al.*, 2010). Segundo um estudo realizado por Janusek (2013) e col. mulheres com câncer de mama

que possuíam histórico de negligência e abuso na infância apresentaram maiores níveis de estresse, fadiga e depressão, relacionado assim com uma pior qualidade de vida. Além disso, Ping (2016) e col. indicam em suas pesquisas que o aparecimento do carcinoma mamário pode estar associado a vivência de eventos negativos.

O perfil de sensibilidade ao estresse relacionado a traumas infantis está associado com o surgimento de um processo de desregulação do sistema imunológico, caracterizado principalmente por um aumento do perfil inflamatório (Crosswell *et al.*, 2014). A presença de um estado de estresse contínuo, que pode ocorrer por dias ou anos, relaciona-se com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de senescência celular, fazendo com que ocorra um rompimento da homeostase do organismo, ocasionando consequências potencialmente distintas para o indivíduo (Morey *et al.*, 2015). Além disso, outra decorrência da exposição a esse tipo de condição refere-se à ativação de infecções virais latentes, como por *herpesvírus*, que refletem na perda do controle imunológico em relação ao vírus, acarretando na acumulação de células CD8+CD28- (senescentes), as quais são em sua maioria específicas para antígenos contra o citomegalovírus (Morey *et al.*, 2015).

Dessa forma, alguns estudos envolvendo pacientes com câncer de mama que sofreram maus tratos na infância, indicam a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-6 e do marcador Proteína C Reativa (PCR), que estão associados a uma resposta reduzida ao tratamento e aumento de recaída (Crosswell *et al.*, 2014). A redução de células *Natural Killers* (NK) observada em mulheres diagnosticadas com carcinoma mamário com estresse precoce, pode interferir na eficácia da defesa contra o processo de tumorigênese, assim como, na formação de metástases (Witek Janusek *et al.*, 2013). Existem alguns mecanismos relacionados ao aumento do perfil inflamatório em adultos que sofrerem experiências adversas, entre eles o que compreende alterações no sistema neurológico e endócrino, principalmente envolvendo a conexão entre o perfil de estresse e o sistema nervoso autônomo e o eixo HPA, que induz uma vulnerabilidade a resposta estressora mais exacerbada (Witek Janusek *et al.*, 2013; Crosswell *et al.*, 2014).

Logo, a presença de maus tratos na infância pode gerar um fenótipo pró-inflamatório que persiste durante a vida do indivíduo, assim, o estresse psicológico pode afetar o sistema imune de uma maneira similar aos efeitos observados na idade

cronológica, agindo assim constantemente no processo de aceleração do envelhecimento imunológico (Witek Janusek *et al.*, 2013; Morey *et al.*, 2015).

Dessa forma, é necessário a aplicação de mais estudos que possam compreender a influência dos maus tratos nos primeiros anos de vida em relação a alterações no perfil psicológico, comportamental e imunológico e como esses fatores podem influenciar no aparecimento de neoplasias, possibilitando assim, a obtenção de dados relevantes para o mapeamento de fatores de risco e desenvolvimento de estratégias de prevenção relevantes, pois esses aspectos não compreendem apenas condições favoráveis de saúde, mas longevidade (Witek Janusek *et al.*, 2013; Ehrlich *et al.*, 2016).

2.6 Imunossenescência

O remodelamento do sistema imune envolve alterações celulares e moleculares que impactam na imunidade inata e adaptativa, relacionando-se com o aumento da incidência de doenças infecciosas, assim como condições de inflamatórias e o aparecimento de neoplasias (Malaguarnera *et al.*, 2010). Essa modificação, conhecida como imunossenescência, é o resultado de um processo de adequação na qual algumas funções apresentam-se reduzidas, enquanto outras aumentam ou mantem-se análogas (Pawelec *et al.*, 2010).

O processo de imunossenescência influencia as imunidades inata e adaptativa de maneiras distintas, enquanto a primeira apresenta-se relativamente conservada durante esse processo, a segunda manifesta alterações significativas, frequentemente desfavoráveis para o indivíduo (Pawelec *et al.*, 2010). Os linfócitos T CD4 e CD8 são intensamente influenciáveis nesse processo e apresentam distintos meios de modulações em suas funções durante a imunossenescência. O envelhecimento humano está associado com uma progressiva involução tímica e como consequência para o sistema imunológico a redução da exportação de células T naïve (E. Bauer *et al.*, 2015). Entretanto, observa-se que esse declínio da atividade tímica não altera significativamente as quantidades globais de células TCD4⁺ e TCD8⁺, fenômeno que pode estar relacionado com a expansão periférica que ocorre com essas células (Pawelec *et al.*, 2010; Falandry *et al.*, 2013). Contudo, essa diminuição na formação de células naïve pode acarretar em uma

deficiência de reconhecimento para novos antígenos correlacionando-se com um aumento de células de memória (Pawelec *et al.*, 2010).

A inversão da relação CD4/CD8 é um acontecimento relacionado com a imunossenescência, assim como, a perda da molécula co-estimulatória CD28 (Falandry *et al.*, 2013). O CD28 é expresso nas superfícies de ambos os tipos de células T e sua presença é requerida para que ocorra a ativação através das APCs, caso não ocorra esse processo de interação a célula é induzida a apoptose ou atinge o estado de anergia, sendo caracterizadas como células senescentes (Goronzy e Weyand, 2003). As células T reguladoras (Treg) são extremamente importantes no processo de tolerância a antígenos próprios, proteção contra patógenos e regulação da resposta imune, entretanto o seu papel na imunossenescência ainda é contraditório (Chen *et al.*, 2016). Estudos avaliando processos de neoplasias demonstram que o aumento dessas células ocasiona um prognóstico ruim, assim como a diminuição da sobrevida está relacionada com o aumento da frequência das Tregs (Chen *et al.*, 2016). As Tregs são divididas em duas populações, a nTreg é formada no timo e expressa CD25, sendo o seu mecanismo de supressão contato dependente, enquanto a iTreg é desenvolvida na periferia através de precursores CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺, com expressão de CD25 variável (Pawelec *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2016). Dessa forma, quando avaliado uma população acometida por neoplasias, pode-se perceber, segundo o trabalho realizado por SONG (2013) e col., um aumento de células CD4⁺CD25⁻ em pacientes com metástase de câncer de mama, assim como, outros estudos demonstraram o mesmo aumento em sangue periférico de indivíduos com malignidade gastrointestinal e câncer de pulmão. O mesmo estudo avaliou um decréscimo das células CD8⁺CD28⁺ com consequente aumento das células CD8⁺ CD28⁻ em metástases de câncer de mama.

As subpopulações de células NK fazem parte do sistema imune inato e são extremamente importantes na defesa contra agentes infecciosos, além de atuarem regularmente no processo de vigilância imunológica de tumores. Logo, uma baixa atividade desse tipo celular pode estar relacionada ao aumento de doenças infecciosas e ao processo de tumorigênese, assim como, uma baixa resposta a vacinas (Chen e Liao, 2007; Campos *et al.*, 2014; Manser e Uhrberg, 2016). No processo de envelhecimento, essas subpopulações podem apresentar-se alteradas em sua distribuição, frequência ou fenótipo, geralmente associadas ao desenvolvimento de uma ativação crônica do sistema

imunológico relacionado a presença de infecções virais latentes, entre elas o citomegalovírus (CMV), sendo a indução da expressão de NKG2, uma alteração referida nesse processo (Campos *et al.*, 2014). Além disso, as expressões de KLRG1 e PD1 também podem estar relacionadas com aparecimento de senescência e exaustão celular, além de, poderem estar correlacionados com a presença do vírus CMV (Henson e Akbar, 2009; Tavenier *et al.*, 2015). Dessa forma, estudos envolvendo indivíduos que apresentaram maus tratos na infância relataram a presença de redução da quantidade e atividade de células NK, sendo que o mesmo foi observado em uma população de mulheres com câncer de mama (Elwenspoek *et al.*; Heikkinen *et al.*, 2017).

Logo, o processo de imunossenescência é caracterizado por apresentar um estado de baixo grau de inflamação crônica, podendo interferir no processo de imunidade contra agentes externos ou aumentar a auto reação do organismo. Dessa forma, é reconhecido pela presença de citocinas pró inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF (Pawelec *et al.*, 2010), além de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa, sendo esse fenômeno conhecido como inflammaging é altamente associado a morbidade e mortalidade (E. Bauer *et al.*, 2015).

2.7 Citomegalovírus

O CMV é um vírus pertencente à família dos *β -herpesvirinae*, responsável por causar infecções assintomáticas em indivíduos saudáveis, com prevalência aumentada ao longo do envelhecimento (Herbein e Kumar, 2014). Entretanto, uma vez estabelecida a infecção, o vírus torna-se latente no organismo sendo essa persistência relacionada com interações do hospedeiro com o patógeno (Fornara *et al.*, 2013). Distintos estudos sugerem que a infecção por CMV está associada com o processo acelerado de envelhecimento imune (Sansoni *et al.*, 2014). A defesa do organismo contra o CMV compreende principalmente na resposta imune humoral, sendo que esta necessita ser ativada a cada processo de replicação viral (Herbein e Kumar, 2014). Ademais temos um aumento na quantidade de células T CD8⁺ específicas para CMV, e diminuindo o repertório de células T disponível para reconhecimento de antígenos distintos, sendo que

a maioria das células CD8+ específicas para CMV não apresentam a molécula co-estimulatória CD28 (Derhovanessian *et al.*, 2009).

O acontecimento de fatores estressores podem acarretar em uma desregulação do sistema imunológico e fazer com que ocorra a reativação de vírus latentes (Janicki-Deverts *et al.*, 2014), sendo que a presença de títulos elevados de anticorpos refletem em uma capacidade imunológica ineficaz de manutenção da latência viral e a presença de um perfil inflamatório mais acentuado com aumento de IL-6 e TNF- α (Fagundes *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstram que a presença de maus tratos na infância está relacionada com a reativação de *herpervírus* na vida adulta, assim como em mulheres com câncer de mama com o mesmo perfil de estresse precoce (Fagundes, Glaser, Malarkey, *et al.*, 2013; Janicki-Deverts *et al.*, 2014). Dessa forma, observa-se a presença de infecção ativa por CMV em algumas neoplasias, entre elas o câncer de mama, sendo relacionado com a presença de prognóstico desfavorável (Fagundes *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores de imunossenescência em mulheres com câncer de mama com ou sem histórico de maus tratos na infância.

3.2 Objetivo Específicos

- Imunofenotipar marcadores linfocitários associados com imunossenescência em mulheres com ou sem histórico de maus tratos na infância no período pré tratamento oncológico para câncer de mama;

- Quantificar anticorpos contra citomegalovírus em mulheres com câncer de mama que apresentaram ou não histórico de maus tratos na infância;

- Investigar a correlação entre os anticorpos contra citomegalovírus e marcadores de imunossenescência em mulheres com câncer de mama

4 MÉTODOS

4.1 Sujeitos

Foram selecionadas vinte e nove mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama (estadiamento de 0 a 3) que não foram submetidas a nenhum tratamento (quimioterapia, radioterapia ou cirurgia). As participantes foram recrutadas através do ambulatório de Mastologia do Hospital São Lucas, PUCRS (Porto Alegre, Brasil). Pacientes que apresentaram histórico de depressão maior, presença de doenças inflamatórias ou imunológicas, assim como o acometimento por cânceres prévios, foram excluídas. As informações clínicas das participantes foram obtidas através de prontuários médicos e questionários. Para compor o grupo controle, trinta e seis mulheres que não apresentavam câncer de mama foram selecionadas, entretanto nove foram excluídas por apresentarem histórico de negligência e/ou abuso na infância.

A presença de maus tratos na infância foi avaliada através do CTQ ou Questionário sobre Traumas na Infância. Esse instrumento de screening é aplicado para detectar experiências de negligência e abuso infantil e é caracterizado por investigar cinco componentes traumáticos: abuso físico, emocional, sexual e negligência física e emocional. Em nosso estudo, consideramos o grupo com presença de maus tratos (CM+) participantes que relataram pelo menos um tipo moderado ou severo de abuso ou negligência na infância. O grupo considerado sem traumas (CM-) consiste de indivíduos que reportaram um escore baixo ou nenhum de maus tratos na infância. Entre os pacientes, 15 foram selecionados como CM+, enquanto 14 foram incluídos no grupo CM-. Os controles que não apresentaram nenhum histórico de câncer de mama e maus tratos na infância foram avaliados para depressão através da escala de depressão de Beck (BDI-II). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da PUCRS (Porto Alegre, Brasil) e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes.

4.2 Coleta de sangue periférico e isolamento das células mononucleares (PBMCs)

As amostras de sangue periférico (10 ml) foram coletadas em tubos de EDTA. O plasma foi isolado e armazenado a -80°C . Células mononucleares (PBMCs) foram isoladas por um gradiente de Ficoll (Ge Healthcare Life Sciences – Marlborough, MA, USA), 30 min, 900g. A contagem celular foi realizada com auxílio de microscópio (100x) e a viabilidade celular ($>95\%$) foi estimada por exclusão de azul de tripan (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, USA).

4.3 Imunofenotipagem

Um painel de subtipos linfocitários foi identificado por citometria de fluxo. Após o isolamento, as células foram lavadas em tampão de citometria (PBS com 1% FCS e 0.01% azida de sódio) e tratadas com uma solução Fc Block por 20 minutos. Após, as mesmas foram marcadas por um período de 30 min a 4°C com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 FITC (Células T), anti-CD4 PE-Cy5, FITC and APC (Células T helper), anti-CD8 PE-Cy5 (Células T Citotóxicas), anti-CD19 APC (Células B), anti-CD56 APC (Células NK), anti-CD57 FITC (NK), anti-CD28 APC, anti-CD27 PE, anti-CD69 FITC (recém diferenciadas), anti-CD25 FITC (recém diferenciadas), anti-CD103 FITC (marcador de célula T regulatória), anti-NKG2 (marcador de senescência celular), anti-KLRG1 (marcador de senescência celular) and anti-PD1 (Marcador de exaustão celular). Os diferentes estágios de células T foram determinados segundo os seguintes critérios: CD27⁺CD28⁺ (recém diferenciadas), CD27⁺CD28⁺ (diferenciadas intermediárias), e CD27⁺CD28⁻ (células senescentes).

Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences (San Jose, CA, USA), com exceção os anticorpos anti-NKG2 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), anti-KLRG1 (Biolegend, San Diego, CA, USA), e anti-PD1 (Biolegend, San Diego, CA, USA). Após o período de marcação, as células foram lavadas, ressuspensas e analisadas por citometria de fluxo utilizando FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences). O mínimo de 20.000 linfócitos foi adquirido por amostra, levando em consideração o tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Os dados foram analisados usando o software FlowJo 7.2.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

4.4 Sorologia para Citomegalovírus

As amostras de plasma foram analisadas para a anticorpos IgG e IgM anti – CMV utilizando como metodologia o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISAs) (IBL International, Hamburg, Germany). A sensibilidade de especificidade é estimada em > 95%. As amostras foram consideradas positivas (reativas) quando os valores de anticorpos anti-CMV encontravam-se acima do cut-off de 22 UI/mL para IgG. O limite de detecção foi de 0.4 UI/mL para ambos IgM e IgG anti-CMV. Os resultados foram expressos em. UI/mL.

4.5 Análise de Estatística

A normalidade de distribuição das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis contínuas, diferenças entre os grupos (CM+, CM- e controles) utilizamos análise de variância (ANOVA) ou Kruskal–Wallis (K-W). Em relação as variáveis categóricas, as diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando o teste do chi-quadrado (X^2). O modelo Generalized Linear Modeling – (GzLM) também foi aplicado para comparação de diferentes grupos, sendo ajustado para fatores de confusão como idade e educação. As distribuições, linear ou gama, foram selecionadas baseadas na amostra, assim como, a estimativa aplicada foi a robusta. O teste de Bonferroni foi utilizado para a comparação de média entre os grupos. As correlações entre variáveis contínuas foram analisadas pelos testes de correlação de Pearson ou Spearman. As análises estatísticas foram realizadas através do Statistical Package for Social Sciences, SPSS Statistics V.20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), com com o nível de significância estabelecido em $P \leq 0,05$.

4.6 Considerações Éticas

O estudo apresenta os princípios bioéticos de autonomia, beneficência, não maleficência e confidencialidade, já sendo aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUC-RS (SIPESQ No. 6759). Este projeto utilizou o banco de dados de um estudo já em andamento e previamente apreciado e aprovado pelo CEP PUCRS e devidamente registrado na Plataforma Brasil (No. 48889815.5.0000.53363). Intitulado: Relação entre estresse precoce, fatores psiconeuroimunoendócrinos e tratamento do câncer de mama e sob orientação do Prof. Dr. (o) Rodrigo Grassi de Oliveira, do Programa de Pós-Graduação em Psicologia da PUCRS. Sendo apresentada a mesma metodologia citada no presente projeto.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

2
3 PREMATURE IMMUNOSENESCENCE IN WOMEN NEWLY
4 DIAGNOSED WITH BREAST CANCER – ROLE OF EARLY-
5 LIFE STRESS

6
7
8
9 Lauren Trintinaglia^{1,2}, Lucas Poitevin Bandinelli³, Rodrigo Grassi-Oliveira^{1,3}, Laura
10 Esteves Petersen¹, Marcelo Anzolin¹, Bruna Luz Correa⁴, Jaqueline Bohrer Schuch^{1,2}
11 and Moisés Evandro Bauer^{1,2,5,*}
12

13
14 ¹Laboratory of Immunosenescence, School of Sciences, Pontifícia Universidade
15 Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

16 ²Graduate Program in Biomedical Gerontology, PUCRS, Porto Alegre, Brazil;

17 ³Developmental Cognitive Neuroscience Lab (DCNL), School of Health Sciences,
18 Porto Alegre, Brazil;

19 ⁴Labvitrus Laboratory, Porto Alegre, Brazil;

20 ⁵National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-
21 NIM), Brazil.

22
23
24 **Running title:** Early-life stress and breast cancer

25
26
27
28 Number of Figures: 05.

29 Total word count: 2944.

30
31
32
33 ***Corresponding author:** Dr. Moisés E. Bauer, School of Sciences, PUCRS, Av.
34 Ipiranga 6681. Porto Alegre, RS 90.619-900, Brazil. mebauer@pucrs.br

40 **Abstract**

41
42 Adults exposed to childhood maltreatment have increased stress reactivity. This
43 profile is associated with dysregulation of the immune system, including enhanced
44 inflammatory reactions and premature senescence. Subjects exposed to early-life stress
45 have increased risk for several age-related diseases, including cardiovascular disease,
46 type II diabetes and cancer. Although previous studies have reported immune changes in
47 advanced cancer, very little information is available regarding early stage breast cancer.
48 Here, twenty-nine patients with breast cancer were recruited: 15 with history of childhood
49 maltreatment (CM+) and 14 without history (CM-). Twenty-seven healthy women
50 without CM were selected as the control group. Peripheral blood was collected and
51 lymphocyte subsets phenotyped by multi-color flow cytometry (B cells, CD4+ T, CD8+
52 T, natural killer (NK) cells, activated T cells, regulatory T cells, and senescence-
53 associated T cells). Because human cytomegalovirus (CMV) was associated with
54 premature immunosenescence, the CMV serology was determined by ELISA. None of
55 the subjects had IgM reactivity to CMV, excluding acute viral infection. There was a
56 higher proportion of patients with increased CMV IgG levels in the CM+ group as
57 compared to CM- or controls. After adjusting for age and education, early-differentiated
58 T cells (CD27+CD28+) were found reduced in CM+ and CM- patients (p <0.0001). In
59 contrast, intermediate-differentiated T cells (CD27-CD28+; p<0.0001), senescent T cells
60 (CD27-CD28-; p<0.0001) and exhausted T cells (CD8+CD27-CD28-PD1+; p<0.0001)
61 were found expanded in both CM+ and CM- groups. Our data suggest that premature
62 immunosenescence is associated with newly diagnosed breast cancer, regardless of the
63 CM history.

64
65
66
67
68 **Keywords:** childhood maltreatment, breast cancer, immunosenescence,
69 cytomegalovirus, T lymphocytes

75 INTRODUCTION

76
77 Childhood maltreatment, such as abuse and neglect, increases the vulnerability for
78 the development of psychiatric disorders and cancer in adult life (1, 2). A large meta-
79 analysis revealed that having multiple childhood experiences was associated with
80 increased risk (OR = 2.3) for development of cancer (3). Adults with history of early-life
81 stress have increased reactivity of the stress system, with heightened cortisol responses
82 to psychosocial stressors (4). A new cancer diagnosis is associated with important
83 psychological burden and can be understood as a “second allostatic hit” (5), further
84 activating the stress system (6, 4). This profile is also associated with dysregulation of the
85 immune system, mainly characterized by increased levels of proinflammatory cytokines
86 and premature senescence (7, 10, 9, 8). Therefore, the understanding of biological
87 changes associated with early-life stress at the cancer onset is of paramount importance.
88 The monitoring of these biomarkers would be beneficial for planning therapies and
89 optimizing the timing of treatment.

90 Recent evidence indicated that chronic stress in adults as well as childhood
91 maltreatment may lead to premature aging of the immune system (immunosenescence)
92 (11). This early senescence can be demonstrated by shortened telomeres, and changes in
93 specific lymphocyte populations, including the expansion of T cells with late
94 differentiated profile, and increased senescence and exhaustion cellular markers (e.g.,
95 PD1 and KLRG1, respectively) (13, 12). Of note, different stages of T-cell differentiation
96 can be determined based on the cell-surface expression of the costimulatory molecules
97 CD28 and CD27 (35, 36). Previous studies have defined naïve T cells or early-
98 differentiated (CD27+CD28+), intermediate-differentiated (CD27-CD28+), and late-
99 differentiated or senescent cells (CD27-CD28-). Furthermore, previous studies suggested
100 that childhood maltreatment is associated with the reactivation of some herpesvirus (i.e.,
101 cytomegalovirus, CMV) during adulthood. The presence of serum antibodies to CMV
102 have been correlated with the immunosenescence process, possibly reflecting an
103 inefficient immune capacity to deal with the viral latency during aging (14, 15). The
104 immunosenescence profile is largely unknown in patients with breast cancer, and it is
105 speculated these changes may interfere the prognosis and treatment response.

106 In this study, we investigated the presence of immunosenescence markers
107 (lymphocyte subtypes and CMV serology) in women newly diagnosed with breast cancer
108 with and without history of childhood maltreatment.

110 MATERIALS AND METHODS

112 Subjects

113 Twenty-nine women with early breast cancer stage (stages 0 to 3A) were recruited
114 before starting treatment (chemotherapy, radiotherapy or surgery) from the Mastology
115 Unit at São Lucas Hospital, PUCRS (Porto Alegre, Brazil). Patients with history of major
116 depression, inflammatory or immune-based diseases, as well as a prior history of breast
117 cancer or presence of others cancers were excluded. Clinical characteristics were assessed
118 through hospital medical records and/or questionnaires. In addition, thirty-six women
119 without breast cancer were selected as the control group - nine of them were excluded
120 due to history of childhood abuse or neglect.

121 Childhood maltreatment was investigated by the Childhood Trauma Questionnaire
122 – Portuguese version (16). CTQ is a retrospective 28-item self-report instrument that
123 assesses exposure to sexual, physical and emotional abuse, and physical and emotional
124 neglect (17). In this study, the group with childhood maltreatment (CM+) consisted of
125 participants who reported at least one moderate or severe type of childhood abuse or
126 neglect. The group without childhood maltreatment (CM–) consisted of participants who
127 reported none or low scores of CM. Among the patients, 15 were selected as CM+ and
128 14 were included in the CM– group. The healthy controls had no history of abuse or
129 neglect. Cases and controls were evaluated for depressive symptoms using the Beck
130 Depression Inventory – Portuguese version (BDI-II) (18). The study protocol was
131 approved by both scientific and ethics committees of PUCRS (Porto Alegre, Brazil) and
132 written informed consent was obtained from all participants.

133

134 **Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)**

135 Peripheral blood (10 mL) was collected between 10-12h from each participant by
136 venipuncture in EDTA tubes. Plasma was isolated and stored at –80°C. Peripheral blood
137 mononuclear cells (PBMCs) were isolate by Ficoll density gradient centrifugation (Ge
138 Healthcare Life Sciences – Marlborough, MA, USA), 30 min at 900g. Cells were counted
139 using a microscope (100 x) and viability always exceeded 95%, as judged by Trypan Blue
140 exclusion (Sigma-Aldrich – St. Louis, MO, USA).

141

142 **Immunophenotyping**

143 A comprehensive panel of lymphocyte subsets was identified by multicolor flow
144 cytometry. Briefly, PBMCs were washed in flow cytometry buffer (PBS containing 1%
145 FCS and 0.01% sodium azide) and treated with Fc Block solution for 20 min. Cells were
146 stained for 30 min at 4°C with combinations of monoclonal antibodies: anti-CD3 FITC
147 (T cells), anti-CD4 PECy5, FITC and APC (Th cells), anti-CD8 PECy5 (Tc cells), anti-
148 CD19 APC (B cells), anti-CD56 APC (NK cells), anti-CD57 FITC (NK), anti-CD28
149 APC, anti-CD27 PE, anti-CD69 FITC (early activated cells), anti-CD25 FITC (early
150 activated cells), anti-CD103 FITC (regulatory T cell marker), anti-NKG2 (senescent
151 marker), anti-KLRG1 (senescent marker) and anti-PD1 (exhaustion marker). The
152 differentiation stages of T cells were studied as the following criteria: CD27+CD28+
153 (early-differentiated), CD27-CD28+ (intermediate-differentiated), and CD27-CD28-
154 (senescent cells).

155 All antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), except
156 anti-NKG2 (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA), anti-KLRG1 (Biolegend, San Diego,
157 CA, USA), and anti-PD1 (Biolegend, San Diego, CA, USA). After staining, cells were
158 washed, resuspended and analyzed by flow cytometry. At least 20,000 lymphocytes were
159 identified by size (FSC) and granularity (SSC) and acquired using a FACS Canto II flow
160 cytometer (BD Biosciences). The instrument was checked for sensitivity and overall
161 acquisition. Data were analyzed using Flowjo 7.2.5 software (Tree Star Inc., Ashland, Or,
162 USA).

163

164 **CMV serology**

165 Plasma samples were analyzed for both IgM and IgG antibodies anti-CMV using
166 enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (IBL International, Hamburg,

167 Germany). Sensitivity and specificity were estimated to be more than 95%. The optical
168 densities (570/620 nm) were estimated in an ELISA plate reader. Samples were
169 considered positive (reactive) for antibodies anti-CMV when values were above the cut-
170 off of 22 UI/mL for IgG. The detection limit is 0.4 UI/mL for both IgM and IgG anti-
171 CMV. The results are expressed in UI/mL.

172

173 **Statistical analyses**

174 All variables were tested for normality of distribution by Shapiro-Wilk tests. For
175 continuous variables, differences between groups (CM+, CM- and controls) were
176 evaluated by Analysis of Variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis (K-W). For categorical
177 variables, differences between groups were compared using chi-square (X^2) test.
178 Generalized Linear Modeling (GzLM) was also used to compare differences between
179 groups adjusting for potential confounders (age and education). Linear or gamma
180 distribution was selected based on the distribution outcome and robust estimation with
181 unstructured working correlation matrix was set. Bonferroni post hoc test was used to
182 compared means between groups and adjust the observed significance level considering
183 multiple contrast being tested. Relationship between continuous variables were analyzed
184 by Pearson or Spearman's correlation tests. Statistical analyses were performed using the
185 Statistical Package for Social Sciences, SPSS Statistics V.20 software (SPSS Inc.,
186 Chicago, IL, USA). The significance level was set at $\alpha=0.05$ (two tailed).

187

188 **Results**

189

190 **Sociodemographic and clinical characteristics**

191 Demographic and clinical characteristics of the samples are summarized in Table
192 1. All groups were similar regarding BDI scores. Individuals of CM+ and CM- groups
193 differed from control group by age, years of education and income (all $p<0.05$). CM+ and
194 CM- groups present similar cancer stage and family history of breast cancer. As expected,
195 higher CTQ scores were observed in the CM+ group compared to CM- and control
196 groups (K-W = 28.4, $p<0.001$).

197

198 **Major lymphocyte subsets**

199 We investigated different peripheral lymphocyte subpopulations associated with
200 activation and regulatory profiles (Table 2). Activated T cells (CD3+CD69+) and
201 regulatory T cells (CD4+CD103+) were found significantly increased in CM+ and CM-
202 patients (all $p<0.0001$) compared to controls. Figure 1 shows the mean differences of
203 activation/regulatory markers between patients and controls. Furthermore, the CM+
204 group had reduced frequencies of CD3-CD19+ B cells ($p=0.021$) compared to CM-
205 group. Decreased proportions of helper T cells (CD3+CD4+) were observed in the CM-
206 group ($p<0.001$), but not in the CM+ group or controls. The CD4/CD8 ratio did not differ
207 between groups ($p = 0.10$). No significant differences were found between groups for the
208 remaining subpopulations.

209

210 **Lymphocyte subsets with senescence profile**

211 Different stages of T-cell differentiation can be described based on the expression
212 of cell-surface co-stimulatory molecules CD27 and CD28 (35, 36) (Table 3). The early-
213 differentiated T cells (CD4+CD27+CD28+ and CD8+CD27+CD28+) were found
214 significantly reduced in CM+ and CM- patients (all $p < 0.0001$) compared to controls. In
215 contrast, the intermediate-differentiated T cells (CD4+CD27-CD28+), and late-
216 differentiated (senescent) T cells (CD4+CD27-CD28-) were found expanded in patients
217 (all $p < 0.0001$). The figure 2 shows the shrinkage of the early-differentiated T-cell pool in
218 contrast to the expansion of the pool of late-differentiated T cells in patients.

219 Similarly, the senescent T cell CD8+KLRG1+NKG2+ was found expanded in both
220 CM+ and CM- patients ($p < 0.0001$). Also, the early senescent T cell CD3+CD8+KLRG1+
221 was found significantly increased in the CM- but not in CM+ group or controls ($p =$
222 0.002). The CD8+CD27-CD28-PD1+ T cells (exhausted T cells) were found expanded
223 in both CM+ and CM- groups when compared to controls ($p < 0.0001$).

224 **Expression levels of cell-surface markers**

225 Next, we investigated the expression levels of the studied cell-surface markers by
226 the analysis of the mean fluorescent intensity (MFI), an estimation of the receptor density
227 (Table 4). Of note, we assessed the following biomarkers: CD3, CD19, CD69, CD103,
228 CD27, CD28, KLRG1, NKG2 and PD1. The CM+ group had higher expression of CD103
229 in CD4 T cells ($p < 0.0001$) and of NKG2 in CD8 T cells ($p < 0.0001$) as compared to CM-
230 or control groups. Furthermore, the CD27 expression in CD4 T cells was found lower in
231 controls compared to CM+ and CM- groups ($p = 0.002$). In CD8 T cells, higher CD27
232 and CD28 expression was observed in controls compared to women with breast cancer
233 ($P = 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively).
234

235 **Influence of CMV on antibody titers**

236 The CMV serology was investigated here as another index of premature
237 immunosenescence. None of the subjects had IgM reactivity to CMV, excluding acute
238 viral infection. The median IgG anti-CMV titers was 114.40 and there was a higher
239 proportion of subjects with increased serology ($>$ median) in the CM+ group ($n = 12$) as
240 compared to CM- ($n = 7$) and controls ($n = 4$), $\chi^2 = 14.67$, $p < 0.001$ (Figure 3A). The CM+
241 patients had increased CMV IgG levels (median = 141.0 [interquartile range; IQR],
242 [124.7-276.0]) as compared to controls (median = 94.1 [85.7-111.2]), $p < 0.05$ (Figure 3B).
243 However, the CM- group had similar CMV IgG levels (median = 126.9 [109.0-137.1]) as
244 compared to CM+ ($p = 0.22$) or control groups ($p = 1.0$). As expected, age ($r_s = 0.52$,
245 $p < 0.0001$) and education ($r_s = -0.58$, $p < 0.0001$) were correlated to CMV IgG levels
246 (Figure 3C and 3D). Therefore, when adjusted for these confounders, the CMV IgG levels
247 did not differ between groups (Wald = 0.27, $p = 0.87$).
248

249 As there were no differences in CMV IgG levels between CM + and CM- groups,
250 the following analyses were thus performed without considering childhood maltreatment.
251 The relationships between CMV IgG levels and lymphocyte subsets were analyzed
252 separately in controls and breast cancer patients. In women with breast cancer, positive
253 correlations were found between anti CMV IgG levels and percentage of CD4+CD27-
254 CD28- ($r_s = 0.71$, $p < 0.0001$, Figure 4A), CD8+CD27- CD28- ($r_s = 0.44$, $p = 0.04$, Figure
255 4B), NK-T cells ($r_s = 0.51$, $p = 0.02$, Figure 4C) and NK cells ($r_s = 0.56$, $p = 0.007$, Figure

256 4D). In the control group, positive correlations were detected between anti CMV IgG
257 levels and the following cell subtypes: CD3+CD56+ ($r_s = 0.57$, $p < 0.001$),
258 CD4+CD27+CD28+ ($r_s = 0.43$, $p = 0.01$), CD8+CD27+CD28+ ($r_s = 0.49$, $p = 0.06$),
259 CD4+CD27-CD28+ ($r_s = 0.42$, $p = 0.01$) and CD8+CD27-CD28+ ($r_s = 0.39$, $p = 0.03$)
260 (Figure 5). In addition, negative correlations between CD3+CD103+ ($r_s = - 0.47$, $p = 0.09$)
261 and CD4+CD27-CD28- ($r_s = - 0.44$, $p = 0.02$) with anti-CMV IgG levels were also
262 observed.

263

264 Discussion

265

266 In this study, we observed the presence of a cellular senescence profile in women
267 with breast cancer, regardless of the history of childhood abuse.

268

269 Previous studies in the field have described immune changes in breast cancer,
usually involving immunotherapeutic aspects and response to treatment. However, none
270 of these studies analyzed the influence of childhood abuse on the immune system. The
271 frequency of activated T-cells is modulated by the presence of tumors, as demonstrated
272 in a study comparing women with breast cancer and healthy controls (4, 19). As observed
273 in our study, there was an increase activated T cells (CD69+) in breast cancer. B cells
274 also seem to be expanded in women with breast cancer (20). However, this increase
275 occurred in the group of women with breast cancer who were not exposed to childhood
276 abuse when compared to healthy controls.

277

278 In our study, we observed distinct changes involving aging lymphocytes. Of note,
279 there was an expansion of CD27-CD28- T cells (late-differentiated or senescent T cells)
280 in contrast to reduced proportion of CD28+CD27+ T cells (early differentiated). The
281 presence of the T-cell senescent profile is corroborated by the loss of the CD27
282 costimulatory molecule, since there was a decrease in the CD27 expression (as estimated
283 by the MFI). Similarly, an increase in the proportion of CD8+CD28- T cells was observed
284 in women with breast cancer during chemotherapy (21), and in lung cancer (22). Previous
285 studies have also reported that the increase of this lymphocyte type in cancer patients may
286 be associated with the advanced staging and treatment inefficacy, since some
287 immunotherapeutic interventions require the presence of this costimulatory molecule to
288 be effective. In addition, the expansion of this population of senescent cells can lead to
289 an inefficient anti-tumor response, due to the decrease of naïve and effector T-cells (23,
290 21, 24). However, in our study, the staging of the disease was similar between the cases,
291 and it was not possible to evaluate the potential involvement of the lymphocyte subtypes
with the clinical outcome.

292

293 In their terminal differentiation (*i.e.*, senescence), T-cells also express regulatory
294 markers such as KLRG1 and PD-1 (12). Exposure to chronic stress in childhood can affect
295 the immune system in a similar way to the effects observed during aging (9). Of note, the
296 expression of KLRG1 was found increased in elderly individuals as well as in sexually
297 abused subjects (25, 26). Corroborating this finding, we found an increase in this
298 senescent marker in T-cell subsets of patients, regardless of the history of childhood
299 maltreatment. The PD-1 is another cell-surface marker of late differentiation or
300 exhaustion. The PD-1 and its ligand (PD-L1) have been especially targeted in the area of
301 immunotherapy (checkpoint blockade), given its effectiveness in increasing anti-tumor
response when stimulated by antibodies. The PD-1 is also expressed in most breast tumors

302 (27, 28). In support of our findings, a previous study reported the increase of this marker
303 in patients with early-stage breast cancer (29). Furthermore, the PD-1 has been also
304 investigated in chronic viral infections (CMV, HIV and viral hepatitis). Individuals with
305 these infections had a senescent profile, demonstrated by the increased frequency of
306 PD-1+ expressing T cells (30, 12). Considering the intense relationship between viral
307 infections, cancer and immunosenescence, we can confirm that this profile of cellular
308 senescence and exhaustion is also present in patients with breast cancer.

309 The CMV has been repeatedly associated with features of premature
310 immunosenescence, including the expansion of senescent T cells (CD8+CD28-), reduced
311 T-cell repertoire, and increased plasma pro-inflammatory cytokines (IL-6) (11).
312 Furthermore, the presence of acute stressors, such as the diagnosis of cancer, may lead to
313 immune dysregulations implicated with reactivation of latent viruses such as CMV (15).
314 Previously, the presence of fatigue in women with breast cancer undergoing treatment
315 was associated with higher titers of IgG antibodies to CMV (but not EBV) (14). In line,
316 here the CM+ patients had increased proportion of subjects with higher IgG serology to
317 CMV as compared to CM- or control groups. During aging studies, the CMV infection
318 has been shown to play an important role in driving the expansion of late-differentiated
319 T cells (CD28-) (37), and our data corroborate this hypothesis. In particular, the CMV
320 IgG levels were positively correlated with intermediate- or late-differentiated T cells as
321 well as negatively correlated with early-differentiated T cells (CD4+CD27+CD28+). We
322 also observed a positive correlation of NK cells with increased CMV IgG titers in women
323 with breast cancer. This result confirms previous data demonstrating that CMV infection
324 can affect innate immunity by expanding the NK cell pool (31). This finding was observed
325 in individuals without breast cancer (32). Therefore, it is speculated the can process itself
326 may dysregulate the immune system, limiting the controlling capacity of latent viral
327 infections (1).

328 The subgroups of NK cells studied here did not differ between groups, and these
329 data corroborate the finding of Velázquez (2016) et al (19). It should be stressed out the
330 breast cancer patients evaluated here were in early stages, not undergoing treatment.
331 Therefore, the observed results were not influenced by treatment. Janusek (2013) et al,
332 on the other hand, have observed that women with breast cancer during treatment (surgery
333 and radiotherapy) with CM history had decreased NK cell activity (NKCA) (4). This
334 divergence can be attributed to the fact that cancer therapy can cause immunomodulatory
335 effects in cell populations (34, 19).

336 Our data should be interpreted considering some limitations. The sample size of
337 women with breast cancer is relatively small and the cross-sectional design may preclude
338 causal relationships. However, it should be kept in mind that all main effects were
339 adjusted for possible confounders, such as age and education, demonstrating that the
340 results obtained are probably related to the cancer process.

341 To the best of our knowledge, this is the first study assessing immunological
342 markers in early-diagnosis breast cancer with history of CM. Our results suggest that the
343 cellular senescence profile is associated to the diagnosis of breast cancer, regardless of
344 the history of childhood abuse. Longitudinal studies are needed to explore the relationship
345 of this senescent profile with clinical progression and treatment response.

346
347

348 **ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING**

349

350 We are very grateful to the patients and staff at the Hospital São Lucas (Porto
351 Alegre, Brazil). This work was supported by grants from Conselho Nacional de
352 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), National Institute of Science and
353 Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Coordenação de
354 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à
355 Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). These funding bodies played no
356 role in the writing of this manuscript, nor in the design, data collection, analysis, and
357 interpretation of our data.

358

359 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

360

361 The paper was written by MEB, LT, JBS and revised into its final format by all
362 co-authors. Participant recruitment and screening was performed by LT and LPB. Flow
363 cytometry panel was setup by LEP and LT. Immunophenotyping and cytometric analysis
364 were performed by LEP, LT and MA. Plasma and PBMC isolation were performed by
365 LT and MA. Statistical analysis was performed by LT, JBS and MEB. The study was
366 conceived by RGO and MEB. All authors read and approved the final manuscript.

367

368 **CONFLICT OF INTEREST**

369

370 The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Fagundes, C.P., Glaser, R., and Kiecolt-Glaser, J.K. (2013). Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain Behav Immun* 27(1), 8-12. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.014.
2. Coelho, R., Viola, T.W., Walss-Bass, C., Brietzke, E., and Grassi-Oliveira, R. (2014). Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review. *Acta Psychiatr Scand* 129(3), 180-192. doi: 10.1111/acps.12217.
3. Hughes, K., Bellis, M.A., Hardcastle, K.A., Sethi, D., Butchart, A., Mikton, C., et al. (2017). The effect of multiple adverse childhood experiences on health: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Public Health* 2(8), e356-e366. doi: 10.1016/S2468-2667(17)30118-4.
4. Witek Janusek, L., Tell, D., Albuquerque, K., and Mathews, H.L. (2013). Childhood adversity increases vulnerability for behavioral symptoms and immune dysregulation in women with breast cancer. *Brain Behav Immun* 30 Suppl, S149-162. doi: 10.1016/j.bbi.2012.05.014.
5. Bandinelli, L.P., Levandowski, M.L., and Grassi-Oliveira, R. (2017). The childhood maltreatment influences on breast cancer patients: A second wave hit model hypothesis for distinct biological and behavioral response. *Med Hypotheses* 108, 86-93. doi: 10.1016/j.mehy.2017.08.007.
6. Goldsmith, R.E., Jandorf, L., Valdimarsdottir, H., Amend, K.L., Stoudt, B.G., Rini, C., et al. (2010). Traumatic stress symptoms and breast cancer: the role of childhood abuse. *Child Abuse Negl* 34(6), 465-470. doi: 10.1016/j.chiabu.2009.10.007.
7. Elwenspoek, M.M.C., Kuehn, A., Muller, C.P., and Turner, J.D. The effects of early life adversity on the immune system. *Psychoneuroendocrinology* 82, 140-154. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.05.012.
10. Crosswell, A.D., Bower, J.E., and Ganz, P.A. (2014). Childhood adversity and inflammation in breast cancer survivors. *Psychosom Med* 76(3), 208-214. doi: 10.1097/PSY.000000000000041.
9. Morey, J.N., Boggero, I.A., Scott, A.B., and Segerstrom, S.C. (2015). Current Directions in Stress and Human Immune Function. *Curr Opin Psychol* 5, 13-17. doi: 10.1016/j.copsyc.2015.03.007.
8. Heikkinen, S., Miettinen, J., Pukkala, E., Koskenvuo, M., Malila, N., and Pitkaniemi, J. (2017). Impact of major life events on breast-cancer-specific mortality: A case fatality study on 8000 breast cancer patients. *Cancer Epidemiol* 48, 62-69. doi: 10.1016/j.canep.2017.03.008.
11. Bauer, M.E., and Fuente Mde, L. (2016). The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev* 158, 27-37. doi: 10.1016/j.mad.2016.01.001.
13. Tavenier, J., Langkilde, A., Haupt, T.H., Henriksen, J.H., Jensen, F.K., Petersen, J., et al. (2015). Immunosenescence of the CD8(+) T cell compartment is associated with HIV-

- infection, but only weakly reflects age-related processes of adipose tissue, metabolism, and muscle in antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients and controls. *BMC Immunol* 16, 72. doi: 10.1186/s12865-015-0136-6.
12. Xu, W., and Larbi, A. (2017). Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int J Mol Sci* 18(8). doi: 10.3390/ijms18081742.
 35. Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., et al. (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8(4), 379-385. doi: 10.1038/nm0402-379.
 36. Appay, V., Bosio, A., Lokan, S., Wiencek, Y., Biervert, C., Kusters, D., et al. (2007). Sensitive gene expression profiling of human T cell subsets reveals parallel post-thymic differentiation for CD4+ and CD8+ lineages. *J Immunol* 179(11), 7406-7414.
 14. Fagundes, C.P., Glaser, R., Alfano, C.M., Bennett, J.M., Povoski, S.P., Lipari, A.M., et al. (2012). Fatigue and herpesvirus latency in women newly diagnosed with breast cancer. *Brain Behav Immun* 26(3), 394-400. doi: 10.1016/j.bbi.2011.09.014.
 15. Janicki-Deverts, D., Cohen, S., Doyle, W.J., Marsland, A.L., and Bosch, J. (2014). Childhood environments and cytomegalovirus serostatus and reactivation in adults. *Brain Behav Immun* 40, 174-181. doi: 10.1016/j.bbi.2014.03.010.
 16. Grassi-Oliveira, R., Cogo-Moreira, H., Salum, G.A., Brietzke, E., Viola, T.W., Manfro, G.G., et al. (2014). Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) in Brazilian samples of different age groups: findings from confirmatory factor analysis. *PLoS One* 9(1), e87118. doi: 10.1371/journal.pone.0087118.
 17. Levandowski, M.L., Viola, T.W., Prado, C.H., Wieck, A., Bauer, M.E., Brietzke, E., et al. (2016). Distinct behavioral and immunoendocrine parameters during crack cocaine abstinence in women reporting childhood abuse and neglect. *Drug Alcohol Depend* 167, 140-148. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2016.08.010.
 18. Beck, A.T., Steer, R.A., Ball, R., and Ranieri, W. (1996). Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J Pers Assess* 67(3), 588-597. doi: 10.1207/s15327752jpa6703_13.
 19. Nieto-Velazquez, N.G., Torres-Ramos, Y.D., Munoz-Sanchez, J.L., Espinosa-Godoy, L., Gomez-Cortes, S., Moreno, J., et al. (2016). Altered Expression of Natural Cytotoxicity Receptors and NKG2D on Peripheral Blood NK Cell Subsets in Breast Cancer Patients. *Transl Oncol* 9(5), 384-391. doi: 10.1016/j.tranon.2016.07.003.
 20. Tsuda, B., Miyamoto, A., Yokoyama, K., Ogiya, R., Oshitanai, R., Terao, M., et al. (2017). B-cell populations are expanded in breast cancer patients compared with healthy controls. *Breast Cancer*. doi: 10.1007/s12282-017-0824-6.
 21. Song, G., Wang, X., Jia, J., Yuan, Y., Wan, F., Zhou, X., et al. (2013). Elevated level of peripheral CD8(+)CD28(-) T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 62(6), 1123-1130. doi: 10.1007/s00262-013-1424-8.

22. Meloni, F., Morosini, M., Solari, N., Passadore, I., Nascimbene, C., Novo, M., et al. (2006). Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol* 67(1-2), 1-12. doi: 10.1016/j.humimm.2005.11.005.
23. Chen, I.H., Lai, Y.L., Wu, C.L., Chang, Y.F., Chu, C.C., Tsai, I.F., et al. (2010). Immune impairment in patients with terminal cancers: influence of cancer treatments and cytomegalovirus infection. *Cancer Immunol Immunother* 59(2), 323-334. doi: 10.1007/s00262-009-0753-0.
24. Onyema, O.O., Decoster, L., Njemini, R., Forti, L.N., Bautmans, I., De Waele, M., et al. (2015). Chemotherapy-induced changes and immunosenescence of CD8+ T-cells in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 35(3), 1481-1489.
25. Henson, S.M., and Akbar, A.N. (2009). KLRG1--more than a marker for T cell senescence. *Age (Dordr)* 31(4), 285-291. doi: 10.1007/s11357-009-9100-9.
26. Kared, H., Martelli, S., Ng, T.P., Pender, S.L., and Larbi, A. (2016). CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 65(4), 441-452. doi: 10.1007/s00262-016-1803-z.
27. Bedognetti, D., Maccalli, C., Bader, S.B., Marincola, F.M., and Seliger, B. (2016). Checkpoint Inhibitors and Their Application in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 11(2), 108-115. doi: 10.1159/000445335.
28. Hu, X., Huang, W., and Fan, M. (2017). Emerging therapies for breast cancer. *J Hematol Oncol* 10(1), 98. doi: 10.1186/s13045-017-0466-3.
29. Poschke, I., De Boniface, J., Mao, Y., and Kiessling, R. (2012). Tumor-induced changes in the phenotype of blood-derived and tumor-associated T cells of early stage breast cancer patients. *Int J Cancer* 131(7), 1611-1620. doi: 10.1002/ijc.27410.
30. Gianesin, K., Noguera-Julian, A., Zanchetta, M., Del Bianco, P., Petrara, M.R., Freguja, R., et al. (2016). Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *AIDS* 30(9), 1363-1373. doi: 10.1097/QAD.0000000000001093.
37. Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., et al. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202(5), 673-685. doi: 10.1084/jem.20050882.
31. Mozaffari, F., Lindemalm, C., Choudhury, A., Granstam-Bjorneklett, H., Helander, I., Lekander, M., et al. (2007). NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo- and radiotherapy. *Br J Cancer* 97(1), 105-111. doi: 10.1038/sj.bjc.6603840.
32. Ostapchuk, Y.O., Cetin, E.A., Perfilyeva, Y.V., Yilmaz, A., Skiba, Y.A., Chirkin, A.P., et al. (2015). Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF-beta in healthy donors and breast cancer patients. *Cell Immunol* 298(1-2), 37-46. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.09.002.

34. Mamessier, E., Pradel, L.C., Thibult, M.L., Drevet, C., Zouine, A., Jacquemier, J., et al. (2013). Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets. *J Immunol* 190(5), 2424-2436. doi: 10.4049/jimmunol.1200140.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Proportion of T-cell subsets with activated and regulatory profiles. Statistical significant differences are indicated. Data were analyzed by GzLM test (gamma or linear distribution) adjusted for age and years of education.

Figure 2. Different stages of T-cell differentiation between patients and controls. The following stages of differentiation can be described based on the expression of cell-surface co-stimulatory molecules CD27 and CD28 (35, 36): early-differentiated (CD27+CD28+), intermediate-differentiated (CD27-CD28+) and late-differentiated (CD27-CD28-) T cells (Figure 2A). Figure 2B shows the representative dot-plot of CD27/CD28 expression in gated CD4+ or CD8+ T cells. The figure 2C shows the shrinkage of the early-differentiated T-cell pool in contrast to the expansion of the pool of late-differentiated T cells in patients.

Figure 3. The cytomegalovirus (CMV) serology between studied groups. Figure 3A shows the number of subjects with IgG anti-CMV levels > or <= median (114.40). Figure 3B shows the CMV IgG levels between groups. After adjusting for age and years of education, no differences were observed between groups (Wald = 0.27, p=0.87). Figures C and D show the correlations between CMV IgG serology and age and education, respectively.

Figure 4. Correlation between IgG anti-CMV titers and immunosenescence markers in women with breast cancer. Figures (A – D) show the correlations between senescent CD4 and CD8 T cell ($r_s = 0.71$, $p < 0.0001$; $r_s = 0.44$, $p = 0.04$) and NK and NKT ($r_s = 0.51$, $p = < 0.02$; $r_s = 56$, $p = 0.007$) and anti-CMV titers.

Figure 5. Correlation between IgG anti-CMV titers and immunosenescence markers in healthy controls. Figures (A – E) show the positive correlation between CD3+CD56+ ($r_s = 0.57$, $p < 0.001$), CD4+CD27+CD28+ ($r_s = 0.43$, $p = 0.01$), CD8+CD27+CD28+ ($r_s = 0.49$, $p = 0.06$), CD4+CD27-CD28+ ($r_s = 0.42$, $p = 0.01$) and CD8+CD27-CD28+ ($r_s = 0.39$, $p = 0.03$) and anti CMV –IgG titers. Figure (F-G) show inverse correlations between CD3+CD103+ ($r_s = -0.47$, $p = 0.09$) and CD4+CD27-CD28- ($r_s = -0.44$, $p = 0.02$) and IgG anti-CMV titers.

Table 1. Demographic and clinical data of studied groups.

	Controls (n =27)	CM+ (n=15)	CM- (n =14)	Statistics	Pairwise Comparison
Age (years)	40.3 ± 10.3	50.4 ± 9.9	49.4 ± 11.8	F = 5.9, p= 0.005	b and c > a
Education (years)	18.0 ± 4.0	9.9 ± 4.31	13.7 ± 5.13	F = 15.2, p<0.001	b and c < a
Income, monthly (US\$)	2364.6 ± (357.7)	686.4 ± 100.1	502.9 ± 95.7	K-W= 28.4, p<0.001	b and c < a
Ethnicity (%Caucasian)	26 (96.3)	10 (66.7)	10 (71.4)	X ² = 6.2, p=0.04	
Family History (yes)	-	5 (35.7)	8 (61.5)	X ² = 1.8, p=0.40	
Cancer stage					
Stage I	-	7	5		
Stage II	-	2	5	X ² = 1.8, p=0.40	
Stage III	-	6	4		
BDI-II	6.2 ± 4.0	9.1 ± 5.5	8.3 ± 6.3	F=1.7, p=0.19	
CTQ	29.1 ± 0.8	53.5 ± 3.4	29.9 ± 1.1	K-W = 28.4, p<0.001	a and c < b

Data shown as Mean ± SD. CM+, Breast Cancer Women with history of Childhood Maltreatment; CM-, Breast Cancer Women without history of Childhood Maltreatment; BDI, Beck Depression Inventory; CTQ, Childhood Trauma Questionnaire.
F, ANOVA; X², chi-squared; K-W, kruskal wallis.

Table 2: Immunophenotyping of major lymphocyte subsets.

Markers	Cell Type	Controls	CM+	CM-	Statistics (Wald)	P-value
CD3+CD4+	Th	45.4±2.5 ^a	41.1±3.7	33.0±2.3 ^b	14.2	< 0.001
CD4/CD8	Ratio	2.2±0.2	2.3±0.4	1.6±0.1	4.5	0.106
CD3+CD8+	Tc	23.7±1.6	21.3± 3.2	24.1±2.7	0.4	0.798
CD3-CD19+	B	13.8±0.9	10.0±1.2 ^a	15.4±1.8 ^b	7.7	0.021
CD3-CD56+	NK	8.9±0.8	8.3±1.0	7.1±0.8	2.2	0.327
CD3+CD56+	NK T	6.6±0.7	4.6±0.7	6.2±1.1	2.6	0.271
CD3+CD57+	NK	11.8±1.3	7.2±1.6	10.6±1.6	3.8	0.145
CD3+CD4+CD25+	Activated T cell	2.1±0.1	2.6±0.1	2.4 ±0.1	2.7	0.251
CD3+CD8+CD25+	Activated T cell	0.6±0.1	0.8±0.2	0.7±0.1	2.1	0.346
CD3+CD69+	Activated T cell	1.3±0.1 ^a	1.9±0.1 ^b	1.8±0.1 ^b	23.3	< 0.0001
CD4+CD103+	Regulatory T cell	0.4±0.2 ^a	1.3±0.1 ^b	1.4±0.1 ^b	194.8	< 0.0001
CD8+CD103+	Regulatory T cell	0.7±0.1	0.7±0.2	0.6±0.2	0.8	0.663

Data shown as mean ± SE. Data were analyzed by GzLM test (gamma or linear distribution) adjusted for age and years of education.

Superscript letters ^{a,b} indicate differences between groups (Bonferroni post hoc test).

CM+, Breast Cancer Women with history of Childhood Maltreatment; CM-, Breast Cancer Women without history of Childhood Maltreatment; Th = helper T cell; Tc = cytotoxic T cell; NK = Natural Killer cell.

Table 3: Different stages of T-cell differentiation and senescence-related markers.

Markers	Cell Type	Controls	CM +	CM -	Statistics (Wald)	P-value
CD4+CD27+CD28+	Early-differentiated T cell	42.0±4.6 ^a	17.5±3.9 ^b	19.2±3.9 ^b	17.6	< 0.0001
CD8+CD27+CD28+	Early-differentiated T cell	27.9±3.3 ^a	8.7±1.2 ^b	12.0±2.9 ^b	38.1	< 0.0001
CD4+CD27-CD28+	Intermediate-differentiated T cell	8.74±1.1 ^a	25.0±8.8 ^b	25.7±8.2 ^b	12.9	0.002
CD8+CD27-CD28+	Intermediate-differentiated T cell	7.1±0.9	6.9±2.1	8.0±1.8	0.2	0.880
CD4+CD27-CD28-	Late-differentiated T cell	13.9±1.2 ^a	21.8±2.1 ^b	22.9±1.5 ^b	19.8	< 0.0001
CD8+CD27-CD28-	Late-differentiated T cell	39.4±3.4	34.4±4.6	42.8±5.5	1.6	0.431
CD3+CD56+NKG2+ ^c	Senescent NK T cell	0.5±0.1	0.6±0.1	0.7±0.3	3.4	0.179
CD3+CD4+KLRG1+ ^d	Senescent T cell	5.1±0.8	10.7±3.0	11.5±4.0	3.4	0.183
CD3+CD8+KLRG1+ ^d	Senescent T cell	8.7±0.9	6.1±0.9 ^a	9.3±1.5 ^b	8.7	0.013
CD4+KLRG1+NKG2+ ^d	Senescent T cell	5.96±2.8	19.0±4.0	21.0±4.5	5.4	0.065
CD8+KLRG1+NKG2+ ^d	Senescent T cell	6.0±0.8 ^a	20.0±3.9 ^b	24.9±7.7 ^b	17.1	< 0.0001
CD8+CD27-CD28-PD1+ ^e	Exhausted T cell	7.6±2.5 ^a	78.3±10.0 ^b	97.8±9.7 ^b	55.5	< 0.0001

Data shown as mean ± standard error (SE).

Data were analyzed by GzLM test (gamma or linear distribution) adjusted for age and years of education.

Superscript letters ^{a,b} indicate differences between groups (Bonferroni post hoc test).

CM+, Breast Cancer Women with history of Childhood Maltreatment; CM-, Breast Cancer Women without history of Childhood Maltreatment; NK = Natural Killer cell.

Table 4: Expression of activated and regulatory markers as determined by the mean fluorescence intensity (MFI).

Markers	Controls	CM+	CM -	Statistics (Wald)	P-value
CD3+					
CD19	4894 ± 645	4439 ± 871	4128 ± 948	0.47	0.790
CD69	358 ± 33	487 ± 78	423 ± 65	3.01	0.222
CD4+					
CD103	384 ± 33 ^a	854 ± 139 ^{a,b}	568 ± 95 ^b	19.92	<0.0001
CD27	4024 ± 244 ^{a,b}	3088 ± 200 ^a	2869 ± 286 ^b	12.84	0.002
CD28	3109 ± 316	2638 ± 351	2171 ± 281	4.78	0.091
CD8+					
KLRG1	2638 ± 237	2964 ± 383	2897 ± 95	0.95	0.954
NKG2	1746 ± 334 ^a	3893 ± 344 ^{a,b}	1603 ± 377 ^b	26.9	<0.0001
PD1	2667 ± 123	2876 ± 154	2956 ± 165	1.67	0.756
CD27	3965 ± 223 ^{a,b}	2978 ± 265 ^a	2804 ± 290 ^b	13.6	0.001
CD28	2543 ± 215 ^{a,b}	1217 ± 118 ^a	1489 ± 177 ^b	25.3	<0.0001

Data shown as mean MFI ± SE. Data were analyzed by GzLM (linear or gamma distribution) adjusted for age and education years. Superscript letters ^{a,b} indicate differences between groups (Bonferroni post hoc test).

FIGURE 1

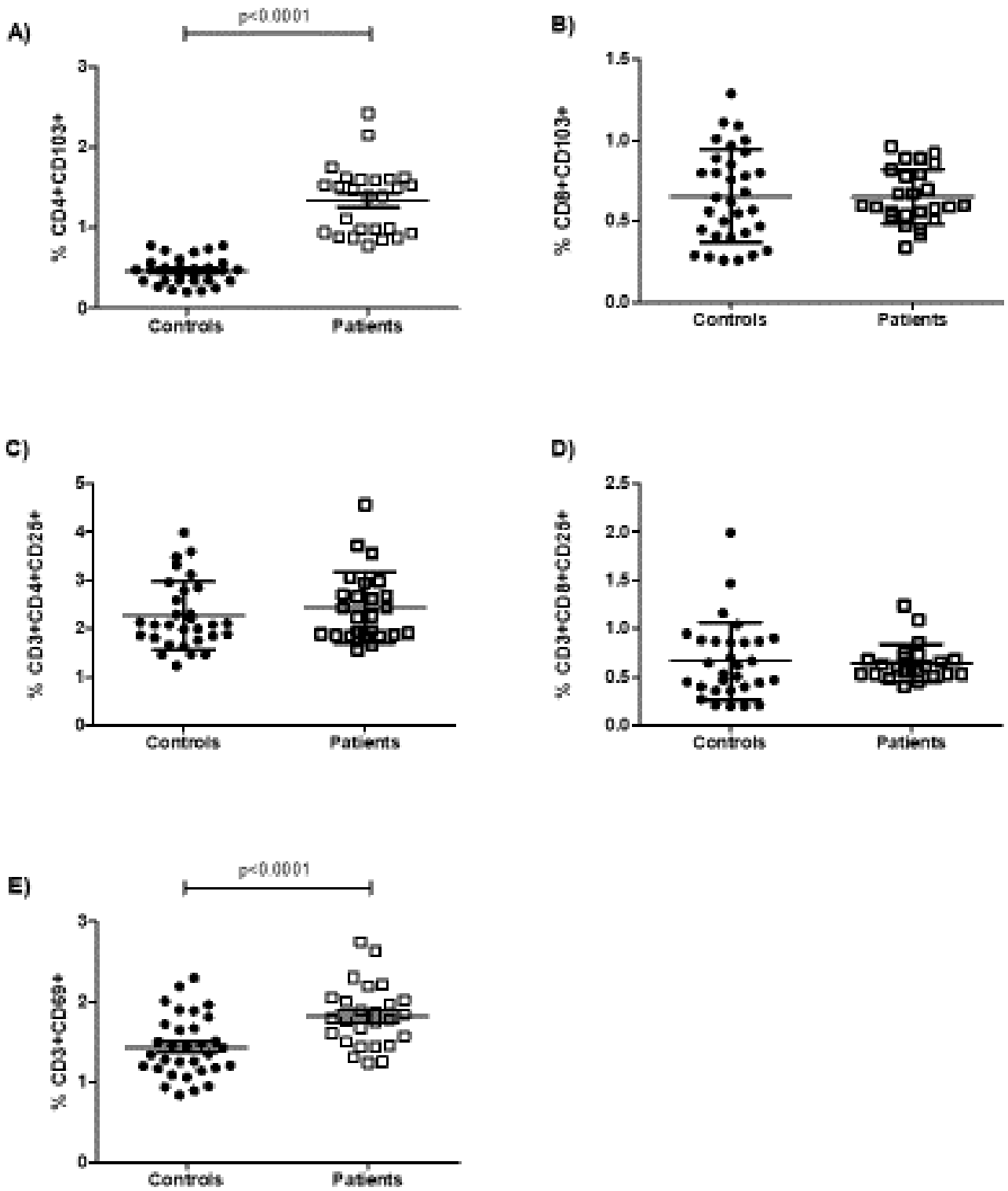


FIGURE 2

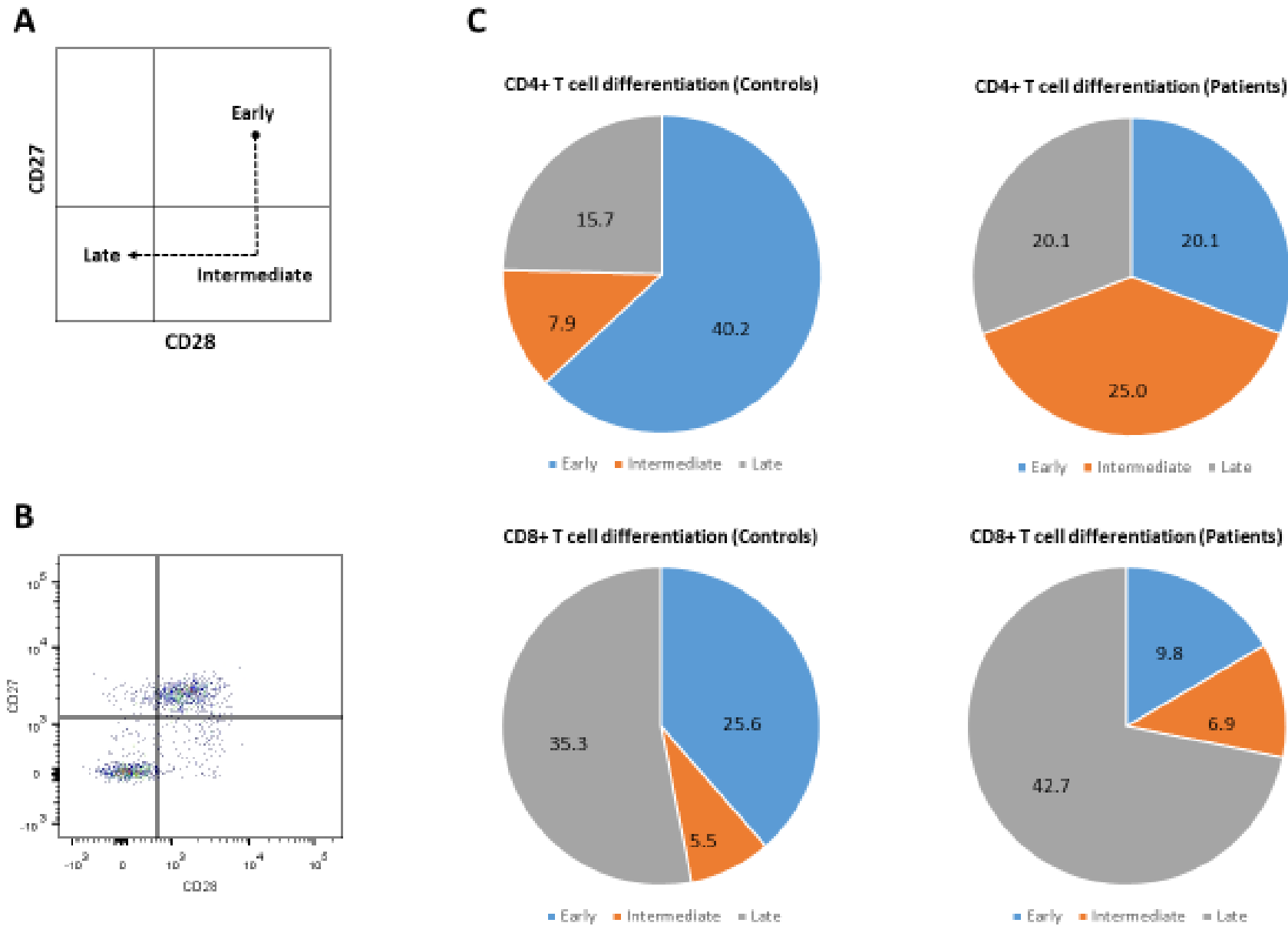


FIGURE 3

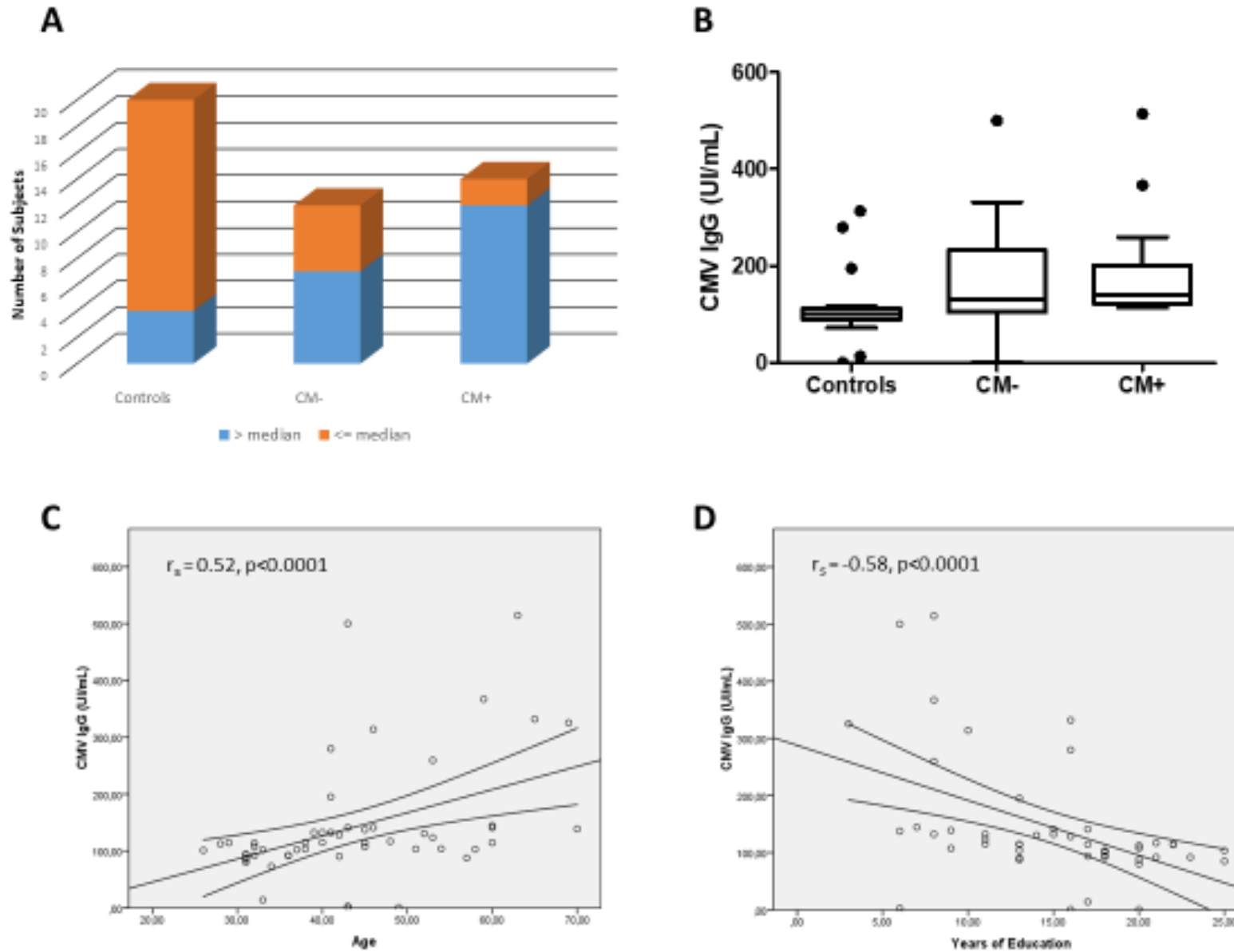


FIGURE 4

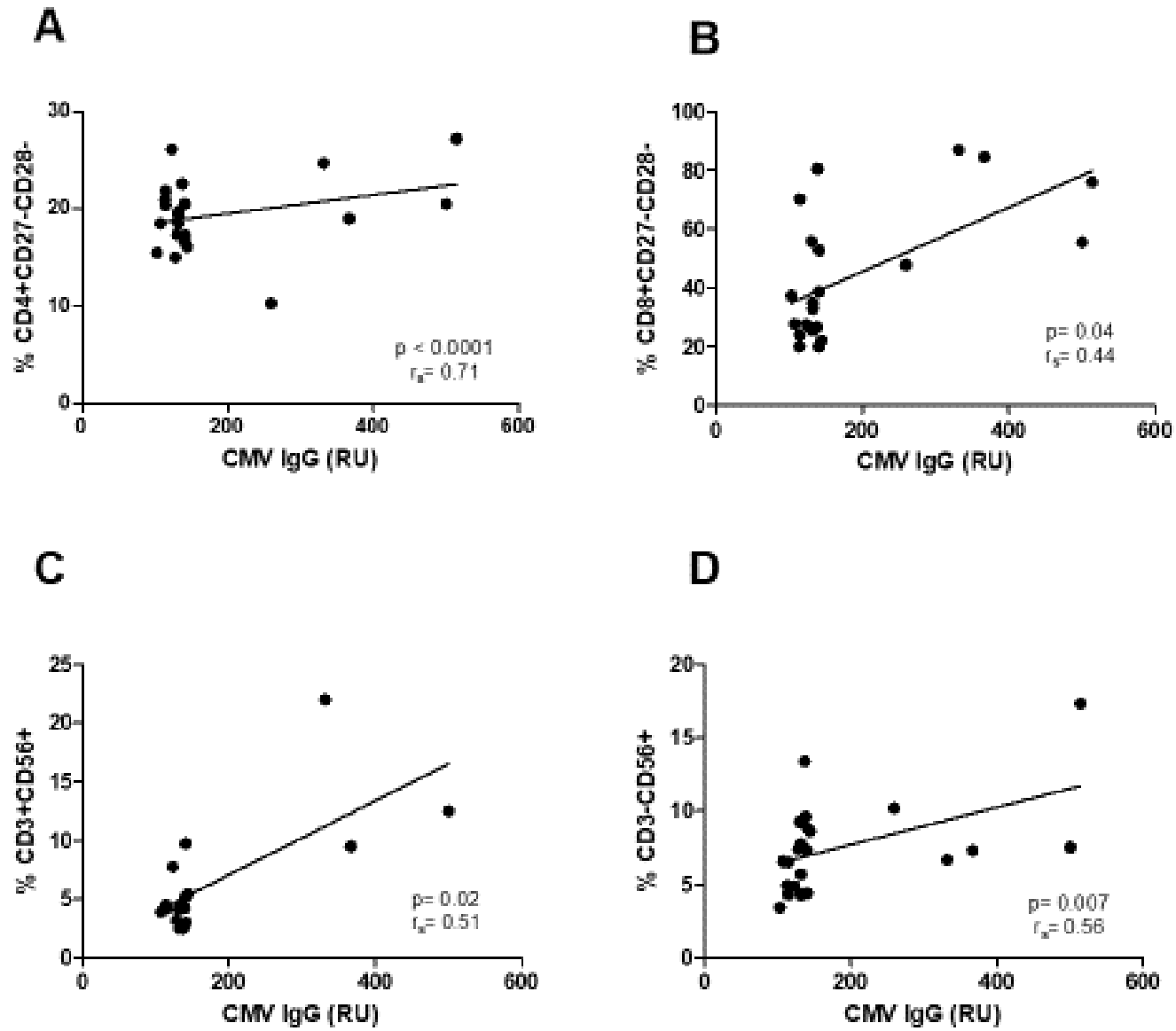
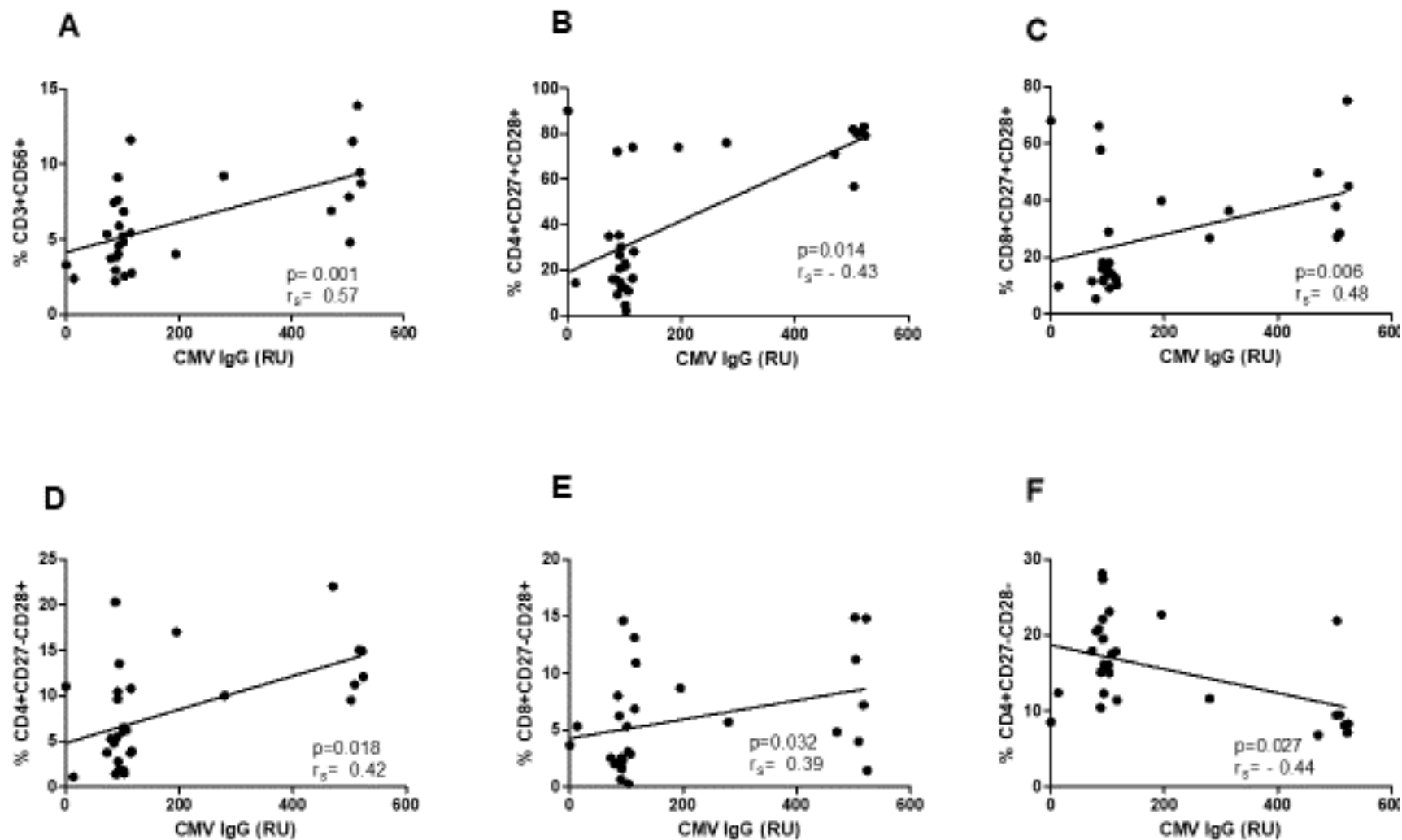


FIGURE 5



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários estudos avaliam a relação entre marcadores linfocitários e câncer de mama, sendo geralmente abordados temas relacionados a terapias imunológicas ou resposta ao tratamento. Além disso, reativações de vírus latentes como o CMV, também são assuntos extremamente abordados nesses pacientes. Entretanto, até onde sabemos, nenhum estudo avaliou a presença de marcadores de imunossenescência, subtipos linfocitários e CMV, em uma população de mulheres com câncer de mama antes de iniciar o tratamento e considerando a presença de maus tratos.

A exposição a eventos estressores no período de desenvolvimento infantil pode acarretar em uma maior prevalência de doenças crônicas da idade adulta e no desenvolvimento de alterações em sistemas envolvidos na regulação do estresse. A desregulação do sistema imunológico relacionado a presença de maus tratos na infância, geralmente acarreta em um aumento de citocinas pró inflamatórias, reativações de infecções virais latentes e em uma estimulação do processo de imunossenescência. Além disso, esses adultos quando confrontados com novas experiências traumáticas, como o diagnóstico do câncer de mama, tendem a apresentar uma resposta ao estresse mais exacerbada. Entretanto, em nosso estudo esses achados não foram presenciados, sugerindo que a presença de maus tratos não está relacionada com um perfil de envelhecimento imunológico precoce em mulheres com câncer de mama. Porém, quando avaliado apenas as relações entre mulheres com câncer de mama e controles saudáveis, esse perfil torna-se evidente.

Um primeiro fato a ser destacado em nosso estudo está relacionado ao período de coleta das amostras, visto que as pacientes com câncer de mama não estavam realizando nenhum procedimento de tratamento, dessa forma, os resultados não sofreram este viés nas análises. A maioria dos estudos que abordam subtipos linfocitários e câncer de mama, relacionados com maus tratos, frequentemente envolvem pacientes em tratamento ou em seu término, o que poderia explicar nossa diferença de resultado. Visto que, procedimentos como quimioterapia e radioterapia podem acarretar em danos ao sistema

imunológico, facilitando reativação de infecções latentes e estimulando ou não subtipos linfocitários.

Em relação a presença de um perfil senescente em mulheres com câncer de mama, nossos dados corroboram com estudos anteriores. Observamos a presença de um aumento significativo das células T CD27-CD28- em mulheres com câncer de mama e como consequência uma diminuição de células CD27+CD28+, demonstrando um perfil de senescência celular. Além disso, a presença de marcadores de exaustão celular, como PD1 encontra-se aumentado nessas pacientes, enfatizando ainda mais a presença da imunossenescência.

Logo, visto que a associação entre mulheres com câncer de mama expostas a maus tratos e um perfil de imunossenescência não foi observado em nosso estudo, presume-se que sejam necessários novas pesquisas para dar sequência a esta investigação, uma vez que o presente estudo apresenta algumas limitações e possibilidades não avaliadas.

7 Conclusões

Levando em consideração o exposto, os achados desse trabalho corroboram com estudos anteriores envolvendo a presença de um perfil de senescência em mulheres com câncer de mama. Entretanto, nosso estudo não obteve resultados relevantes em relação a presença de maus tratos. Logo, é necessário a aplicação de mais investigações que possam compreender a influência desse estresse precoce em relação ao sistema imunológico e com isso obter dados relevantes para desenvolvimento de estratégias de prevenção, visto que o desenho experimental deste estudo não permitiu responder essa questão. Para abordagens futuras seria relevante realizar a avaliação do perfil inflamatório dessas mulheres, tendo em vista a sua forte associação com a senescência celular, além de realizar um acompanhamento durante e pós o tratamento, avaliando se a presença de maus tratos na infância influencia o prognóstico da doença.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, B. L.; KIECOLT-GLASER, J. K.; GLASER, R. A biobehavioral model of cancer stress and disease course. **Am Psychol**, v. 49, n. 5, p. 389-404, 1994.

BAUER, M. E. et al. Neuroendocrine and viral correlates of premature immunosenescence. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1351, p. 11-21, 2015.

BERENS, A. E.; JENSEN, S. K. G.; NELSON, C. A., 3RD. Biological embedding of childhood adversity: from physiological mechanisms to clinical implications. **BMC Med**, v. 15, n. 1, p. 135, 2017.

BOWER, J. E.; CROSSWELL, A. D.; SLAVICH, G. M. Childhood Adversity and Cumulative Life Stress: Risk Factors for Cancer-Related Fatigue. **Clin Psychol Sci**, v. 2, n. 1, 2014.

CAMPOS, C. et al. Effect of age and CMV on NK cell subpopulations. **Exp Gerontol**, v. 54, p. 130-7, 2014.

CHEN, X. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immunity. **Int Immunopharmacol**, v. 34, p. 244-9, 2016.

CHEN, Y.-J.; LIAO, H.-F. NK/NKT Cells and Aging. **International Journal of Gerontology**, v. 1, n. 2, p. 65-76, 2007.

CIMINO-MATHEWS, A.; FOOTE, J. B.; EMENS, L. A. Immune targeting in breast cancer. **Oncology (Williston Park)**, v. 29, n. 5, p. 375-85, 2015.

COELHO, R. et al. Childhood maltreatment and inflammatory markers: a systematic review. **Acta Psychiatr Scand**, v. 129, n. 3, p. 180-92, 2014.

COHEN, J. R. et al. The distal consequences of physical and emotional neglect in emerging adults: A person-centered, multi-wave, longitudinal study. **Child Abuse Negl**, v. 63, p. 151-161, 2017.

CROSSWELL, A. D.; BOWER, J. E.; GANZ, P. A. Childhood adversity and inflammation in breast cancer survivors. **Psychosom Med**, v. 76, n. 3, p. 208-14, 2014.

DANESE, A.; BALDWIN, J. R. Hidden Wounds? Inflammatory Links Between Childhood Trauma and Psychopathology. **Annu Rev Psychol**, v. 68, p. 517-544, 2017.

DERHOVANESSIAN, E.; LARBI, A.; PAWELEC, G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. **Curr Opin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 440-5, 2009.

E. BAUER, M. et al. **Neuroendocrine and viral correlates of premature immunosenescence: Bauer et al.** 2015.

EHRlich, K. B. et al. Testing the biological embedding hypothesis: Is early life adversity associated with a later proinflammatory phenotype? **Dev Psychopathol**, v. 28, n. 4pt2, p. 1273-1283, 2016.

ELWENSPOEK, M. M. C. et al. The effects of early life adversity on the immune system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 82, p. 140-154,

ELWENSPOEK, M. M. C. et al. The effects of early life adversity on the immune system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 82, p. 140-154, 2017.

FAGUNDES, C. P.; GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. **Brain Behav Immun**, v. 27, n. 1, p. 8-12, 2013.

FAGUNDES, C. P. et al. Childhood adversity and herpesvirus latency in breast cancer survivors. **Health Psychol**, v. 32, n. 3, p. 337-44, 2013.

FAGUNDES, C. P. et al. Child maltreatment and breast cancer survivors: social support makes a difference for quality of life, fatigue and cancer stress. **Eur J Cancer**, v. 48, n. 5, p. 728-36, 2012.

FALANDRY, C.; GILSON, E.; RUDOLPH, K. L. Are aging biomarkers clinically relevant in oncogeriatrics? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 85, n. 3, p. 257-65, 2013.

FORNARA, O. et al. Human cytomegalovirus particles directly suppress CD4 T-lymphocyte activation and proliferation. **Immunobiology**, v. 218, n. 8, p. 1034-40, 2013.

GOLDSMITH, R. E. et al. Traumatic stress symptoms and breast cancer: the role of childhood abuse. **Child Abuse Negl**, v. 34, n. 6, p. 465-70, 2010.

GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. **Arthritis Res Ther**, v. 5, n. 5, p. 225-34, 2003.

GUNNAR, M.; QUEVEDO, K. The neurobiology of stress and development. **Annu Rev Psychol**, v. 58, p. 145-73, 2007.

HEIKKINEN, S. et al. Impact of major life events on breast-cancer-specific mortality: A case fatality study on 8000 breast cancer patients. **Cancer Epidemiol**, v. 48, p. 62-69, 2017.

HENSON, S. M.; AKBAR, A. N. KLRG1--more than a marker for T cell senescence. **Age (Dordr)**, v. 31, n. 4, p. 285-91, 2009.

- HERBEIN, G.; KUMAR, A. The oncogenic potential of human cytomegalovirus and breast cancer. **Front Oncol**, v. 4, p. 230, 2014.
- JANICKI-DEVERTS, D. et al. Childhood environments and cytomegalovirus serostatus and reactivation in adults. **Brain Behav Immun**, v. 40, p. 174-81, 2014.
- JIANG, X.; SHAPIRO, D. J. The immune system and inflammation in breast cancer. **Mol Cell Endocrinol**, v. 382, n. 1, p. 673-82, 2014.
- KELLY-IRVING, M. et al. Childhood adversity as a risk for cancer: findings from the 1958 British birth cohort study. **BMC Public Health**, v. 13, p. 767, 2013.
- MALAGUARNERA, L.; CRISTALDI, E.; MALAGUARNERA, M. The role of immunity in elderly cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 74, n. 1, p. 40-60, 2010.
- MALAGUARNERA, L. et al. Immunosenescence and cancer: a review. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 32, n. 2, p. 77-93, 2001.
- MANSER, A. R.; UHRBERG, M. Age-related changes in natural killer cell repertoires: impact on NK cell function and immune surveillance. **Cancer Immunol Immunother**, v. 65, n. 4, p. 417-26, 2016.
- MCFARLAND, D. C. et al. Early Childhood Adversity and its Associations With Anxiety, Depression, and Distress in Women With Breast Cancer. **Psychosomatics**, v. 57, n. 2, p. 174-84, 2016.
- MOREY, J. N. et al. Current Directions in Stress and Human Immune Function. **Curr Opin Psychol**, v. 5, p. 13-17, 2015.
- NUSSLOCK, R.; MILLER, G. E. Early-Life Adversity and Physical and Emotional Health Across the Lifespan: A Neuroimmune Network Hypothesis. **Biol Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 23-32, 2016.
- PAWELEC, G.; DERHOVANESSIAN, E.; LARBI, A. Immunosenescence and cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 75, n. 2, p. 165-72, 2010.
- RAMIRO, L. S.; MADRID, B. J.; BROWN, D. W. Adverse childhood experiences (ACE) and health-risk behaviors among adults in a developing country setting. **Child Abuse Negl**, v. 34, n. 11, p. 842-55, 2010.
- SANSONI, P. et al. New advances in CMV and immunosenescence. **Exp Gerontol**, v. 55, p. 54-62, 2014.
- SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. **J Clin Invest**, v. 117, n. 5, p. 1137-46, 2007.

TAVENIER, J. et al. Immunosenescence of the CD8(+) T cell compartment is associated with HIV-infection, but only weakly reflects age-related processes of adipose tissue, metabolism, and muscle in antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients and controls. **BMC Immunol**, v. 16, p. 72, 2015.

WITEK JANUSEK, L. et al. Childhood adversity increases vulnerability for behavioral symptoms and immune dysregulation in women with breast cancer. **Brain Behav Immun**, v. 30 Suppl, p. S149-62, 2013.

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo A) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE PRECOCE, FATORES PSICONEUROIMUNOENDÓCRINOS E TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada “RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE PRECOCE, FATORES PSICONEUROIMUNOENDÓCRINOS E TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA”, coordenada pelo pesquisador Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira, do Programa de Pós-Graduação em Psicologia da PUCRS, que tem por objetivo verificar a possível relação entre a ocorrência de algum tipo de estresse precoce e a evolução do tratamento de câncer de mama. Para tanto é necessário que você preencha alguns questionários que durarão em média 40 minutos. Será também solicitado que você realize uma coleta de sangue (20 ml, a mesma quantidade que uma colher de sopa) antes do início de seu tratamento para o câncer. Este sangue será guardado no Laboratório de Imunologia do Envelhecimento da PUCRS e será utilizado para investigar a quantidade de substâncias relacionadas ao sistema imunológico. Seu nome não será identificado, porém haverá em qualquer momento a possibilidade de identificação desta amostra por meio de um código de que ficará sob tutela do Prof. Rodrigo Grassi-Oliveira. Na hora da punção, você sentirá uma leve picada que não irá doer mais que uma mordida de inseto. A coleta será realizada por um profissional treinado e experiente.

A participação nesse estudo é voluntária e não relacionada ao seu tratamento, e se você decidir não participar ou quiser desistir de continuar em qualquer momento, tem absoluta liberdade de fazê-lo, não implicando de forma alguma em algum prejuízo pessoal. Na publicação dos resultados desta pesquisa, sua identidade será mantida no mais rigoroso sigilo. Serão omitidas todas as informações que permitam identificá-lo(a). Os maiores desconfortos para você serão o de ocasionar algum mal-estar emocional por discutir determinados assuntos durante o questionário que aborda questões relacionadas às lembranças de sua infância e a ocorrência de alguma dor e inchaço local após a realização da punção para a coleta de sangue, mas que em seguida será resolvida com a ajuda do profissional coletador. Os benefícios serão os de auxiliar os clínicos a identificarem possíveis fatores de risco associados ao tratamento de câncer de mama,

possibilitando a utilização de intervenções precoces para amenizar os efeitos destes riscos, bem como tornar possível uma melhor avaliação de como se dá o tratamento de câncer de mama e a sua evolução frente a um histórico de estresse precoce. Além disso, caso em sua avaliação forem identificados transtornos relacionados a situações de trauma e ajustamento, será oferecido acompanhamento psicológico pela equipe do Núcleo de Estudos e Pesquisa em Trauma e Estresse (NEPTE) da Faculdade de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) até o período necessário (em média 1 ano).

Eu,.....fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informações a respeito da pesquisa e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participação se assim eu o desejar.

Quaisquer dúvidas relativas a esta pesquisa poderão ser esclarecidas pelo pesquisador responsável Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira, fone (51) 3320-3500, ramal 7740, ou pela entidade responsável, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, localizado na Av. Ipiranga 6690, Prédio 40, Sala 505, Porto Alegre /RS, Brasil, CEP: 90619-900, Fone/Fax: (51) 3320.3345. E-mail: cep@pucrs.br. Horário de atendimento: De segunda a sexta-feira das 8h30 às 12h horas e das 13h30min às 17h.

Declaro que recebi este presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias e estou de acordo com as condições aqui citadas.

Nome e assinatura do Pesquisador

Nome e assinatura do Participante

Local e data: _____

Anexo B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Versão Biorepositório)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (BIOREPOSITÓRIO) –
VERSÃO I**

Sujeito de pesquisa nº _____

TÍTULO DA PESQUISA: “Relação entre Estresse Precoce, Fatores Psiconeuroimunoendócrinos e Tratamento do Câncer de Mama”.

Estamos convidando você para participar de uma pesquisa que está sendo realizada pela Faculdade de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, coordenada pelo Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira. Nosso objetivo é verificar a possível relação entre a ocorrência de algum tipo de estresse precoce e a evolução do tratamento de câncer de mama.

Você agora está sendo consultada sobre outros aspectos envolvendo o material biológico coletado (sangue).

Além dos procedimentos explicados no termo anterior, gostaríamos de pedir seu consentimento para que o material biológico (sangue) que você forneceu para estudos seja devidamente guardado e reservado para ser usado em outras investigações futuras.

Por tratar-se de um material rico em informações, ele pode ser analisado em diversos estudos que ainda serão planejados. Esses estudos serão avaliados novamente pelos Comitês de Ética e Pesquisa da PUCRS, e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP. Por isso, entendemos que é importante reservar parte deste material como forma de otimização de custos e esforços.

Caso você decida em consentir com o armazenamento deste material biológico (sangue) é importante saber que:

- a) Você será acompanhado pela equipe da pesquisa ao longo da sua participação.

- b) Você realizará uma coleta de sangue (20 ml cada uma, a mesma quantidade que uma colher de sopa) durante a primeira entrevista realizada. Na hora da punção, sentirá uma leve picada que não irá doer mais que uma mordida de inseto.
- c) O sangue será guardado de forma anônima (sem que o nome seja identificado) no Laboratório de Imunologia do Envelhecimento PUCRS, sob responsabilidade do Prof. Rodrigo Grassi de Oliveira, e com acesso não-permitido a outras pessoas fora da equipe de pesquisa.
- d) Uma parte desse sangue será congelada para ser usada no futuro em outras pesquisas. Porém a cada nova pesquisa, existirá a necessidade de solicitar sua autorização escrita novamente.
- e) Essas pesquisas investigarão a quantidade de alguns hormônios relacionados ao estresse e de outras substâncias relacionadas ao sistema imunológico. Os genes que serão pesquisados estão envolvidos com o sistema de defesa (imunológico), com aspectos relacionados à memória e o sistema hormonal.
- f) O armazenamento obedece às regulamentações do Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nºs 466/12 e 441/11 e 340/04 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.
- g) A participação nesse estudo é voluntária e se você decidir não participar ou quiser desistir de continuar em qualquer momento, tem absoluta liberdade de fazê-lo sem que isso lhe traga nenhum ônus ou prejuízo.
- h) Os dados das pesquisas serão publicados em revistas científicas nacionais ou internacionais, mas qualquer identidade será mantida no mais rigoroso sigilo. Serão omitidas todas as informações que permitam identificação, inclusive sobre dados da sua genética.
- i) Você terá o direito de manter-se atualizado sobre os resultados parciais dessa pesquisa.
- j) Você não terá despesa pessoal em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.
- k) Você terá o direito de retirar, inutilizar e solicitar o descarte do material biológico coletado. Ademais, esse material poderá ser descartado pelos seguintes motivos:

inadequação da amostra por critérios de qualidade, por iniciativa da instituição e por dissolução do biorepositório, a qualquer tempo, mediante sua autorização.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo e concordo voluntariamente em participar deste estudo. Para a realização de futuros trabalhos, consinto em ser consultado, através de meus dados de contato, que constarão neste mesmo TCLE.

Quaisquer dúvidas relativas à pesquisa e conhecimentos sobre os resultados poderão ser esclarecidas pelos pesquisadores no telefone (51) 3320.3500, ramal 7740, ou celular (51) 91695168, ou pela entidade responsável – Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, fone (51) 3320.3345.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira

Matrícula: 082819

Local e data

Consinto em permitir a minha participação neste estudo e declaro ter recebido duas vias deste termo de consentimento.

Nome e assinatura do participante

Local e data

Anexo C) Questionário Sócio Demográfico

QUESTIONÁRIO SÓCIO-DEMOGRÁFICO

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
ANO		MÊS		DIA		SUJ.		PESQ.	

Nome do Participante: _____

Idade: _____

Data de Aniversário: ___/___/___

Sexo: () M () F

Peso: _____ Kg

Qual a sua etnia (raça)?

() Branco

() Pardo

() Negro

() Outra: _____

Você tem filho (s)? () Sim () Não

Quantos filhos? _____

Qual a idade dos seus filhos? _____

Em qual cidade e estado você mora?

Qual o nível mais alto de escolaridade que você já alcançou?

() 8^a série ou menos

() Ensino Médio Incompleto

() Ensino Médio Completo

() Ensino Superior Incompleto

() Ensino Superior Completo

() Pós-graduação

Quantos anos de estudo você tem? _____ anos

Quantas repetências durante este período? _____ repetências

Qual o seu estado civil atualmente?

- Solteira
- Casada
- Viúva
- Separada

Você está em algum trabalho remunerado atualmente?

- Sim Não

Qual o seu status de trabalho atualmente?

- Emprego de tempo integral (6 a 8 horas)
- Emprego de meio período (4 a 6 horas)
- Desempregado
- Trabalhos domésticos
- Aposentada

Qual a sua renda familiar (em média)?

- Até um salário mínimo
 - Um salário mínimo
 - Mais de um salário mínimo
 - Acima de três salários mínimos
- Valor.....

Ciclo Menstrual:

- Pré Menopausa
- Pós Menopausa

Histórico de Câncer de Mama:



Data: _____

Nome: _____ Estado Civil: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Ocupação: _____ Escolaridade: _____

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve **melhor** a maneira que você tem se sentido na **última semana, incluindo hoje**. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. **Tome o cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer a sua escolha.**

<p>1 0 Não me sinto triste. 1 Eu me sinto triste. 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto. 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.</p> <p>2 0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro. 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro. 2 Acho que nada tenho a esperar. 3 Acho o futuro sem esperança e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar.</p> <p>3 0 Não me sinto um fracasso. 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum. 2 Quando olho para trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos. 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso.</p> <p>4 0 Tenho tanto prazer em tudo como antes. 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes. 2 Não encontro um prazer real em mais nada. 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.</p> <p>5 0 Não me sinto especialmente culpado. 1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo. 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo. 3 Eu me sinto sempre culpado.</p> <p>6 0 Não acho que esteja sendo punido. 1 Acho que posso ser punido. 2 Creio que vou ser punido. 3 Acho que estou sendo punido.</p> <p>7 0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo. 1 Estou decepcionado comigo mesmo. 2 Estou enojado de mim. 3 Eu me odeio.</p>	<p>8 0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros. 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros. 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas. 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece.</p> <p>9 0 Não tenho quaisquer idéias de me matar. 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria. 2 Gostaria de me matar. 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade.</p> <p>10 0 Não choro mais que o habitual. 1 Choro mais agora do que costumava. 2 Agora, choro o tempo todo. 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queira.</p> <p>11 0 Não sou mais irritado agora do que já fui. 1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava. 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo. 3 Não me irrita mais com coisas que costumavam me irritar.</p> <p>12 0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas. 1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar. 2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas. 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas.</p> <p>13 0 Tomo decisões tão bem quanto antes. 1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava. 2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes. 3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões.</p>
---	---

_____ Subtotal da Página 1 CONTINUAÇÃO NO VERSO

“Traduzido e adaptado por permissão de The Psychological Corporation, U.S.A. Direitos reservados ©1991, a Aaron T. Beck.

Tradução para a língua portuguesa. Direitos reservados ©1993 a Aaron T. Beck. Todos os direitos reservados.”

Tradução e adaptação brasileira, 2001, Casa do Psicólogo Livraria e Editora Ltda.

BDI é um logótipo da Psychological Corporation.

Apêndice B) QUESI

QUESI

Identificação: _____

Idade: _____ Sexo: _____

As afirmações abaixo se referem a algumas experiências de quando você era criança ou adolescente.

Embora estas afirmações sejam de natureza pessoal, por favor, responda o mais sinceramente possível.

Para cada afirmação, circule a resposta que melhor descreve o que você acha que ocorreu enquanto crescia.

Se você desejar mudar sua resposta, coloque um X na antiga e circule a nova escolha.

Enquanto eu crescia...	Nunca	Poucas Vezes	Às Vezes	Muitas Vezes	Sempre
1. Eu não tive o suficiente para comer.	●	●	●	●	●
2. Eu soube que havia alguém para me cuidar e proteger.	●	●	●	●	●
3. As pessoas da minha família me chamaram de coisas do tipo "estúpido (a)", "preguiçoso (a)" ou "feio (a)".	●	●	●	●	●
4. Meus pais estiveram muito bêbados ou drogados para poder cuidar da família.	●	●	●	●	●
5. Houve alguém na minha família que ajudou a me sentir especial ou importante.	●	●	●	●	●
6. Eu tive que usar roupas sujas.	●	●	●	●	●
7. Eu me senti amado (a).	●	●	●	●	●
8. Eu achei que meus pais preferiam que eu nunca tivesse nascido.	●	●	●	●	●
9. Eu apanhei tanto de alguém da minha família que tive de ir ao hospital ou consultar um médico.	●	●	●	●	●
10. Não houve nada que eu quisesse mudar na minha família.	●	●	●	●	●
11. Alguém da minha família me bateu tanto que me deixou com machucados roxos.	●	●	●	●	●
12. Eu apanhei com cinto, vara, corda ou outras coisas que machucaram.	●	●	●	●	●
13. As pessoas da minha família cuidavam umas das outras.	●	●	●	●	●
14. Pessoas da minha família disseram coisas que me machucaram ou me ofenderam.	●	●	●	●	●
15. Eu acredito que fui maltratado (a) fisicamente.	●	●	●	●	●
16. Eu tive uma ótima infância.	●	●	●	●	●
17. Eu apanhei tanto que um professor, vizinho ou médico chegou a notar.	●	●	●	●	●
18. Eu senti que alguém da minha família me odiava.	●	●	●	●	●
19. As pessoas da minha família se sentiam unidas.	●	●	●	●	●
20. Tentaram me tocar ou me fizeram tocar de uma maneira sexual.	●	●	●	●	●
21. Ameaçaram me machucar ou contar mentiras sobre mim se eu não fizesse algo sexual.	●	●	●	●	●
22. Eu tive a melhor família do mundo.	●	●	●	●	●
23. Tentaram me forçar a fazer algo sexual ou assistir coisas sobre sexo.	●	●	●	●	●
24. Alguém me molestou.	●	●	●	●	●
25. Eu acredito que fui maltratado (a) emocionalmente.	●	●	●	●	●
26. Houve alguém para me levar ao médico quando eu precisei.	●	●	●	●	●
27. Eu acredito que fui abusado (a) sexualmente.	●	●	●	●	●
28. Minha família foi uma fonte de força e apoio.	●	●	●	●	●

Apêndice C) Carta de Autorização

CARTA DE AUTORIZAÇÃO

À
Comissão Científica da Faculdade de Psicologia e
Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS

Porto Alegre, 18 de Junho de 2016

Prezados Senhores

Eu, SENGIO LAGO,

Coordenador do Serviço de Oncologia da PUCRS do
HOSPITAL SÃO LUCAF DA PUCRS,

conheço o Projeto
de Pesquisa **"Relação entre Estresse Precoce, Fatores
Psiconeuroimunoendócrinos e Tratamento do Câncer de Mama"** do(s)
Pesquisador(es) Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira e Lucas Poitevin Bandinelli,
e autorizo a coleta de dados nessa Instituição, após aprovação do referido
projeto pelo(s) órgão(s) competentes (Comitê de Ética em Pesquisa, Comissões
Científicas...).

Atenciosamente,



Assinatura

Nome por extenso: SENGIO LAGO
RG e CPF: 8000619836 - 181.732-170-68
Telefone e e-mail: 33365423 - lago.sergio41@yahoo.com
(Carimbo se aplicável)

Dr. Sergio Lago
CREMERS 1997
Credenciado em Psicologia

Apêndice E) Carta de Anuência

Porto Alegre, 21 de julho de 2016

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Declaro a anuência do desenvolvimento do subprojeto intitulado "*Imunosenesescência em mulheres com câncer de mama expostas a maus tratos na infância*", coordenado pelo Prof. Dr. Moisés Bauer no IPB/IGG. O referido projeto faz parte de um projeto guarda-chuva intitulado "*Relação entre estresse precoce, fatores psiconeuroimunoendócrinos e tratamento do câncer de mama*". Este projeto é coordenado por mim (SIPESQ No. 6759), e já foi apreciado e aprovado pelo CEP PUCRS e devidamente registrado na Plataforma Brasil (No. 48889815.5.0000.5336 3). A equipe é também integrada por dois alunos de Mestrado (Lucas Bandidelli e Lauren Trintinaglia) e pelo Prof. Moisés.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira
FAPSI

Apêndice F) Submissão Artigo



Lauren Trintinaglia <laurenttrintinaglia@gmail.com>

ENC: Frontiers: Your manuscript submission - 386822

1 mensagem

Moises Evandro Bauer <mebauer@pucrs.br>
Para: Lauren Trintinaglia <laurenttrintinaglia@gmail.com>
Cc: "jaqbs.bio@gmail.com" <jaqbs.bio@gmail.com>

18 de abril de 2018 14:48

-----Mensagem original-----

De: Frontiers Immunology Editorial Office [mailto:immunology.editorial.office@frontiersin.org]
Enviada em: quarta-feira, 18 de abril de 2018 14:27
Para: Moises Evandro Bauer <mebauer@pucrs.br>
Assunto: Frontiers: Your manuscript submission - 386822

Dear Dr Bauer,

We are pleased to inform you that we have received the manuscript ""PREMATURE IMMUNOSENESCENCE IN WOMEN NEWLY DIAGNOSED WITH BREAST CANCER – ROLE OF EARLY-LIFE STRESS"" to be considered for publication in Frontiers in Immunology, section Cancer Immunity and Immunotherapy.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript.

Kind regards,

Your Frontiers in Immunology team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team www.frontiersin.org Avenue du Tribunal Fédéral 34,
Lausanne, Switzerland
Office T 41 21 510 17 25

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org); Frontiers in Immunology is the official journal of the IUIS

-----MANUSCRIPT DETAILS----- Manuscript title: PREMATURE IMMUNOSENESCENCE IN WOMEN
NEWLY DIAGNOSED WITH BREAST CANCER – ROLE OF EARLY-LIFE STRESS Manuscript ID: 386822
Submitted By: Moisés Evandro Bauer
Authors: Lauren Trintinaglia, Lucas Poitevin Bandinelli, Rodrigo Grassi-Oliveira, Laura Esteves Petersen, Marcelo Anzolin, Bruna Luz Correa, Jaqueline Bohrer Schuch, Moisés Evandro Bauer
Journal: Frontiers in Immunology, section Cancer Immunity and Immunotherapy

Article type: Original Research
Submitted on: 18 Apr 2018

-----ADDITIONAL INFORMATION----- In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:
http://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1246&name=cancer_immunity_and_immunotherapy

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: http://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br