

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA QUIMIOTERAPIA  
NEOADJUVANTE NA RESPOSTA IMUNE CELULAR  
NOS TUMORES DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS  
LOCALMENTE AVANÇADOS**

**MARCELO RAMOS TEJO SALGADO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interinstitucional em Oncologia da Fundação  
Antônio Prudente em parceria com o Hospital de  
Câncer de Pernambuco, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências  
Área de Concentração em Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares  
Co Orientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Torres**

**São Paulo  
2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Salgado, Marcelo Ramos Tejo

**Avaliação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nos tumores de mama triplo-negativos localmente avançados** / Marcelo Ramos Tejo Salgado - São Paulo; 2019.

100p.

Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Neoplasias de Mama Triplo Negativas/Triple Negative Breast Neoplasms. 2. Terapia Neoadjuvante/Neoadjuvant Therapy. 3. Sistema Imunitário/Imune system. 4. Linfócitos T/T Lymphocytes. 5. Estudos Transversais/ Cross-Sectional Studies.

“Tenham coragem. Não tenham medo de sonhar coisas grandes!”

Papa Francisco

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, José Mario Ribeiro Salgado e Célia Maria Ramos Tejo, pelo exemplo moral e familiar.

A minha esposa Kaline Forte Mendes Salgado, eterna companheira para todas as situações da vida.

Aos meus filhos Amanda, Eduardo e Arthur, fonte de inspiração eterna.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos pacientes envolvidos neste estudo, sem os quais não poderíamos realizar este estudo.

Ao Professor Doutor Fernando Augusto Soares, meu orientador e grande responsável pela parceria Fundação Antônio Prudente com Hospital do Câncer de Pernambuco.

A Professora Doutora Leuridan Cavalcante Torres, co-orientadora, pelos ensinamentos, compreensão e motivação ao longo desta jornada.

Aos amigos do departamento de oncologia clínica, mastologia e patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco.

A equipe do laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIPE).

## RESUMO

Salgado MRT. **Avaliação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nos tumores de mama triplo-negativos localmente avançados.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

**Introdução:** O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) localmente avançado representa um problema de saúde pública no Brasil; e seu tratamento padrão consiste em quimioterapia neoadjuvante, com taxa de sucesso extremamente variável a depender do acesso ao tratamento oncológico adequado e do tipo de resposta patológica. Na última década, o papel do sistema imune no câncer de mama tem ganhado espaço com a demonstração do impacto favorável do infiltrado tumoral de linfócitos (TILs) e expressão gênica de resposta imune, principalmente em tumores de alta taxa de proliferação e receptor de estrógeno negativo. **Objetivo:** avaliar a resposta imune celular em mulheres com câncer de mama triplo-negativo localmente avançado, e submetidas a quimioterapia neoadjuvante. **Métodos:** estudo longitudinal com seguimento realizado entre os anos de 2015 e 2017. O estudo foi realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Foram incluídas 30 mulheres, entre 18 e 60 anos de idade, com diagnóstico de CMTN localmente avançado e submetidas a quimioterapia neoadjuvante; e como grupo controle de comparação, 30 mulheres saudáveis com idade entre 18 a 60 anos sem diagnóstico prévio ou atual, e histórico familiar de CM. Coletas de sangue periférico foram realizadas antes e após a quimioterapia neoadjuvante (NAC). As análises dos níveis percentuais de TCD3+, TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD28, FAS, PD1 e CTLA4 foram realizadas por citometria de fluxo. O teste de múltiplas comparações não paramétrico de Kruskal-wallis foi utilizado na análise de associação. Para análise pareada pré e pós tratamento, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para análise de sobrevida livre de doença (SLD), foi utilizado o teste de Log-Rank para comparação entre os grupos. Foi adotado o nível de significância

estatística de  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada através do programa graphpad prism v6.0. **Resultados:** Verificou-se níveis elevados de CD3+ T CD28+, CD4+ T CD28+, CD3+ T PD1+ e CD3+ T CTLA4+ no sangue periférico dos grupos de mulheres que obteve resposta patológica completa (RC) e parcial (RP) ao tratamento neoadjuvante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Foram observados níveis elevados de TCD4+FAS+ no grupo de pacientes com RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado aos grupos com RC e controle ( $p < 0,05$ ). Foram observados níveis mais elevados de TCD8+PD1+ no grupo de pacientes com RP comparado aos grupos com RC e controle ( $p < 0,05$ ). Foram encontrados níveis elevados nos índices obtidos da relação CD4+ TCD28+/CD8+ TCD28+ nos grupos de mulheres que obteve RP quando comparado aos grupos com RC e de controle. Níveis elevados da relação CD4+ TPD1+/CD8+ TPD1+ nos grupos CMTN que obteve RC e RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Verificou-se diferença significativa na análise pareada dos níveis percentuais de TCD4+ TCD8+ antes e após NAC. Também se verificou diferença significativa dos níveis de TCD3+ e TCD4+ com expressão de CD28, FAS e PD1+ e de TCD8+PD1+ antes e após no sangue periférico das mulheres com CMTN antes e após NAC. A sobrevida livre de doença em 24 meses foi de 52,1% no grupo de pacientes com níveis percentuais de TCD3  $< 68,0$  e de 100% no grupo com CD3+ T  $\geq 68,8$  ( $p = 0,007$ ), e de 54,1% no grupo de pacientes com níveis percentuais de TCD4+FAS+  $\geq 44,5$  e de 100% no grupo com TCD4+FAS+  $< 44,5$  ( $p = 0,02$ ). Com relação TCD4+ PD1+, a sobrevida livre de doença foi 69,5% no grupo com níveis percentuais de TCD4+ PD1+  $\geq 4,5$  e de 100% no grupo TCD4+PD1+  $< 4,5$  ( $p = 0,01$ ). **Conclusão:** Conclui-se que os níveis TCD4+/FAS+ e TCD8+/PD1+ circulantes antes do tratamento estão associadas a RC, o que sugere ser potenciais biomarcadores preditivos de resposta a NAC. As alterações nos níveis circulantes de TCD3+, TCD4+FAS+ e TCD4+PD1+ após NAC estão associadas a sobrevida livre de doença, o que sugere que essas populações celulares e os receptores de inibição da resposta imune, FAS e PD1, estão envolvidos no prognóstico do CMTN.

**Descritores:** Neoplasias de Mama Triplo Negativas. Terapia Neoadjuvante. Sistema Imunitário. Linfócitos T.

## SUMMARY

Salgado MRT. [Evaluation of the effects of neoadjuvant chemotherapy on the cellular immune response in locally advanced triple-negative breast tumors]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Locally advanced triple-negative breast cancer (TNBC) represents a public health problem in Brazil. Its standard treatment consists of neoadjuvant chemotherapy, with an extremely variable success rate depending on access to adequate cancer treatment and the type of pathological response. In the last decade, the role of the immune system in breast cancer has gained space with the demonstration of the favorable impact of lymphocyte tumor infiltration (TILs) and genetic expression of immune response, especially in tumors with high proliferation rate and estrogen receptor negative. Objective: to evaluate the cellular immune response in women with locally advanced triple-negative breast cancer, and to undergo neoadjuvant chemotherapy. METHODS: This was a longitudinal study with follow-up performed between the years 2015 and 2017. The study was conducted at the Hospital de Cancer de Pernambuco and Translational Research Laboratory of the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Thirty women aged between 18 and 60 years with a diagnosis of locally advanced CMTN and submitted to neoadjuvant chemotherapy were included, and 30 healthy women aged 18 to 60 years without previous or current diagnosis and family history of TNBC were included as control group. Peripheral blood samples were collected before and after neoadjuvant chemotherapy (NAC). The analysis of the percentage levels of CD3+ T, TCD4 + and TCD8 + with expression of CD28, FAS, PD1 and CTLA4 were performed by flow cytometry. The non-parametric Kruskal-wallis multiple-comparison test was used in association analysis. For pre-and post-treatment paired analysis, the non-parametric Wilcoxon test was used. For disease-free survival analysis (SLD), the Log-Rank test was used to compare the groups. The level of statistical significance of  $p < 0.05$  was adopted. Statistical analysis was performed using the graphpad prism v6.0 program (Graphpad software, San Diego, CA). Results: High levels of CD28+ CD3+ T, CD28+CD4+ T, PD1 +CD3+T and CD3+ T CTLA4 + were observed in the peripheral blood of the groups of women with complete pathological response (CPR)



and no CPR to the neoadjuvant treatment when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). High levels of FAS+CD4+ T were observed in the group of patients with RP to the neoadjuvant treatment when compared to the CR and control groups ( $p < 0.05$ ). Higher levels of PD1+CD8+ T were observed in the group of patients with no CRP compared to the control and CRP groups ( $p < 0.05$ ). High levels were found in the indices obtained from the CD28+ CD4+T / CD28+ CD8 +T ratio in the groups of women who had when compared to the RC and control groups. High levels of the PD1 + CD4 + T / PD1+ CD8+ T ratio in the CMTN groups, which obtained CPR and no CPR to the neoadjuvant treatment when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). There was a significant difference in the paired analysis of the percent levels of CD4+ T and CD8+ T before and after NAC. There was also a significant difference in CD3+ T and CD4+ T levels with expression of CD28, FAS and PD1 and PD1+ CD8+ T before and after NAC in the peripheral blood of women with CMTN. The 24-month disease-free survival rate was 52.1% in the group of patients with CD3+T  $< 68.0$  and 100% in the CD3+ T  $\geq 68.8$  ( $p=0.007$ ) and 54.1 % in the group of patients with FAS+ CD4+T  $\geq 44.5$  and 100% in the group with FAS+ CD4+T  $< 44.5$  ( $p = 0.02$ ). With respect to PD1+ CD4+T disease-free survival was 69.5% in the group with PD1+ CD4+T  $\geq 4.5$  and 100% in the PD1+ CD4+T  $< 4.5$  ( $p = 0.01$ ) groups. Conclusion: It is concluded that pre-treatment FAS+ CD4+ T and PD1+ CD8+ T levels are associated with CPR, suggesting potential biomarkers predictive of NAC response. Changes in the circulating levels of CD3+ T, FAS+ CD4+T and PD1+ CD4 +T after NAC are associated with disease free survival, suggesting that these cellular populations and immune response inhibitory receptors, FAS and PD1, are involved in the CMTN prognosis.

**Key-words:** Triple Negative Breast Neoplasms. Neoadjuvant Therapy. Immune system. T Lymphocytes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estimativa de incidência de novos casos e mortalidade por câncer de mama para 2018 entre as mulheres no mundo .....	2
<b>Figura 2</b>	Dados de incidência e mortalidade entre as dez principais neoplasias nos Estados Unidos da América em 2018.....	3
<b>Figura 3</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes entre mulheres estimados para 2018, exceto pele não melanoma.....	5
<b>Figura 4</b>	Tumores de mama triplo-negativos e Tumores de mama Basal-like ...	14
<b>Figura 5</b>	Mecanismos de ativação dos linfócitos T nos órgãos linfóides secundários.....	18
<b>Figura 6</b>	Interação de células T com células apresentadoras de antígenos e células tumorais: checkpoints CTLA-4 e PD1/PD-L1 .....	20
<b>Figura 7</b>	Apresentação de antígeno pelas células tumorais .....	22
<b>Figura 8</b>	Regulação fisiológica de respostas imunes induzidas pelos mecanismos de apoptose via interação das moléculas FAS/ FASL.....	24
<b>Figura 9</b>	Modelos alternativos para a indução de morte de células T mediada por FASL após o encontro com células tumorais .....	26

<b>Figura 10</b>	<i>Hallmarks</i> do câncer .....	28
<b>Figura 11</b>	Imunovigilância e inflamação no câncer de mama.....	30
<b>Figura 12</b>	Esquema tratamento neoadjuvante.....	43
<b>Figura 13</b>	Análise dos níveis de linfócitos TCD3, TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD28, FAS e PD1 entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo que obtiveram resposta patológica completa e parcial ao tratamento neoadjuvante e de controles .....	54
<b>Figura 14</b>	Análise dos níveis de linfócitos TCD3 CTLA4+ entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo que obtiveram resposta patológica completa e parcial ao tratamento neoadjuvante e de controles .....	55
<b>Figura 15</b>	Análises dos valores da relação TCD4+/TCD8+, relação TCD4+CD28+/TCD8+CD28+, relação TCD4+FAS+/TCD8+FAS+ e relação TCD4+PD1+/TCD8+PD1+ entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo que obtiveram resposta patológica completa e parcial ao tratamento neoadjuvante e de controles .....	57
<b>Figura 16</b>	Análise pareada dos níveis de linfócitos TCD3, TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD28, FAS e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo antes e após ao tratamento neoadjuvante .....	59

<b>Figura 17</b>	Análise pareada dos níveis de linfócitos TCD3+ CTLA4+ no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo antes e após ao tratamento neoadjuvante .....	60
<b>Figura 18</b>	Sobrevida global e livre de doença de mulheres com câncer de mama triplo-negativo (n=27) atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2015-2017 .....	61
<b>Figura 19</b>	Análise da sobrevida livre de doença, utilizando como ponto de corte o valor de mediana (percentil 50) dos níveis percentuais de linfócitos TCD3+ com expressão dos receptores CD28, FAS, CTLA4 e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo após o tratamento neoadjuvante .....	63
<b>Figura 20</b>	Análise da sobrevida livre de doença, utilizando como ponto de corte o valor de mediana (percentil 50) dos níveis percentuais de linfócitos TCD4+ com expressão dos receptores CD28, FAS e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo após o tratamento neoadjuvante .....	64
<b>Figura 21</b>	Análise da sobrevida livre de doença, utilizando como ponto de corte o valor de mediana (percentil 50) dos níveis percentuais de linfócitos TCD8+ com expressão dos receptores CD28, FAS e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo após o tratamento neoadjuvante .....	65

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Subtipos moleculares do câncer de mama determinados por perfil de expressão genética.....	10
<b>Quadro 2</b>	Classificação molecular dos principais subtipos de câncer de mama ..	11
<b>Tabela 1</b>	Distribuição das frequências absolutas e relativas das características clínicas e histopatológicas de 30 pacientes com Câncer de Mama triplo-negativo localmente avançado, tratados no Hospital de Câncer de Pernambuco, 2015-2017.....	51

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	do inglês <i>American Joint Committee on cancer</i>
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>ASCO</b>	Sociedade Americana de Oncologia
<b>CAP</b>	Colégio Americano de Patologia
<b>CM</b>	Câncer de Mama
<b>CTLA-4</b>	do inglês <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
<b>DCs</b>	Células dendríticas
<b>DE</b>	Doença estável
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>FAZ</b>	do inglês
<b>FASL</b>	do inglês
<b>FISH</b>	do inglês <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
<b>GIST</b>	do inglês <i>Gastrointestinal stromal tumors</i>
<b>HCP</b>	Hospital de Câncer de Pernambuco
<b>HER2</b>	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
<b>IARC</b>	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>IMIP</b>	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IQR</b>	Interquartil
<b>LAR</b>	Receptor de andrógeno luminal
<b>mAb</b>	Anticorpos monoclonais
<b>MDSCs</b>	Células supressoras derivadas de mielóides
<b>MHC</b>	Molécula de histocompatibilidade principal
<b>NK</b>	Células <i>Natural Killer</i>
<b>NKT</b>	Células T <i>Natural Killer</i>

<b>PD</b>	Progressão de doença
<b>PD1</b>	do inglês <i>Programmed death 1</i>
<b>PHA</b>	do inglês <i>Phytohemagglutinin</i>
<b>pTNM</b>	Estadiamento pós cirúrgicos
<b>QT-NEO</b>	Quimioterapia neoadjuvante
<b>RC</b>	Resposta patológica completa
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RP</b>	Resposta parcial
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>SLD</b>	Sobrevida livre de doença
<b>TCR</b>	Receptor das células T
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	do inglês <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>Th</b>	do inglês <i>T helper</i>
<b>TILs</b>	do inglês <i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>
<b>TN</b>	Triplo-negativo
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras
<b>USA</b>	do inglês United State of America

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
1.1	Epidemiologia do câncer de mama .....	2
1.2	Diagnóstico e estadiamento .....	5
1.3	Fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama.....	8
1.4	Classificação imunofenotípica e molecular dos subtipos de câncer de mama..	9
1.5	Câncer de mama triplo-negativo .....	11
1.5.1	Epidemiologia e fatores de risco .....	12
1.5.2	Características clínicas e histopatológicas .....	13
1.5.3	Prognóstico no câncer de mama triplo-negativo.....	15
1.5.4	Abordagem neoadjuvante para câncer de mama triplo-negativo.....	16
1.6	Mecanismos de ativação e inibição da resposta imune celular.....	17
1.6.1	Mecanismos de apoptose via interações das moléculas FAS/FASL.....	21
1.7	Sistema imune e câncer.....	27
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1	Objetivo Geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos.....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1	Desenho do estudo e aspectos éticos.....	37
3.2	População do estudo.....	37
3.3	Local e período do estudo .....	38
3.4	Critérios de elegibilidade e procedimentos para seleção dos pacientes.....	38
3.4.1	Critérios de Inclusão .....	38
3.4.2	Critérios de Exclusão .....	39
3.5	Imuno-histoquímica .....	40
3.6	Fluxograma de captação de pacientes, tratamento quimioterápico e coleta de amostra biológica .....	40
3.6.1	Tratamento quimioterápico .....	41



3.6.2	Coleta do material biológico .....	42
3.7	Seguimento das pacientes durante o estudo .....	43
3.8	Definição dos termos e variáveis .....	44
3.9	Testes laboratoriais .....	45
3.9.1	Imunofenotipagem por citometria de fluxo .....	45
3.10	Análises estatísticas.....	47
3.10.1	Análises de associação .....	47
3.10.2	Análises pareadas antes e após tratamento .....	47
3.10.3	Análises de sobrevida .....	48
3.10.4	Análises de SLD .....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
4.1	Características clínicas e histopatológicas .....	50
4.2	Análises dos níveis percentuais de células TCD3+, TCD4+, TCD8+ com expressão na membrana de CD28, FAS E PD1 no sangue periférico de mulheres com câncer de mama triplo-negativo, de acordo com tipo de resposta a quimioterapia neoadjuvante .....	52
4.2.1	Células TCD3+ .....	52
4.2.2	Células TCD4+ .....	52
4.2.3	Células TCD8+ .....	53
4.3	Análises dos níveis percentuais de células TCD3+ CTLA4+ no sangue periférico de mulheres com câncer de mama triplo-negativo, de acordo com tipo de resposta a quimioterapia neoadjuvante .....	55
4.4	Análises dos índices obtidos na relação TCD4+ / TCD8+, relação TCD4+CD28+ / TCD8+CD28+, relação TCD4+FAS+ / TCD8+FAS+ e relação TCD4+PD1+ / TCD8+PD1+.....	56
4.4.1	Relação TCD4+/TCD8+ .....	56
4.4.2	Relação TCD4+CD28+ / TCD8+CD28+ .....	56
4.4.3	Relação TCD4+FAS+/TCD8+FAS+.....	56
4.4.4	Relação TCD4+PD1+ / TCD8+PD1+ .....	56
4.5	Análises pareada dos níveis percentuais de células TCD3+, TCD4+, TCD8+ e dos receptores cD28, FAS e PD1 no sangue periférico de	

mulheres com câncer de mama triplo-negativo antes e após quimioterapia neoadjuvante .....	58
4.5.1 Células TCD3+ .....	58
4.5.2 Células TCD4+ .....	58
4.5.3 Células TCD8+ .....	58
4.6 Análises pareada dos níveis percentuais de células TCD3+ CTLA4+ no sangue periférico de mulheres com câncer de mama triplo-negativo, antes e após quimioterapia neoadjuvante .....	60
4.7 Análise de sobrevida .....	61
4.7.1 Sobrevida global da população do estudo .....	61
4.7.2 Curva de sobrevida livre de doença de acordo com o perfil dos níveis de células TCD3+, TCD4+, TCD8+ e dessas populações celulares com expressão de CD28, FAS, CTLA4 e PD1 .....	62
4.7.2.1 Células TCD3+ .....	62
4.7.2.2 Células TCD4+ .....	62
4.7.2.3 Células TCD8+ .....	62
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>

## ANEXOS

**Anexo 1** Sistema TNM de classificação de tumores malignos

**Anexo 2** Pareceres substanciados – CEP HCP E IMIP

**Anexo 3** ECOG *Performance Status*

## APÊNDICE

**Apêndice 1** Lista de checagem

**Apêndice 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**Apêndice 3** Formulário Clínico

# ***INTRODUÇÃO***

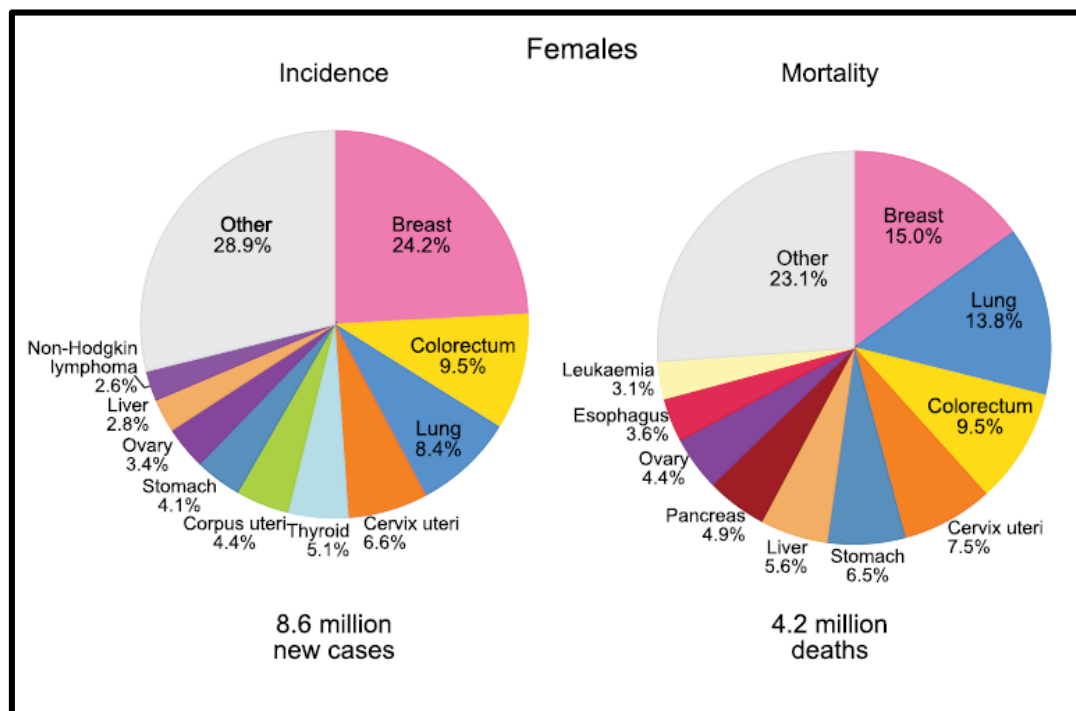
---

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

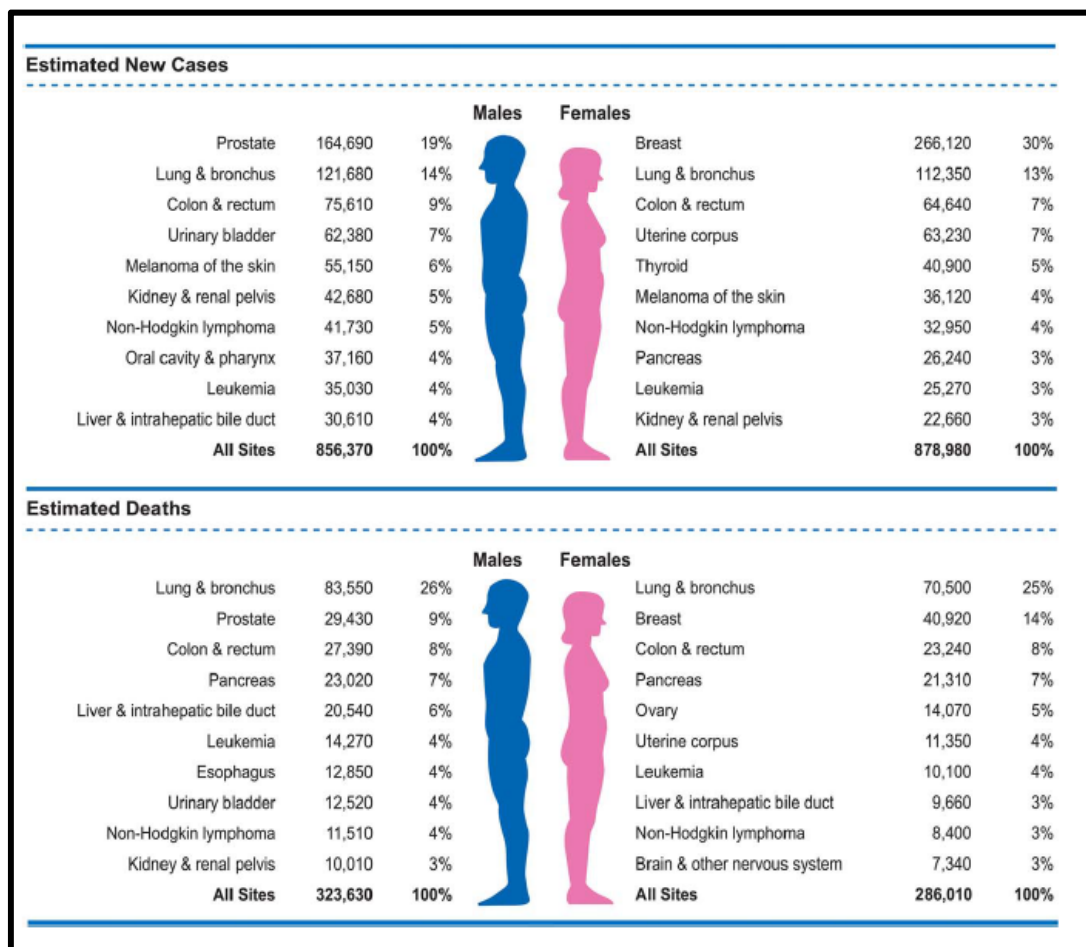
O câncer de mama (CM) foi a primeira neoplasia maligna mais incidente no mundo em 2018, com uma estimativa 2,088.8 milhões de novos casos (95% IC 2,003.7 – 2,177.6 milhões) e 630.000 mil mortes, sendo a principal causa de morte por câncer no sexo feminino em 2016 (FERLAY et al. 2019) (Figura 1).



Fonte: FERLAY et al. (2019)

**Figura 1** - Estimativa de incidência de novos casos e mortalidade por câncer de mama para 2018 entre as mulheres no mundo.

Nos Estados Unidos da América (EUA), a *American Cancer Society* publicou uma estimativa de novos casos de câncer em homens e mulheres para 2018, no sexo feminino os 3 tipos de tumores mais incidentes foram câncer de mama, seguido de câncer de pulmão e colorretal (SIEGEL et al.2018). O câncer de mama representa 14% dos casos de morte por câncer do sexo feminino nos EUA (Figura 2).



Fonte: SIEGEL et al. (2018).

**Figura 2** - Dados de incidência e mortalidade entre as dez principais neoplasias nos Estados Unidos da América em 2018.

De maneira geral, a sobrevida do CM é determinada pelo estágio, subtipo molecular e acesso ao tratamento. A sobrevida global em 5 anos nos EUA é de 89,7%, com tendência de aumento na maioria dos países desenvolvidos (HOWLADER et al. 2016; National Cancer Institute-NCI 2018). Tumores menores que 2 cm e sem metástases axilares, possuem sobrevida em 5 anos nos EUA de 99%, 94% e 85% para os subtipos Luminal, HER e Triplo-negativo, respectivamente (WALKS e WINER 2019).

Globalmente 1 em cada 20 mulheres irá desenvolver esta neoplasia ao longo da sua vida (FITZMAURICE et al. 2017). A chance de desenvolver CM é maior em regiões economicamente desenvolvidas (1 em cada 10 mulheres), como EUA, Europa Ocidental e Austrália e menor (1 em cada 50) em regiões economicamente subdesenvolvidas como África e algumas partes da Ásia.

No período de 2006 a 2016, a incidência global de CM aumentou mais de 29%, devido aos seguintes fatores: mudança na estrutura etária da população; crescimento populacional; e aumento nas taxas de incidência específicas por idade, contribuindo com 16%, 12% e 1%, respectivamente (FITZMAURICE et al. 2017).

A implementação de programas de rastreamento com mamografia, diminuição da terapia de reposição hormonal associado a melhorias no tratamento adjuvante sistêmico levaram à diminuição da incidência e mortalidade desta neoplasia em países desenvolvidos (HOWLADER et al. 2016). Nos países de baixa e média renda as falhas nos programas de rastreamento populacional do CM através da mamografia levam ao diagnóstico em estágios mais avançados e quando somadas ao acesso restrito dos tratamentos oncológicos, provocam o aumento na morbidade e mortalidade desta neoplasia (LEE et al. 2012).

No Brasil é a neoplasia maligna mais frequente no sexo feminino, excluindo câncer de pele não melanoma, sendo a estimativa de 59.700 casos novos em 2018 (Figura 3), com o risco estimado de 56,33 casos por 100 mil mulheres, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA (Ministério da Saúde 2018). Sua incidência varia de acordo com a região do país, sendo mais frequente nas regiões sul (73,07/100 mil), sudeste (69,50/100 mil), centro-oeste (51,96/100 mil) e nordeste (40,36/100 mil). Na região norte é o segundo mais incidente (19,21/100 mil), uma vez que o câncer de colo uterino é o primeiro. No estado de Pernambuco foram estimados cerca de 2.680 casos novos para o ano de 2018 (Ministério da Saúde 2018).

	Localização primária	Casos	%
<b>Mulheres</b> 	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: Ministério da Saúde (2018).

**Figura 3** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes entre mulheres estimados para 2018, exceto pele não melanoma.

## 1.2 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

Dados americanos mostraram que mais da metade dos CM são diagnosticados durante o rastreamento mamográfico e apenas um terço são identificados como

massa palpável na mama (CAUGHRAN et al. 2018). A detecção de massa palpável na axila, inversão do mamilo, secreção mamilar, assimetria mamária, eritema na pele da mama ou edema na pele da mama (*peau d'orange*) são apresentações raras da neoplasia mamária (MORROW 2014).

Em 2018, dados do projeto Amazona III, criado pelo Grupo Brasileiro de Estudos do Câncer de Mama, demonstraram que no Brasil 66% das pacientes foram diagnosticadas através de sintomas e apenas 34% pela mamografia (SIMON et al. 2009); e o percentual de acordo com estágio da doença foi de: I (26,4%), II (41,6%) e III (27%) e IV (5%). Ou seja, o número de casos diagnosticados se concentra em estágios mais avançados da doença, tendo impacto direto no sucesso terapêutico e consequentemente maior mortalidade. Estes dados foram confirmados pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer-IARC (BOYLE e LEVIN 2008) que revelou maior número de casos de câncer de mama em estágios localmente avançados em países em desenvolvimento.

O diagnóstico do CM depende da história clínica, exame físico e exames radiológicos complementares, além das biópsias para o diagnóstico definitivo por anatomopatológico. O principal exame radiológico de detecção precoce de CM é a mamografia convencional bidimensional (2D). Esse exame apresenta alta especificidade para detecção de câncer de mama em estágios iniciais; e associado ao exame de mamografia tridimensional (3D), há um aumento da taxa de detecção em mulheres assintomáticas, diminuindo a necessidade de repetição do exame radiográfico e de resultado falso-positivo devido a elevada qualidade na definição da imagem (FRIEDEWALD et al. 2014).



Os programas de rastreamento mamográfico podem detectar tumores impalpáveis, assintomáticos e microcalcificações que quando tratadas precocemente diminuem a taxa de mortalidade por CM. No Brasil, existem controvérsias quanto ao início e fim do programa de rastreamento, cujas diretrizes adotadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) determinam a realização de mamografia em intervalos de dois anos para as mulheres com idade entre 50 e 69 anos (Ministério da Saúde 2018). A Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM) recomenda realizar a mamografia anualmente para todas as mulheres com mais de 40 anos (BARRETO et al. 2012).

Nos casos de mulheres com mutações nos genes BRCA1 e/ou BRCA2 que optaram por *cancer surveillance*, a mamografia tem reduzida sensibilidade para detecção de CM. Nesses casos, sugere-se a realização da ressonância nuclear magnética (RNM) anual, iniciando aos 25 anos, por ser um exame mais sensível para detecção de tumor em estágio inicial (WARNER et al. 2011).

O câncer de mama é um diagnóstico histopatológico, feito de acordo com critérios patológicos padronizados. O tipo mais comum é o carcinoma ductal invasivo (50%-75% dos pacientes), seguido pelo carcinoma lobular invasivo (5%-15% dos pacientes), com o carcinoma misto ductal/lobular e outros tipos raros compondo o restante (DILION et al. 2014).

Após o diagnóstico histopatológico, a extensão do tumor é avaliada clinicamente e por meio de exames complementares. O método de estadiamento mais utilizado é o proposto pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, 8ª edição (Anexo 1). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta: as características do tumor primário (T); dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N); e a presença ou ausência

de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1 (Anexo 1) (HORTOBAGYI et al. 2017). O uso de exames radiológicos complementares deve ser reservado para os casos com doença localmente avançada, mulheres sintomáticas, ou com alterações em exames laboratoriais que sugiram doença metastática (RAVAIOLI et al. 2002; *National Comprehensive Cancer Network-NCCN* 2019).

### **1.3 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CÂNCER DE MAMA**

Os principais fatores prognósticos clínicos-patológicos são: idade; tamanho do tumor; diferenciação entre carcinoma invasivo e in situ; número de linfonodos regionais acometidos; e presença de metástases à distância (HAYES et al. 1998). A mortalidade está diretamente relacionada às características morfológicas (número de linfonodos acometidos, tamanho, tipo histológico, grau histológico e invasão angiolinfática) e biológicas da neoplasia mamária. O número de linfonodos acometidos é o fator prognóstico mais importante na ausência de doença metastática (CARLSON e WOOD 2011).

A sobrevida livre de doença em 10 anos é em torno de 70-80%, quando não há comprometimento de linfonodos axilares; porém, quando existem mais de 10 linfonodos positivos, apenas 10-15% das pacientes estarão livres de doença em 10 anos (PARK et al. 2018). O grau histológico da neoplasia mamária é avaliado pela graduação de Elston-Ellis, sendo considerado também um fator prognóstico (ELSTON e ELLIS 1991).

O receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) são importantes marcadores preditivos para o câncer de mama e fundamentais na decisão do tratamento sistêmico a ser realizado (GOLDHIRSCH et al. 2011).

Tradicionalmente o CM foi considerado uma doença única e seu tratamento tem sido guiado por fatores prognósticos clínico-patológicos, em muitos casos levando a um *overtreatment* das pacientes. Hoje o câncer de mama é definido como um grupo heterogêneo de diferentes entidades patológicas que acometem o mesmo sítio anatômico, com diferentes fatores de risco, características histológicas, manifestações clínicas e prognósticas (REIS-FILHO e PUSZTAI 2011; GOLDHIRSCH et al. 2011).

#### **1.4 CLASSIFICAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA E MOLECULAR DOS SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA**

Através de estudos de análise de *microarrays*, PEROU et al. (2000) demonstraram que os tumores com receptor de estrogênio positivo e negativo eram distintos quanto ao perfil de expressão gênica, e relataram que o câncer de mama poderia ser dividido em quatro diferentes subtipos: basal, HER2, tipo normal, luminal A e B. Em seguida, novos estudos demonstraram que o CM poderia ser agrupado pelo perfil de expressão gênica em diferentes subgrupos: luminais A e B; um grupo de superexpressores de HER-2; um subtipo "mama normal" ou sem classificação; e o grupo basal-*like*, que é representado em grande parte por tumores triplo-negativos (SCHNITT et al. 2010). Estes subtipos diferem em relação aos

seus padrões de expressão gênica, características clínicas, resposta ao tratamento e prognóstico, conforme resumido no Quadro 1.

**Quadro 1** - Subtipos moleculares do câncer de mama determinados por perfil de expressão genética

<b>SUBTIPO MOLECULAR</b>			
	<b>Luminal</b>	<b>HER-2</b>	<b>Basal</b>
<b>Padrão de expressão gênica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ↑ expressão de RH e genes associados (Luminal A &gt; Luminal B)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ↑ expressão de HER-2 e outros genes em amplicon.</li> <li>■ ↓ expressão de RE e genes associados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ↑ expressão de genes baso-epiteliais, citoqueratinas basais</li> <li>■ ↓ expressão de HER-2</li> </ul>
<b>Características clínicas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ≈ 70% dos carcinomas invasivos de mama</li> <li>■ RE/RP positivos</li> <li>■ Luminal B tende a ser ↑ grau histológico que luminal A</li> <li>■ Alguns ↑ HER-2 (Luminal B)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ≈ 15% dos carcinomas invasivos de mama</li> <li>■ RE/RP negativos</li> <li>■ Mais propensos ao ↑ grau e N+</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ ≈ 15% dos carcinomas invasivos de mama</li> <li>■ Maioria triplo-negativo</li> <li>■ Disfunção do BRCA-1 (germinativa, esporádica)</li> <li>■ Mulheres afro-americanas</li> </ul>
<b>Resposta ao tratamento e prognóstico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Responde à terapia endócrina</li> <li>■ Prognóstico melhor do Luminal A frente ao Luminal B</li> <li>■ Mais recidivas tardias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Uso de terapia alvo molecular anti-HER2</li> <li>■ Respondem à QT baseada em antraciclicos</li> <li>■ Geralmente bom prognóstico com duplo bloqueio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Sem resposta à terapia endócrina e anti-HER-2</li> <li>■ Parecem ter sensibilidade à QT baseada com platina e inibidores da PARP</li> <li>■ Geralmente prognóstico ruim (de forma não-uniforme)</li> <li>■ Recidiva &gt; nos 3 primeiros anos</li> </ul>

Fonte: Adaptado de SCHNITT et al. (2010).

Em 2011, os principais subtipos moleculares definidos pela expressão gênica foram incluídos no *St. Gallen International Expert Consensus*. No entanto, na impossibilidade de acesso aos testes genéticos, uma nova classificação baseada em fenótipo imuno-histoquímico foi sugerida para fins terapêuticos: Luminal A, Luminal B, HER-2 positivo, Triplo-negativo e Basal-like (GOLDHIRSCH et al. 2011), conforme resumido no Quadro 2.

**Quadro 2** - Classificação molecular dos principais subtipos de câncer de mama.

<b>Subtipo tumoral</b>	<b>Padrão Molecular</b>		
<b>Luminal A</b>	RE (+) e/ou RP (+)	HER2 (-)	Ki67 < 14%
<b>Luminal B</b>	RE (+) e/ou RP (+);	HER2 (+/-)	Ki-67>14%
<b>HER2+</b>	RE (-) RP (-);	HER2 (+)	Qualquer Ki67
<b>Triplo-negativo</b>	RE e RP <1%	HER2 (-)	Qualquer Ki67
<b>Basal Like</b>	RE e RP <1%	HER2 (-)	CK5/6 e/ou EGFR +

Abreviações: CK, citoqueratina; EGFR, receptor de fator de crescimento epidérmico; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; HER-2. Receptor epidérmico humano tipo 2; Ki-67 marcador de proliferação celular – segundo critérios do American College of Pathology (CAP).

Apesar de existir discordância entre os métodos de imuno-histoquímica e o perfil de expressão gênica, na prática clínica são utilizados o estadiamento clínico e cirúrgico somados aos marcadores de imuno-histoquímica (receptores de estrógeno e progesterona, HER2 e o índice de proliferação celular KI 67) para decisão terapêutica (UNTCH et al. 2015).

## 1.5 CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Segundo as diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia (SMITH 2013) e do Colégio Americano de Patologia (CAP), o câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é aquele com níveis de coloração por imuno-histoquímica (IHQ) <1% para receptores de estrogênio (RE); < 1% para receptores de progesterona (RP); e HER-2 negativo por IHQ ou preferencialmente *Fluorescence In SituHybridization* (FISH). Devido ausência de expressão destes marcadores, as pacientes não iram se beneficiar de terapias endócrinas e/ou terapia anti-HER2, fazendo com que a quimioterapia

citotóxica e recentemente o atezolizumabe (SCHMID et al. 2018) sejam as opções disponíveis no cenário neoadjuvante, adjuvante e metastático.

Segundo o grupo da Universidade de Vanderbilt, o CMTN pode ser dividido em 6 subgrupos: tipo basal 1, tipo basal 2, mesenquimal, imunomodulatório, tipo célula-tronco mesenquimal e receptor de andrógeno luminal (LAR); entretanto, esta classificação não demonstrou nenhum impacto na sobrevida livre de doença (LEHMANN et al. 2015; THOMSEN et al. 2018).

### **1.5.1 Epidemiologia e fatores de risco**

O CMTN representa aproximadamente 11 a 20% do câncer de mama na população em geral (RAKHA et al. 2007; LIN et al. 2009); entretanto, mulheres com CM localmente avançado e/ou de etnia afro-americana, a incidência varia de 23 a 28% (MILLIKAN et al. 2008; DOLLE et al. 2009). No Brasil, segundo dados do projeto Amazona, sua incidência é de 21% (SIMON et al. 2019).

Os fatores de risco associados ao CMTN incluem: **i)** associação com mutações nos genes de BRCA1/2, sendo que até 20% dos CMTN tem mutações nesses genes, principalmente o BRCA1 (GONZALEZ-ANGULO et al. 2011); **ii)** risco maior entre afro-americanas e hispânicas quando comparado às caucasianas (MILLIKAN et al. 2008; LIEDKE et al. 2008); **iii)** mulheres na pré-menopausa possuem uma incidência maior quando comparado àquelas na menopausa (CAREY et al. 2007; MILLIKAN et al. 2008); **iv)** risco significativamente maior nas mulheres com índice de massa corporal (IMC) > 30 (PIEROBON e FRANKENFELD 2013); e **v)** paridade, uma vez que estudos sugerem que a nuliparidade é associada com baixo

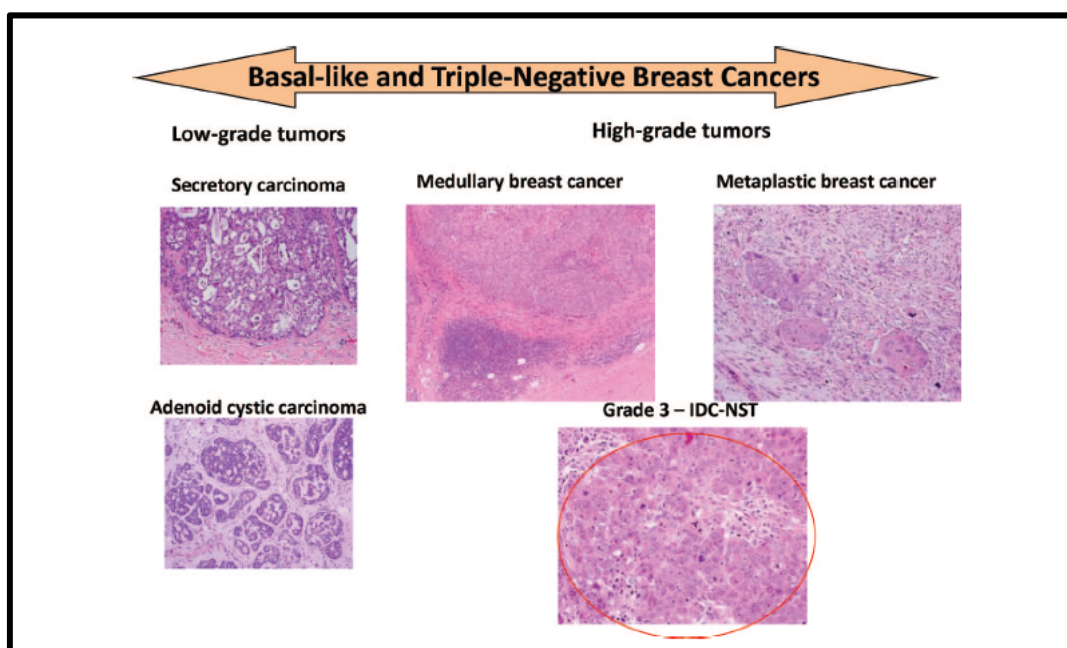
risco para CMTN, mas para as múltíparas (3 ou mais filhos) é associada com risco aumentado (CAREY et al. 2007).

### 1.5.2 Características clínicas e histopatológicas

Devido ao seu comportamento de crescimento rápido, o CMTN é diagnosticado mais comumente durante exame físico, como uma massa mamária, do que durante a mamografia, quando comparado aos CM Luminal A e B (COLLET et al. 2005; DENT et al. 2007). Os achados mamográficos mais comuns são: massa sem calcificação, mal definida ou espiculada, com margens e forma irregular. Ao ultrassom, são comumente massa hipoecóicas ou complexas com forma irregular e margens não circunscritas; enquanto na ressonância magnética é comum massa redonda ou oval, margens irregulares e aumento das bordas (*rim enhancement*) (DENT et al. 2007).

Histologicamente, mais de 90% dos tumores de mama são classificados como carcinoma ductal invasivo, sem tipo específico. Na maioria dos casos se apresentam como carcinomas de alto grau, com infiltrado linfocitário perilobular no tecido mamário adjacente ao leito tumoral; e um infiltrado inflamatório linfocitário intratumoral, com zonas necróticas centrais, proliferação fibrosa celular e *pushing borders* (FULFORD et al. 2006; TURNER e REIS-FILHO 2013). Alguns CMTN têm histologia atípicas medulares e metaplásicas: os carcinomas medulares são caracterizados por bordas circunscritas, infiltrado linfóide periférico denso e possuem um prognóstico favorável (HUOBER et al. 2012); enquanto os carcinomas metaplásicos apresentam pior prognóstico e possuem diferenciação do epitélio escamoso com componentes mesenquimais e células com morfologia fusiforme,

condroide, óssea ou rabdoide (WEIGELT et al. 2009). Dentro desta ampla diversidade, e com comportamento clínico menos agressivo, destacam-se o carcinoma adenoide cístico e o medular (HUDIS e GIANNI 2011) (Figura 4).



Fonte: HUDIS e GIANNI (2011)

**Figura 4** – Tumores de mama triplo-negativos e Tumores de mama *Basal-like*. *Secretory carcinoma*, Carcinoma secretório; *Medullary breast cancer*, carcinoma medular; *Metaplastic breast cancer*, Carcinoma metaplásico; *Adenoid cystic carcinoma*, Carcinoma adenoide-cístico; *Grade 3- IDC-NST*, CDI-SOE-Grau 3.

### 1.5.3 Prognóstico do câncer de mama triplo-negativo

Pacientes com CMTN apresentam pior prognóstico quando comparadas com outros subtipos de câncer de mama. Em um estudo realizado pelo NCCN que englobou 15.204 mulheres com câncer de mama, quando comparado com as pacientes com receptor hormonal positivo e ou HER-2 positivo, mulheres com CMTN tinham: **i)** pior sobrevida livre de doença e global; **ii)** aumento no risco de metástases pulmonares e no sistema nervoso central, e baixa incidência de metástases



ósseas; e **iii**) maior mortalidade nos dois primeiros anos de diagnóstico (LIN et al. 2009). Ao contrário do risco de recorrência tardia, após 5 anos, é 50% menor nas mulheres com CMTN quando comparadas com a receptor hormonal positivo (NOFECH-MOZES et al. 2009).

Vários estudos têm demonstrado que as pacientes com CMTN submetidas a quimioterapia neoadjuvante que atingem a resposta patológica completa (RC), apresentam melhora da sobrevida livre de doença e melhor controle loco regional, quando comparadas as que têm resposta parcial (VON MINCKWITZ et al. 2012; PILEWSKIE e MORROW 2017). PRASHANT et al. (2019) demonstraram que invasão angiolímfática e linfonodo com extravasamento extra capsular são preditivos independentes de recorrência loco regional nas pacientes submetidas a tratamento neoadjuvante que alcançaram resposta parcial. O seguimento clínico e radiológico dessas pacientes não difere dos demais subtipos de CM e consiste em história clínica e exame físico completo a cada 3 meses nos primeiros 3 anos e após a cada 6 meses, associado a mamografia anual (SMITH 2013).

#### **1.5.4 Abordagem neoadjuvante para câncer de mama triplo-negativo**

As neoplasias de mama são usualmente subdivididas em tumores iniciais (estádios IA, IB, IIA e IIB), localmente avançado (estádios IIIA, IIIB e IIIC) e metastáticos (estádio IV). Essa divisão tem usualmente uma aplicação terapêutica, pois tumores iniciais, geralmente de melhor prognóstico, são abordados inicialmente com cirurgia e em seguida submetidos a tratamentos sistêmicos complementares (HORTOBAGYI et al. 2017).

Classicamente, a quimioterapia neoadjuvante é preferível em pacientes com estágios localmente avançados e naquelas que não são candidatas a cirurgia conservadora. O objetivo desse tratamento é induzir uma resposta antitumoral antes da cirurgia e possibilitar a cirurgia conservadora, e também permitir uma avaliação precoce da efetividade do tratamento sistêmico (GRALOW et al. 2008). Além desses objetivos clínicos, a quimioterapia neoadjuvante traz oportunidades de pesquisas através da coleta de material sanguíneo e tumoral antes e após o tratamento, possibilitando a identificação de biomarcadores de resposta específicos do paciente (GRALOW et al. 2008).

Em relação à resposta após a quimioterapia neoadjuvante, essa pode ser classificado como: resposta patológica completa (RC), quando há ausência de tumor invasivo na mama e linfonodos regionais; ou resposta patológica parcial (RP), quando existe doença invasiva na mama ou linfonodos regionais (VON MINCKWITZ et al. 2012; CORTAZAR et al. 2014). A resposta patológica completa difere de acordo com o subtipo do câncer de mama e vários estudos têm mostrado melhor sobrevida global e livre de doença entre os subtipos triplo-negativo e HER2+, que atingem esse grau de resposta (CORTAZAR et al. 2014; SPRING et al. 2018).

A despeito de várias opções de protocolos de quimioterapia neoadjuvante disponíveis, existe consenso que a associação antraciclina e taxanes é o padrão ideal. POGGIO et al. (2018) demonstraram que quimioterapia neoadjuvante com antraciclina e taxanes, associadas à platina, levou a um aumento significativo da taxa de RC, as custas de uma maior toxicidade hematológica e pode ser considerada como opção de tratamento neoadjuvante no CMTN.

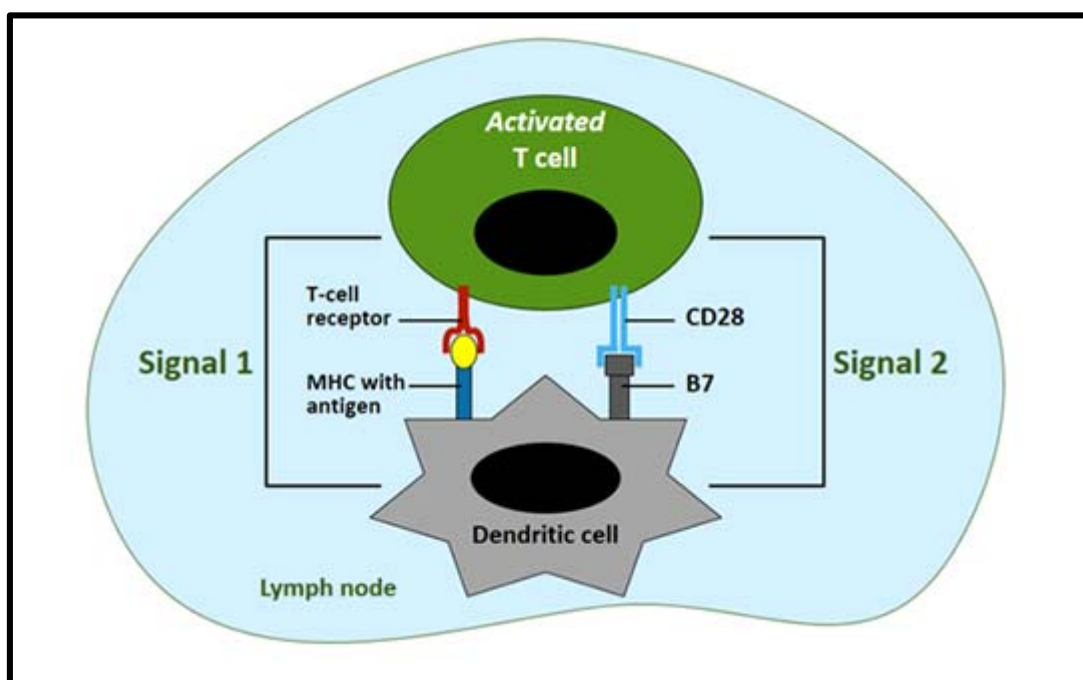
Para as pacientes que apresentam RP a neoadjuvância, espera-se uma redução de 30% na sobrevida global em três anos (LIEDKE et al. 2008). A análise do grupo triplo-negativo do estudo CREATE-X mostrou benefício na sobrevida global (SG) naquelas pacientes que apresentavam RP a quimioterapia neoadjuvante e receberam capecitabina de forma adjuvante (MASUDA et al. 2017). As opções de tratamento cirúrgico e radioterápico para CMTN são as mesmas para os subtipos luminais A e B e HER-2 (TEH et al. 2019).

## **1.6 MECANISMOS DE ATIVAÇÃO E INIBIÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR**

Dois sinais são necessários para ativação da resposta imune de células T *naïve*. O primeiro é gerado pelo receptor das células T (TCR) que se liga a antígenos apresentados no contexto de molécula de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I ou II, expressa na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs). As células T CD4<sup>+</sup> se ligam a MHC classe II (MHC-II), que pode ser expresso em qualquer tipo de célula, mas principalmente por APCs (macrófagos, células B e células dendríticas (DCs)); e as células TCD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos expressos por MHC de classe I (MHC-I).

O segundo sinal é proporcionado por interação da molécula co-estimuladora CD28, expressa nas células T, com as moléculas B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86), presentes na superfície da APCs (Figura 5). A falha da célula T para receber o segundo sinal resulta geralmente em anergia (inativação) de células T. Isso também pode acontecer devido à interação dos ligantes CD80 e/ou CD86 com uma molécula

co-inibidora, chamada *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4). Isso é parte do mecanismo natural para limitar as respostas imunes autorreativas que poderiam levar as doenças autoimunes (VERMA et al. 2013) (Figura 5).



Fonte: POSTOW et al. (2015).

**Figura 5** - Mecanismos de ativação dos linfócitos T nos órgãos linfoides secundários. MHC, complexo principal de histocompatibilidade.

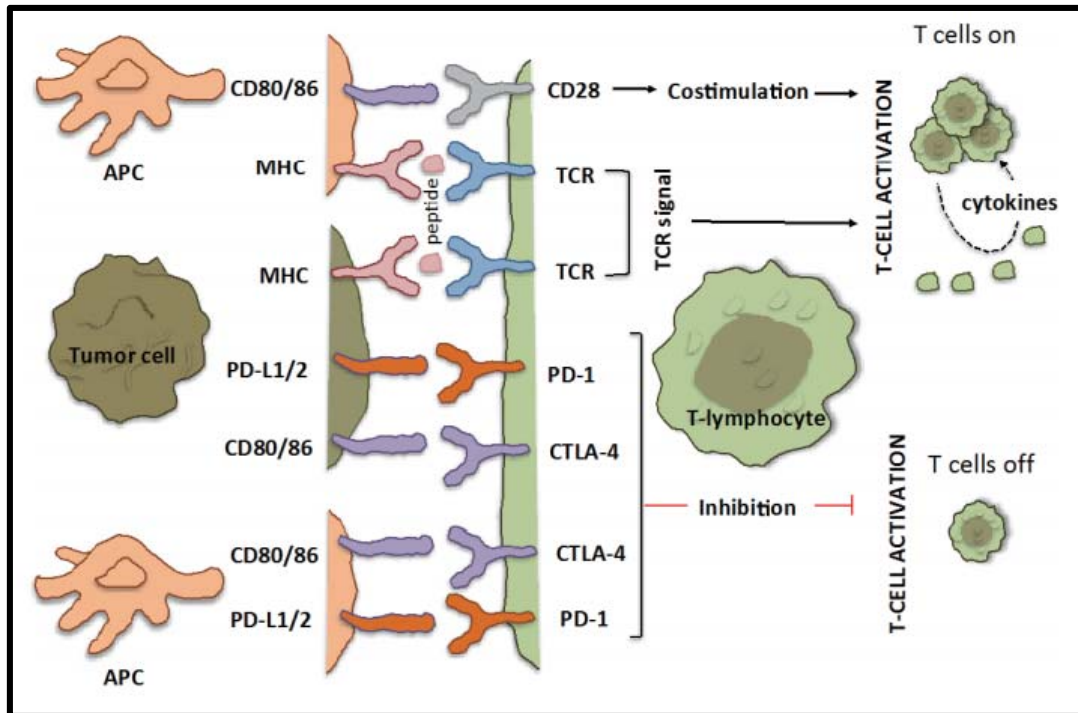
Além disso, existem outros mecanismos que promovem a diminuição da resposta imune celular, através da expressão de co-receptores inibidores presentes na superfície celular dos linfócitos T. Os co-receptores inibidores abrangem um grupo de moléculas que funcionam na sinapse imunológica para inibir a função das células T, sendo receptores com função oposta dos receptores co-estimuladores CD28 (ODORIZZI et al. 2012). Durante a última década, vários membros co-receptores inibidores foram relacionados com o fenômeno de "exaustão" da célula T, incluindo *Programmed death 1* (PD1) e CTLA-4. Também chamado de "esgotamento" das

células T, termo atribuído a redução gradual das funções celulares que ocorre nos linfócitos T CD8+ citotóxico em condições de exposição crônica ao antígeno (PARK et al. 2012).

As moléculas de CTLA4, que são exclusivamente expressas em células T ativadas, tem a função de neutralizar a ação dos co-estimuladores CD28 e induzir sinais inibitórios para restringir a ativação das células T (HATHCOCK et al. 1993; RUDD et al. 2009). Após o primeiro sinal de ativação dos linfócitos T, via interações TCR e antígeno, o CD28 amplifica fortemente a sinalização de ativação das células T (LINSLEY et al. 1990).

Tanto o CD28 como o CTLA4 podem interagir com os mesmos ligantes CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) (LINSLEY et al. 1990; LINSLEY et al. 1994). No entanto, a molécula de CTLA4 tem uma maior afinidade para ambos os ligantes; portanto, compete com as moléculas CD28 pela interação com os receptores CD80 e CD86, expressos por células apresentadoras de antígenos (EGEN e ALLISON 2002). Além disso, a ligação de CTLA4 inibe a proteína fosfatase SHP2 e a cinase PP2A, que são cruciais para a ativação de células T no meio tumoral (QURESHI et al. 2011). O CTLA4 também é expresso pelas células Treg CD4+ CD25+ FoxP3+ e acelera a função supressora no microambiente tumoral (WING et al. 2008).

A molécula PD1 é um membro da família dos receptores CD28 e atenua as respostas imunes por regular negativamente a proliferação e a atividade funcional de células T. A expressão de PD1 nas células T ativadas, especialmente nas Treg, aumenta a sua função supressora da resposta imune (RAIMONDI et al. 2006; KEIR et al. 2008) (Figura 6).



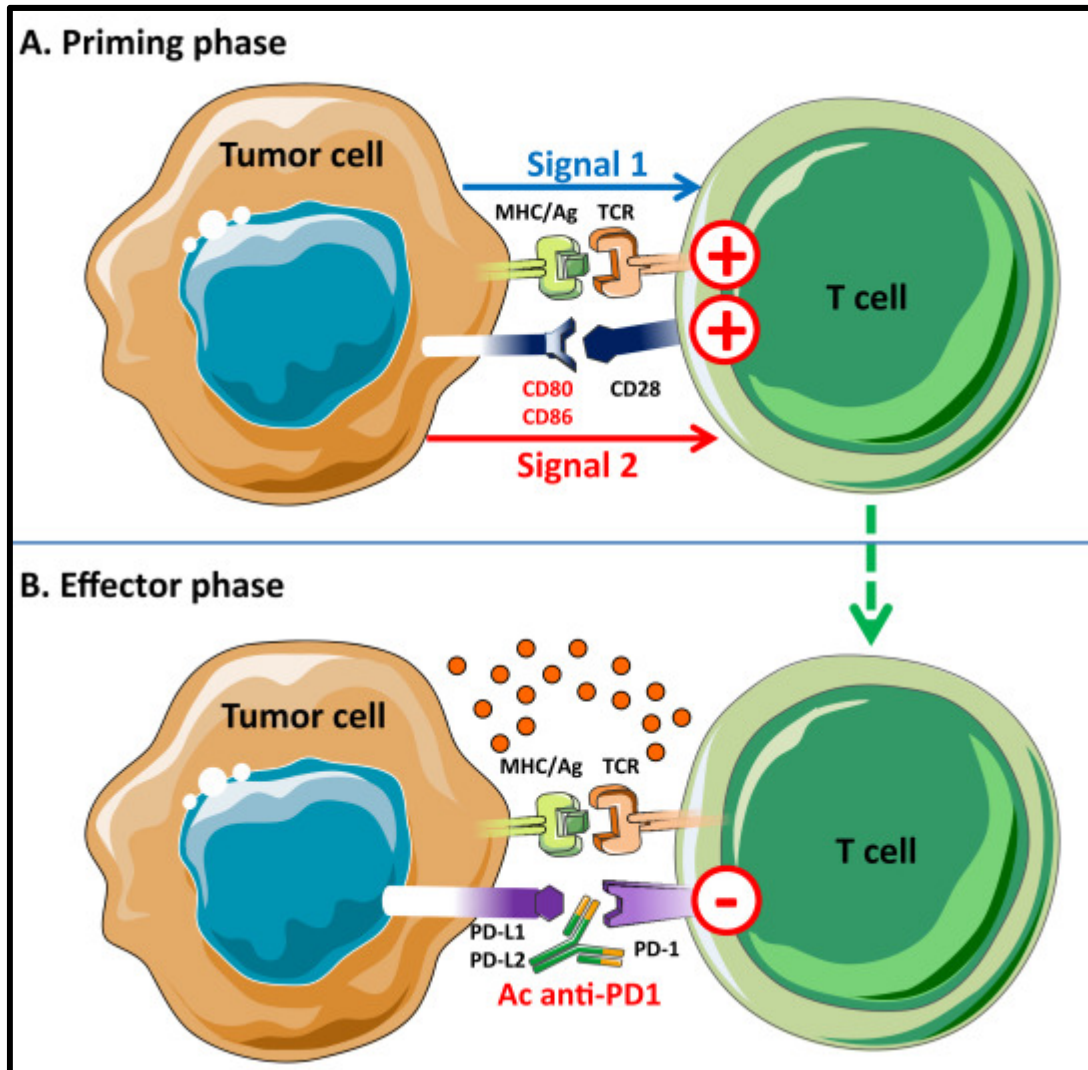
Fonte: KARACHALIOU et al. (2015).

**Figura 6** - Interação de células T com células apresentadoras de antígenos e células tumorais: *checkpoints* CTLA-4 e PD1/PD-L1 (sinais inibidores). CTLA-4 regula negativamente a ativação de células T por ligação a moléculas B7 (CD80/86) na superfície de APCs ou células tumorais. Quando essas moléculas B7 se ligam ao CD28, elas geram o efeito oposto, ativando os sinais. Quando PD1 se liga a um dos seus ligantes (PD-L1/ PD-L2), principalmente expressos no microambiente do tumor, resulta na inibição da atividade das células T. APC, célula apresentadora de antígeno; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; TCR, receptor de célula T.

O efeito inibitório de PD1 sobre a ativação de T linfócitos é mediada pela interação com os *Programmed death ligand 1* e 2 (PD-L1 e PD-L2). Especialmente a interação PD1/PD-L1 modula negativamente a resposta imune pela diminuição da produção de citocinas (DONG et al. 1999, 2002); e induz anergia dos linfócitos T e a apoptose celular (SELENKO-GEBAUER et al. 2003; GHEBEH et al. 2006) (Figura 7). A sinalização do PD1 conduz o ciclo celular à parada em G0/G1, mas não aumenta a morte celular (LATCHMAN et al. 2001).

O PD-L1, também chamado B7-H1, é uma proteína transmembrana tipo 1 de 40kDa, codificada pelo gene *CD274*, presente em células apresentadoras de antígenos, como monócitos/macrófagos, células B, DCs, assim como células tumorais, como mecanismo de escape imunológico. A taxa de expressão de PD-L1 na superfície de células tumorais está associada com progressão tumoral (OHIGASHI et al. 2005) e pior prognóstico (FRENCH et al. 2012), como também a presença de células T PD1+ no infiltrado tumoral (TOPALIAN et al. 2012).

As moléculas de PD1 e do seu ligante (PD-L1) se apresentam como receptores na superfície do citoplasma e na forma solúvel no plasma (sPD1 e sPD-L1). As moléculas livres de sPD1 e sPD-L1 podem ser liberados através da clivagem proteolítica desses receptores da membrana. Além disso, o sPD-L1 mantém sua atividade biológica e é capaz de se ligar ao receptor PD1 presente na membrana dos leucócitos, especialmente nos linfócitos T, ativando a via PD1/PD-L1 (WEI et al. 2018).



Fonte: DE CHARETTE et al. (2016).

**Figura 7** - Apresentação de antígeno pelas células tumorais. Ativação de células T é um processo de duas etapas que requer o reconhecimento de peptídeos apresentados por moléculas de MHC expressas na superfície das células tumorais, bem como um segundo sinal de estimulação, emitido pela família de receptores CD28. O sinal de co-estimulação promove a expansão clonal de células T, a secreção de citocinas e a atividade da célula T. Na ausência deste sinal, as células T não respondem de forma eficaz e são funcionalmente inativadas. APC, célula apresentadora de antígeno (célula dendrítica, macrófago); Ag, antígeno; MHC, complexo principal de histocompatibilidade; TCR, receptor das células T.



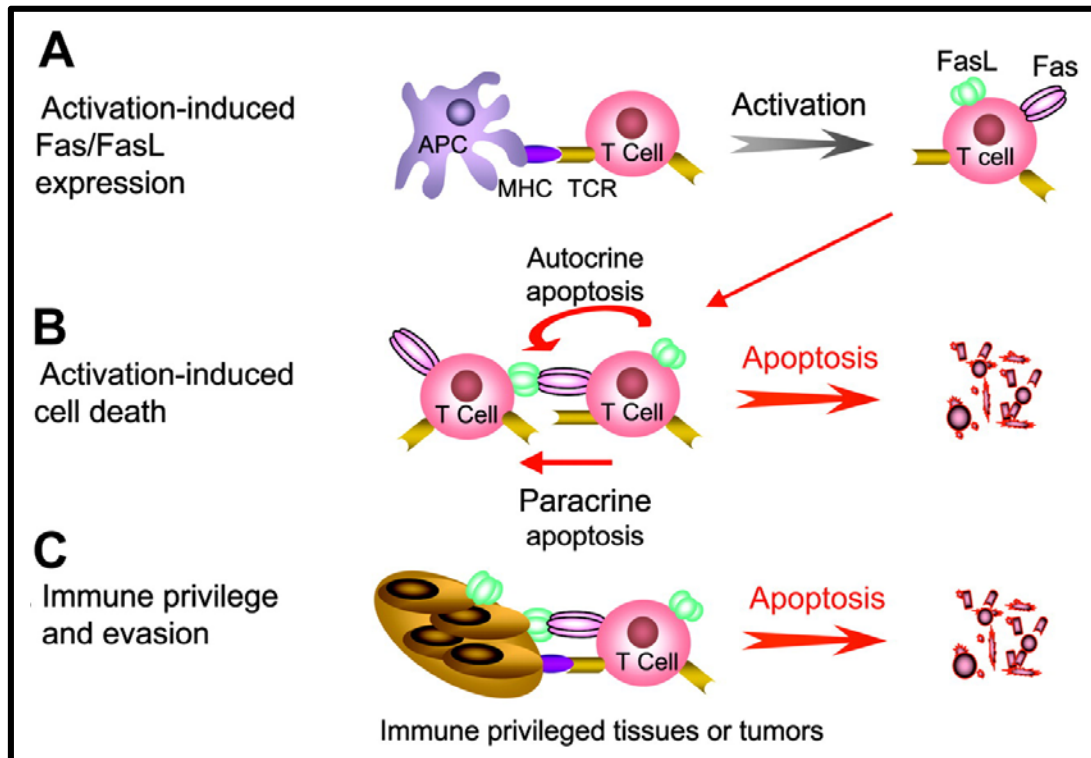
### 1.6.1 Mecanismos de apoptose via interações das moléculas FAS - FASL

O sistema imune funciona em microambientes complexos e dinâmicos, onde a sobrevivência e eliminação de clones de células T são fundamentais para o estabelecimento e manutenção da resposta imune. A morte celular induzida por ativação é o principal mecanismo homeostático usado pelo sistema imune para controlar ativação das células T, promover a tolerância aos autoantígenos e prevenir a autoimunidade (COHEN e DUKE 1992; KABELITZ et al. 1993; MAHER et al. 2002).

Após a ativação, as células T expressam FAS e seu ligante (FASL) e após contínua estimulação antigênica, essas células tornam-se sensíveis à apoptose autócrina e parácrina mediada por FAS/FASL. Esses dois mecanismos de morte celular servem para controlar a expansão clonal de linfócito T e regular as respostas imunes. Todos os linfócitos, incluindo células TCD4+, TCD8+, células B e células *Natural Killer* (NK), bem como DCs, monócitos, macrófagos e neutrófilos, estão sujeitos à homeostase regulada pelo FAS / FASL (RATHMELL et al. 1995; ARAI et al. 1997; VAN PARIJS e ABBAS 1998; LENARDO et al. 1999).

A desregulação da morte celular induzida por ativação do FAS/FASL está associada às doenças degenerativas e autoimunes (WATANABE-FUKUNAGA et al. 1992). A síndrome linfoproliferativa autoimune em humanos, um distúrbio hereditário de homeostase de linfócitos, está associada à falta de morte celular induzida por ativação, devido a defeitos na expressão de FAS, FASL e das caspases (WANG et al. 1999). O status de privilégio imunológico de alguns órgãos, como olhos e testículos, é parcialmente estabelecido pela expressão de altos níveis de FASL. A molécula de FASL é constitutivamente expresso no timo, onde desempenha

um papel importante na ontogênese e seleção negativa de células T, onde contribui para o estabelecimento da tolerância periférica (ASKENASY et al. 2005) (Figura 8).



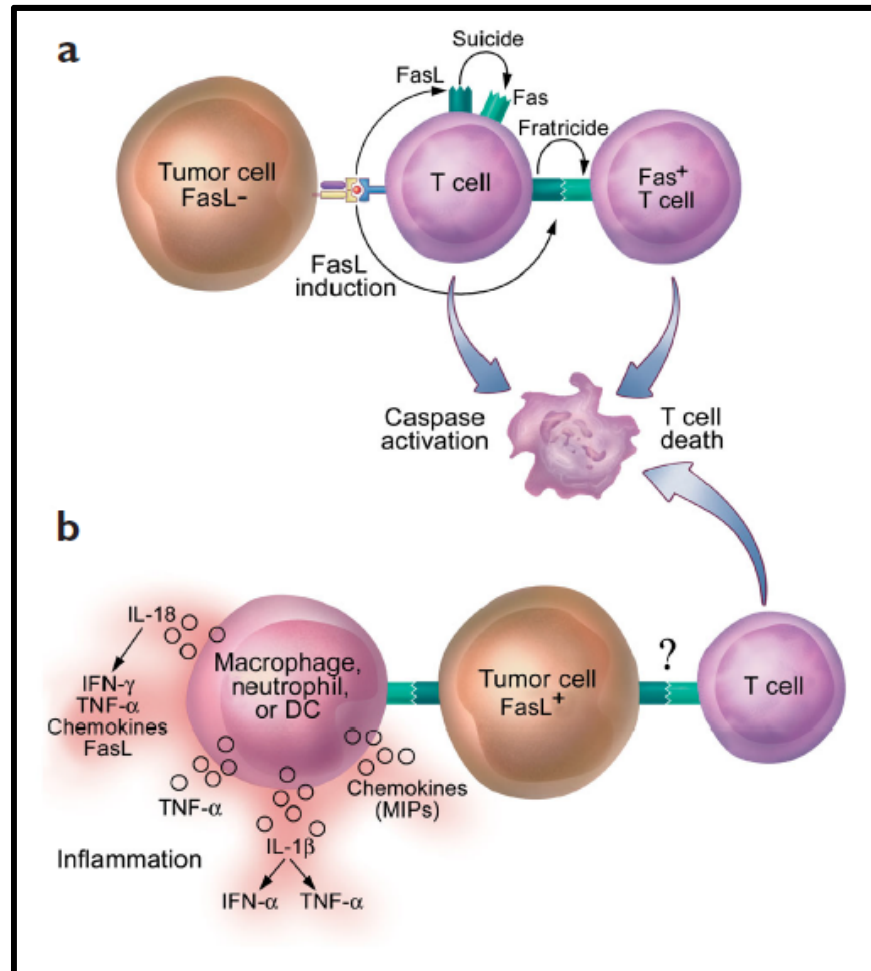
Fonte: ASKENASY et al. (2005)

**Figura 8** - Regulação fisiológica de respostas imunes induzidas pelos mecanismos de apoptose via interação das moléculas FAS / FASL. (A) A ativação de células T por meio da interação dos receptores de células T (TCR) com os peptídeos apresentados no contexto do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e a transdução de sinais leva a expressão de FAS e FASL. (B) Após repetida estimulação, as células T tornam-se sensíveis à apoptose mediado por FAS / FASL e sofrem morte celular induzida por ativação através da ação autócrina ou parácrina. (C) Tecidos imunologicamente privilegiados, como os olhos e testículos, expressam FASL que desencadeia a apoptose em linfócitos que expressão FAS como um mecanismo para prevenir a exacerbação de resposta inflamatórias. Da mesma forma, muitas células tumorais expressam FASL durante a progressão da doença e eliminam as células T anti-tumorais como um meio de evasão da resposta imune.

A molécula FAS é um receptor transmembrana tipo 1 de 48kDa, que geralmente está presente na superfície celular dos linfócitos T *naive* de forma

constitutiva. O FASL (CD95) é uma molécula transmembrana tipo II de 40 kDa que pertence à família do *Tumor Necrosis Factor* (TNF), sendo a sua expressão mais restrita e regulada (MIZUTANI et al. 2001).

As moléculas FAS e FASL se apresentam na forma ligada à membrana e solúvel no plasma, sendo a última gerada por clivagem das metaloproteinases e liberada no meio extracelular. As interações FAS/FASL na célula T estão envolvidas na morte celular induzida por quimioterápicos (IGNEY e KRAMMER 2002). O FASL induz o recrutamento e à ativação de proteases que iniciam a apoptose, como a caspase-8 e a caspase-10; e induz a morte celular através de várias vias de apoptose. A apoptose mediada por FAS se dá por via extrínseca através da ligação aos seus ligantes, como FASL, TNF- $\alpha$ , linfotoxina-alfa (LT- $\alpha$ ), TNF-1A (TL1A) e *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL/APO2L) (YAMADA et al. 2017). A molécula de FASL também é expressa em células tumorais, sendo um dos mecanismos de escape tumoral da resposta imune por induzir a apoptose de células T anti-tumorais (SUDA et al. 1993; BELLGRAU et al. 1995; KHONG e RESTIFO 2002) (Figura 9).



Fonte: KHONG e RESTIFO (2002)

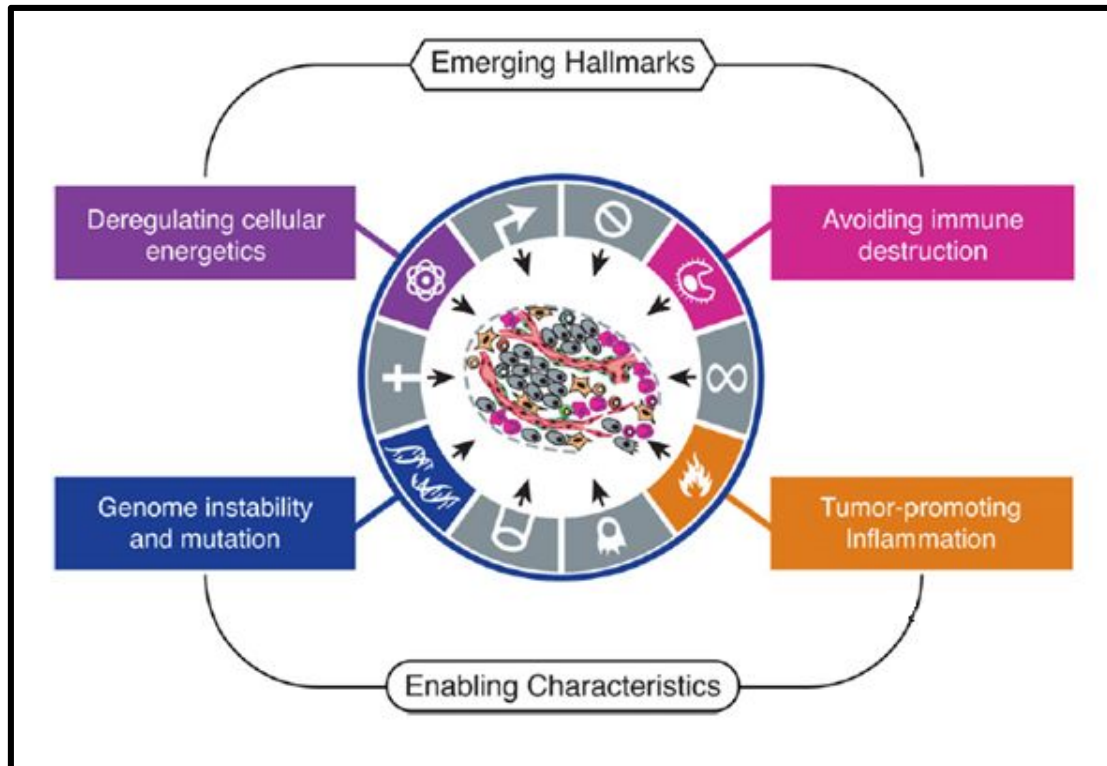
**Figura 9** - Modelos alternativos para a indução de morte de células T mediada por FasL após o encontro com células tumorais. (a) A morte induzida de células T após o reconhecimento de células tumorais. O reconhecimento do tumor leva à ativação de células T e o aumento da expressão de Fas e FasL na superfície da célula T, o que resulta na morte de células T por “suicídio” e de outras células T (parácrina) (b) As células tumorais expressam o FasL e eliminam as células T que expressam Fas que leva ao escape do tumor. No entanto, a ligação de Fas expressa em células imunes inatas, como neutrófilos, macrófagos e DCs imaturas por FasL expressa em células tumorais também pode levar à liberação de múltiplas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, preparando o cenário para a resposta anti-tumoral.

A apoptose mediada por FASL é crítica para homeostase de células efetoras TCD8+, cuja expressão induzível de FASL pelas células T é estritamente controlada por meio das interações intrínsecas entre vários reguladores transcricionais positivos

e negativos (YAMADA et al. 2017). A elevação dos níveis séricos das moléculas FASL e FAS foi descrita em mulheres com câncer de mama e relacionada com progressão tumoral, comprometimento de linfonodo, alto grau nuclear e pior prognóstico (EL-SARHA et al. 2009). Em pacientes com CMTN também está relacionado ao alto risco de metástase a distância (MALLETER et al. 2013). Em relação à terapia antineoplásica, estudos pré-clínicos sugerem que os efeitos da terapia estão associados a apoptose das células tumorais por meio da expressão do receptor FAS e de seu ligante para induzir a morte celular (EL-SARHA et al. 2009).

## 1.7 SISTEMA IMUNE E CÂNCER

HANAHAN e WEINBERG publicaram em 2000 “*The Hallmarks of Cancer*” onde caracterizaram a célula tumoral através de seis características: proliferação sustentada, resistência a morte, indução de angiogênese, capacidade invasiva e metastática, imortalidade replicativa e ausência de apoptose. Em 2011, em virtude do melhor entendimento do microambiente tumoral e do papel fundamental do sistema imunológico no câncer, esses mesmos autores atualizaram seu trabalho criando um modelo baseado em dois novos pilares: emergentes (*deregulating cellular energetics* e evasão do sistema imune) e *enabling characteristics* (instabilidade genômica e mutações e *tumor-promoting inflammation*) (HANAHAN e WEINBERG 2011) (Figura 10).



Fonte: HANAHAN e WEINBERG (2011).

Figura 10 - Hallmarks do câncer.

O sistema imunológico desempenha papel duplo no câncer: de um lado suprime o crescimento neoplásico através da destruição das células neoplásicas ou inibição do seu *outgrowth*; e de outro lado promove inflamação crônica no microambiente que pode levar ao crescimento tumoral (SCHREIBER et al. 2011).

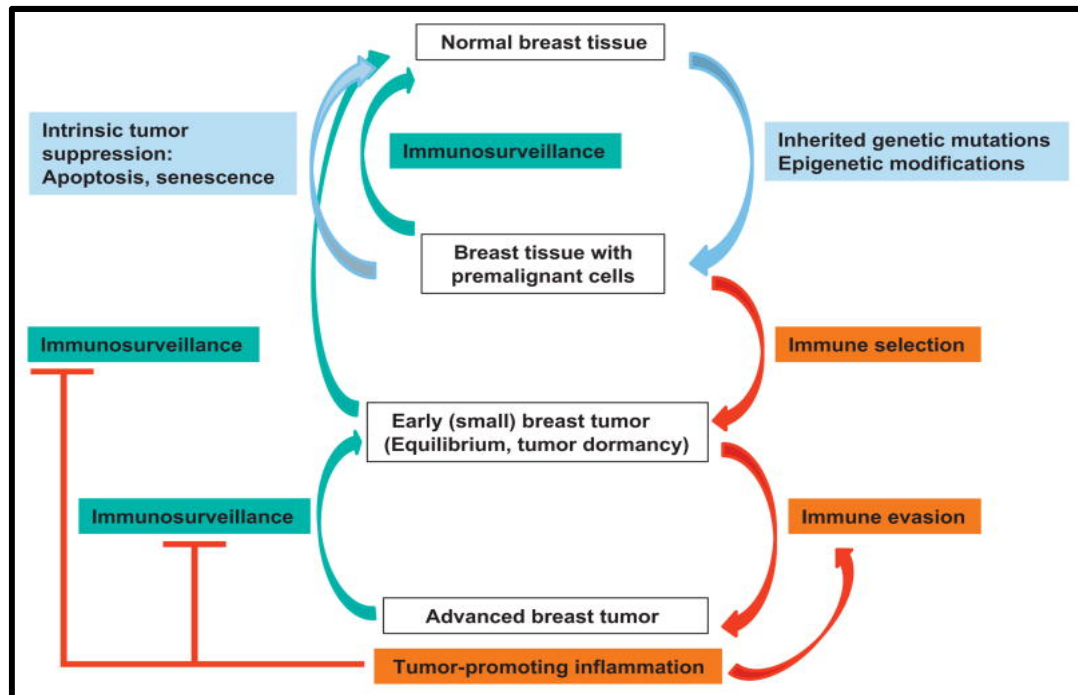
Vários estudos têm demonstrado que as células neoplásicas podem ser reconhecidas e controladas pelo sistema imune, através da ativação combinada da resposta imune adaptativa e inata (DISIS 2010). No início da formação do tecido tumoral ocorre liberação de fatores pró-angiogênicos, levando ao recrutamento de células NK, células T *Natural Killer* (NKT), macrófagos e DCs que levam à produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e conseqüentemente resposta pró-inflamatória (DUNN et al. 2004).

Na ativação da resposta imune celular, as células dendríticas após capturarem os antígenos neoplásicos, migram para os linfonodos regionais onde está localizado o tecido neoplásico e os apresentam as células T, levando a ativação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> que podem diferenciar-se em células efectoras T *helper* (Th)1, Th2, T reguladoras (Treg) ou Th17. Ainda no processo de reconhecimento antigênico, células TCD8<sup>+</sup> são ativadas e são capazes de causar lise das células neoplásicas (NAGARAJAN et al. 2018). Portanto, a depender do tipo de resposta no infiltrado poderemos ter resposta antitumoral com eliminação do tumor ou protumoral.

Na resposta antitumoral, as células Th1 desempenham papel fundamental na eliminação do tumor através da produção de IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL)- 2, contribuindo para ativação dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, aumentando a atividade citotóxica de macrófagos e induzindo a expressão de moléculas MHC I e II (NAGARAJAN et al. 2018). Por outro lado, se houver diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> em Th2, ocorrerá a produção de várias citocinas que atuam no bloqueio da resposta Th1 e células NK, levando ao crescimento neoplásico (NAGARAJAN et al. 2018). A interação entre o tumor e o sistema imune pode ser mensurado de duas formas, pelas técnicas de imunohistoquímica e citometria de fluxo (BROWN et al. 2014).

O câncer de mama é frequentemente iniciado por alterações genéticas e epigenéticas em genes que regulam a função das células epiteliais mamárias (COUSSENS e POLLARD 2011). Para prevenir o desenvolvimento do CM, diversos mecanismos intrínsecos de supressão tumoral induzem a senescência ou apoptose de células neoplásicas (XU et al. 2011; NICHOLLS et al. 2012). Paralelamente, o sistema imunológico atua como um supressor de tumores extrínsecos que pode

eliminar células neoplásicas e limitar seu crescimento quando estas escapam dos mecanismos intrínsecos de supressão tumoral (VESELY et al. 2011). A contribuição do sistema imunológico para a inibição e progressão do CM está resumida na Figura 11.



Fonte: Adaptado de JIANG e SHAPIRO (2014)

**Figura 11** - Imunovigilância e inflamação no câncer de mama.

As neoplasias de mama são constituídas por uma variedade de componentes celulares, como as células malignas, endoteliais, estruturais e células do sistema imune (ALBINI e SPORN 2007; FRIDMAN et al. 2012). O ambiente tumoral é composto por células do sistema imune, como linfócitos TCD8+ citotóxico, Th1/Th17, células NK, células NKT, neutrófilos, macrófagos e DCs que refletem a tentativa do sistema imune de promover uma resposta antitumoral (ZITVOGEL et al. 2011; FRIDMAN et al. 2011; BURHOLDER et al. 2014). A ativação dos linfócitos



T CD8+, incluindo células NK, NKT, e de células TCD4+ é fundamental para a eliminação do tumor através da imunovigilância (VERMA et al. 2013).

As moléculas de PD1 estão expressas em até 70% dos linfócitos do infiltrado tumoral no CM, e 30% no tecido mamário normal; e a presença de PD1 nesses linfócitos foi associada com pior sobrevida global e maior risco de metástase. Enquanto o PD-L1 pode estar expresso em até 50% das células mamárias cancerígenas. Estudos sugerem que a ativação da via de sinalização PD1/PD-L1 pode modular a imunidade antitumoral, permitindo a progressão tumoral (MUENST et al. 2013; SABATIER et al. 2015). A presença de PD1+ nos *tumor infiltrating lymphocytes (TILs)* de pacientes com CM ocorre com maior frequência no subtipo triplo-negativo, seguido do Luminal A. Como as opções de tratamento para CMTN são limitadas, terapias alvo anti-PD1 representam uma alternativa atrativa nessa subpopulação de pacientes (MUENST et al. 2013; SABATIER et al. 2015).

A resposta imune contra o tumor pode ser diferente entre os tratamentos adjuvante e neoadjuvante, apontando para uma potencial interação do perfil imunológico tumoral e sua modulação por exposição à quimioterapia. A resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante tem sido demonstrado ser maior em pacientes que expressam PD-L1 (50% contra 21%) em relação aos que não possuem (GARCIA-MARTINEZ et al. 2014; SABATIER et al. 2015). Além da via PD1/PD-L1, existem outros mecanismos que promovem a diminuição da resposta imune celular, através da expressão de receptores da via extrínseca apoptose celular, como FAS e FASL.

Com relação à análise do padrão de células imunes na pós-quimioterapia no câncer de mama residual, sabe-se que pode fornecer uma melhor estratificação

prognóstica desse grupo, e contribuir para identificar subgrupos de pacientes passíveis de estratégias terapêuticas visando a resposta imune do tumor. As pacientes com CMTN têm um pior prognóstico geral em comparação com outros subtipos devido a um alto risco de recorrência e um curso de doença agressivo.

Há uma grande necessidade de novas opções de tratamento e terapias direcionadas eficazes. Devido à heterogeneidade considerável dentro do subtipo CMTN em termos de características histológicas e moleculares, ele provavelmente compreende vários subtipos que estão em processo de identificação. A pesquisa básica sobre a biologia do tumor é essencial para encontrar novas vias de câncer e novos alvos potenciais, que podem não ser necessariamente específicos para o CMTN, mas podem levar a melhores resultados do tratamento. De fato, o perfil molecular pode definir melhor os subtipos adicionais dentro do CMTN e levar à identificação de alvos terapêuticos (LEHMANN et al. 2011).

No câncer de mama metastático, resultados preliminares de ensaios clínicos de fase I com anticorpos anti-PD-L1 mostrou resultados encorajadores. A imunoterapia representa uma modalidade de tratamento promissora que merece mais pesquisas sobre os mecanismos da resposta imune câncer de mama, especialmente no CMTN, para o qual faltam tratamentos eficazes. O papel da resposta imune precisa ser investigado em diferentes subtipos de câncer de mama, já que os resultados preliminares mostram uma resposta mais favorável no CMTN e, em menor escala, no câncer de mama RE+, indicando que a resposta imune pode diferir de acordo com subtipos. Além disso, os biomarcadores que preveem benefícios da imunoterapia precisam ser identificados. Embora a expressão de PD-L1 foi utilizada para a

elegibilidade em testes de câncer de mama até o momento, seu valor para o benefício da imunoterapia é desconhecido (PUSZTAI et al. 2016).

Estudos em humanos têm demonstrado uma significativa associação entre a presença do infiltrado linfocitário tumoral e a resposta clínica ao tratamento em pacientes com diversos tumores sólidos. Nos últimos anos, tem-se avaliado o prognóstico e a importância do infiltrado linfocitário tumoral no câncer de mama, utilizando técnicas de imunohistoquímica, na tentativa de individualização do tratamento oncológico. No câncer de mama triplo-negativo, elevados níveis de linfócitos no infiltrado tumoral na doença residual foram preditivos na melhora de sobrevida (LOI et al. 2013; DIECI et al. 2014).

Diante do exposto, pode-se observar que o sistema imune age através de diferentes populações celulares e mecanismos de ativação e inibição da resposta celular, promovendo tanto a imunovigilância quanto o escape imune no câncer de mama. Vários estudos têm avaliado o prognóstico e a importância do infiltrado linfocitário tumoral no câncer de mama, utilizando técnicas de imuno-histoquímica. Entretanto, faltam estudos que avaliem a resposta imune celular no sangue periférico antes e após tratamento neoadjuvante. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta imune celular em mulheres com CMTN, localmente avançado, submetidas a quimioterapia neoadjuvante e sua relação com a resposta patológica completa.

## ***OBJETIVOS***

---

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nas pacientes com câncer de mama triplo-negativos localmente avançados.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Em mulheres com câncer de mama subtipo triplo-negativo, antes e após tratamento com quimioterápico neoadjuvante:

- Determinar os níveis de células T totais, TCD4+, TCD8+ no sangue periférico;
- Determinar os níveis de expressão dos receptores CD28, FAS, CTLA4 e PD1 na superfície dos linfócitos T no sangue periférico;
- Associar os níveis encontrados de células T totais, TCD4+, TCD8+ e dos receptores CD28, FAS, CTLA4 e PD1 com o tipo de resposta a quimioterapia neoadjuvante;
- Comparar os efeitos do tratamento neoadjuvante na resposta imune celular;
- Associar o perfil de expressão dos receptores CD28, FAS, CTLA4 e PD1 na superfície dos linfócitos T com a sobrevida livre de doença.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 DESENHO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS**

Trata-se de um estudo longitudinal com seguimento realizado entre os anos de 2015 e 2017. O estudo foi realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Para realização do estudo foi obtida uma amostra não-probabilística de conveniência entre março 2015 e julho de 2017.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP e Hospital de Câncer de Pernambuco sob os números CAAE 39967014.3.3002.5201 e CAAE 39967014.3.0000.5205, respectivamente (Anexo 2), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE).

#### **3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

**Pacientes:** foram incluídas 30 mulheres, entre 18 e 60 anos de idade, com diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo (CMTN) localmente avançado e submetidas a quimioterapia neoadjuvante.

**Controles de comparação:** os indivíduos controles saudáveis foram 30 mulheres saudáveis com idade entre 18 a 60 anos sem diagnóstico prévio ou atual, e histórico familiar de CM.

### **3.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO**

O estudo foi realizado no ambulatório da Oncologia Clínica do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). A coleta de amostras biológicas e as análises laboratoriais ocorreram no período 01 de março de 2015 a 30 de julho de 2017. As pacientes foram acompanhadas para observar o desfecho clínico até 31 de março de 2019.

### **3.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE E PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES**

Foram selecionadas mulheres com câncer de mama triplo-negativo, sendo incluídas as que preenchem os critérios de inclusão e exclusão.

#### **3.4.1 Critérios de Inclusão**

Todas as pacientes receberam informações sobre o projeto e apenas foram incluídas no trabalho após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os critérios de inclusão são:

- Mulheres com idade entre 18 e 60 anos;



- Assinatura TCLE
- Diagnóstico histológico de carcinoma invasivo de tipo não especial (TNE) ou carcinoma ductal invasivo sem outra especificação (SOE) ou carcinoma lobular invasivo ou carcinoma misto;
- Imuno-histoquímica (IHQ) com receptor de estrógeno (RE) < ou = 1%, receptor progesterona (RP) < ou = 1% e expressão da proteína HER-2 0 ou 1+ pela IHQ ou 2+ e *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) não amplificado de acordo com os critérios da sociedade Americana de Oncologia Clínica e Colégio Americano de Patológica (ASCO/CAP)
- Estadiamento clínico TNM (7 edições) IIIA ou IIIB ou IIIC;
- Performance Status 0-2 (Escala ECOG – anexo 3);
- Hemoglobina  $\geq 10$ ; neutrófilos  $\geq 1500/\text{mm}^3$ ; plaquetas  $\geq 100.000/\text{mm}^3$ ; creatinina < 2 mg/dL; bilirrubina total de 1,6 mg/dL; transaminases (TGO e TGP) menor que duas vezes o limite inferior de normalidade.

#### 3.4.2 Critérios de Exclusão

- Tumores origem mesenquimal, fibro-epiteliais, lesões precursoras, epiteliais-mioepiteliais, linfoma ou outros tipos de carcinoma;
- Metástases à distância diagnosticados por método de imagem;
- Gestantes e mulheres em amamentação;
- Uso de medicamentos imunossupressores acima de 30 dias;
- Comorbidades graves que contraindicam a quimioterapia;
- Neoplasia prévia, exceto câncer de pele não melanoma;
- Pacientes com história clínica de HIV e HTLV;

- Portadoras ou história familiar de doença autoimune;
- História e sinais de infecção nos últimos 30 dias.

### **3.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA**

As lâminas foram revisadas por dois patologistas (LAD e SG), seguindo o manual de padronização de laudos histopatológicos da Sociedade Brasileira de Patologia 2014. Sendo incluído no relatório anatomopatológico final: tipo de espécime, lateralidade e local do tumor, características do tumor (dimensões, multifocalidade, multicentricidade, tipo histológico, componente *in situ* associado, grau histológico), invasão vascular, status das margens pintadas com nanquim, menor distância do tumor às margens, status axilar (número de linfonodos comprometidos / número de linfonodos encontrados, dimensão do menor foco metastático, extensão extra capsular e/ou coalescência), estadiamento patológico (yTNM). As imuno-histoquímicas foram realizadas de acordo com os critérios da sociedade brasileira de patologia e ASCO/CAP.

### **3.6 FLUXOGRAMA DE CAPTAÇÃO DE PACIENTES, TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO E COLETA DE AMOSTRA BIOLÓGICA**

As pacientes atendidas no ambulatório de oncologia clínica, com diagnóstico confirmado de câncer de mama triplo-negativo, localmente avançado, foram avaliadas quanto aos critérios de elegibilidade. As pacientes foram esclarecidas

quanto aos objetivos do estudo e convidadas a participar da pesquisa, sendo aplicada uma lista de checagem (Apêndice 1), utilizando os critérios de elegibilidade. As pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice 2) e responderam a um instrumento padronizado de coleta de dados (Apêndice 3).

O preenchimento de coleta de dados foi complementado por anotações rotineiras do prontuário médico, contendo todas as informações sobre a história pessoal pregressa, dados sociodemográficos, história médica atual, achados clínicos e laboratoriais.

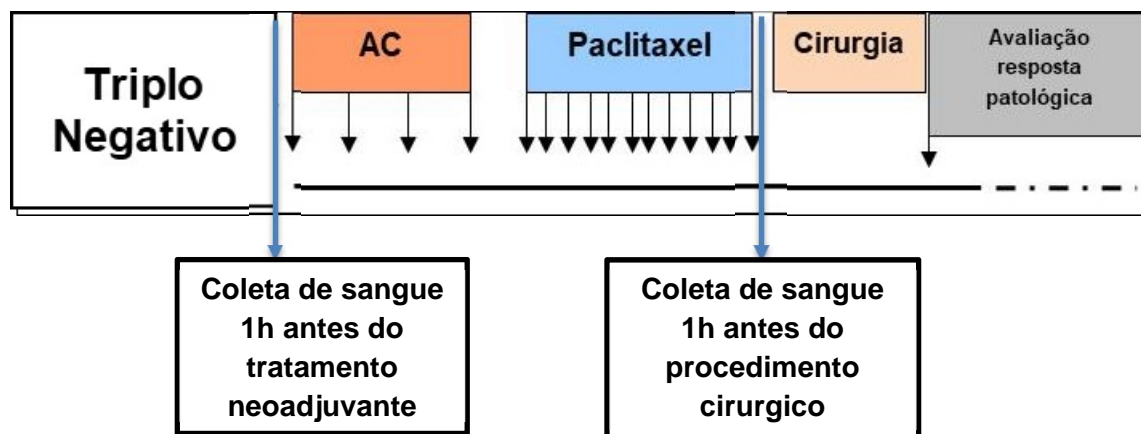
### **3.6.1 Tratamento quimioterápico**

O tratamento quimioterápico foi realizado com as medicações anti-neoplásicas adriplastina RD e evotaxel do Laboratório Pfizer) que foram adquiridas pelo médico oncologista e pesquisador responsável desse estudo e conservadas na farmácia de quimioterapia do setor de oncologia do HCP. O esquema de quimioterapia neoadjuvante padrão para as pacientes com CMTN no HCP foi adriamicina ciclofosfamida em dose densa a cada 15 dias, seguida de paclitaxel a cada 7 dias. Antes de cada ciclo de quimioterapia neoadjuvante, a paciente foi avaliada pelo oncologista, sendo realizado o perfil de toxicidade, reposta clínica e exames laboratoriais (hemograma completo e bioquímica – TGO/TGP; bilirrubinas e desidrogenase láctica – DHL). Após o tratamento cirúrgico não foi administrado nenhum tratamento medicamentoso adjuvante. Detalhes do esquema terapêutico a seguir (Figura 12):

- **Fase 1:** dose de  $60 \text{ mg/m}^2$  de adriamicina RD com  $600 \text{ mg/m}^2$  de ciclofosfamida (Laboratório Baxter) por via endovenosa a cada 15 dias, total 4 ciclos. Após 24 horas da medicação antineoplásica, foi aplicada filgastrina  $300 \text{ }\mu\text{g/dia}$ , subcutânea por 5 dias.
- **Fase 2:** dose  $80 \text{ mg/m}^2$  de Paclitaxel (Laboratório Pfizer) a cada 7 dias durante 12 semanas seguidas.

### 3.6.2 Coleta do material biológico

A primeira coleta de sangue periférico foi realizada no dia do início do tratamento neoadjuvante (pré- QT Neo), uma hora antes da aplicação da medicação anti-neoplásica; e a segunda coleta de sangue foi realizada após o tratamento neoadjuvante (pós-QT Neo), sendo feita uma hora antes do início da cirurgia (Figura 12). O tratamento cirúrgico foi realizado entre duas a quatro semanas após o término da quimioterapia neoadjuvante e a peça cirúrgica foi encaminhada para avaliação anatomopatológica. Entre quatro e doze semanas após a cirurgia, as pacientes iniciaram tratamento adjuvante com radioterapia.



**Figura 12** - Esquema tratamento neoadjuvante. TN: Triplo-negativo; AC: adriamicina e ciclofosfamida a cada 15 dias e paclitaxel realizado semanalmente. Coleta de sangue periférico antes da quimioterapia neoadjuvante (pré-QT Neo) e após- quimioterapia neoadjuvante (pós-QT Neo).

### 3.7 SEGUIMENTO DAS PACIENTES DURANTE O ESTUDO

As pacientes foram avaliadas com exame clínico, hemograma, função renal, bilirrubinas e transaminases antes do primeiro dia de cada ciclo. Após completar o tratamento quimioterápico neoadjuvante as pacientes foram encaminhadas para procedimento cirúrgico, seguido de radioterapia adjuvante. Foi realizado um formulário de acompanhamento com data da inclusão: corresponde à data da inclusão da paciente no estudo, data do diagnóstico: corresponde a data da primeira biópsia confirmando o diagnóstico de câncer e a data 1º consulta com especialista: corresponde a data em que a paciente foi avaliada pelo especialista em câncer, seja mastologista ou oncologista clínico. O acompanhamento foi atualizado em cada consulta e foram consideradas as seguintes possibilidades: vivo sem doença, vivo com doença, morte por câncer, morte por outra causa e perda de seguimento.

### 3.8 DEFINIÇÃO DOS TERMOS E VARIÁVEIS

- **Grau histológico** - variável categórica policotômica, grau 1 –bem diferenciado (baixo grau); grau 2 – moderadamente diferenciado (grau intermediário); grau 3- pouco diferenciado (alto grau).
- **Grau 1, grau 2, grau 3** - baseados no grau de diferenciação, índice mitótico e pleomorfismo, definido por Scarff-Bloom-Richardson (1957).
- **Estadiamento** - variável categórica policotômica, definido no Anexo 1.
- **Imuno-histoquímica** - variável categórica policotômica, definida como a presença ou ausência da expressão de receptores hormonais estrógeno e progesterona com sua porcentagem, além da superexpressão da proteína HER2, registrado em prontuário do paciente.
- **Taxa de resposta:** A avaliação de resposta foi realizada utilizando os critérios abaixo. A avaliação de resposta patológica foi realizada no exame anatomopatológico. Assim teremos:
  - **Resposta patológica completa (RC):** Ausência de carcinoma invasivo na mama ou axila
  - **Resposta parcial (RP):** Presença de carcinoma invasivo na mama ou axila.
  - **Progressão (PD):** Aumento de 25% na maior dimensão do tumor, medido pela USG mamária
- **Recorrência local:** A recorrência local é definida como a recidiva na região mamária e/ou em linfonodos locorregionais.

- **Recorrência à distância:** A recorrência a distância é definida como a recidiva fora da região mama e linfonodos locorregionais, incluindo: Óssea, hepática, pulmonar, pele e SNC.
- **Sobrevida livre de doença:** A sobrevida livre de doença foi calculada a partir do primeiro dia após a realização do tratamento cirúrgico até a data da constatação da recorrência, seja local ou à distância.
- **Sobrevida global:** A sobrevida global foi calculada a partir da data do diagnóstico até o óbito ou data da última consulta.

### **3.9 TESTES LABORATORIAIS**

Foi coletado amostra de sangue periférico (4 mL) em tubo contendo anticoagulante EDTA das pacientes e controles. A coleta foi realizada utilizando material descartável e esterilizado, seguindo os princípios de assepsia, conforme as normas de biossegurança, em seguida o material biológico foi encaminhado ao Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP para processamento.

#### **3.9.1 Imunofenotipagem por citometria de fluxo**

- **Painéis de anticorpos monoclonais para fenotipagem de células TCD3+, TCD4+ e TCD8+ e marcação de PD1, FAS, CTLA4, e CD28 no sangue periférico**

Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais (mAb): 5 µL de anticorpos monoclonais (mAb) anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 (BD, Pharmigen, San Diego, CA), em seguida, incubada à temperatura ambiente por 15 min e protegido da

luz. As células T possuem fenótipos: T total (CD3+), TCD4+ (CD3+/CD4+/CD8-) e TCD8+ (CD3+/CD4-/CD8+). Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais para avaliar a expressão de PD1, FAS, CTLA4 e CD28: 5 µL de anticorpos monoclonais anti-CD28, anti-CD279 (PD-1), anti-CTLA4 e anti-CD95 (FAS) (Becton Dickinson-BD, Pharmigen, San Diego, CA). As combinações dos painéis utilizadas foram: (CD3/CD4/CD8/PD1), (CD3/CD4/CD8/CD28), (CD3/CD4/CD8/FAS) e (CD3/CD4/CD8/CTLA-4). Devido aos baixos níveis de linfócitos TCD3+/CTLA4+, não foi possível analisar as subpopulações TCD4+/CTLA+ e TCD8+/CTLA4+ e por isso não foram incluídas nos resultados.

Após a incubação com anticorpos monoclonais referidos acima, foi adicionado 1,8 mL de tampão de lise de hemácias (FACS<sup>®</sup> *Lysing Buffer*, Becton Dickinson, Mountain View, CA) e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente, e protegido da luz. Em seguida, foram realizadas lavagens, adicionando-se 2 mL de tampão PBS 1x concentrado e centrifugando-se a 300 x g por 5 min a 20 °C (este procedimento será repetido três vezes). Após a terceira lavagem, foi descartado o sobrenadante e as células foram ressuspendidas em 400L solução tampão salina e adquiridas no citômetro de fluxo (FACSVERSE, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA). Foram adquiridos 30.000 eventos celulares no “gate” de linfócitos e as análises dos resultados foram realizadas no programa *FACSuite* (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais.



## **3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

### **3.10.1 Análises de associação**

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (mediana e interquartil (IQR)).

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). Teste não paramétrico de *Kruskall-Wallis* foram utilizados para comparação entre três grupos. Para evitar erro estatístico tipo I, essas análises foram seguidas pela correção de Dunn para testagem múltipla. Foi adotado o nível de significância estatística de  $p < 0.05$ . A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

### **3.10.2 Análises pareadas antes e após tratamento**

Para análise pareada pré e pós tratamento, foi utilizado o teste não paramétrico de *Wilcoxon*. Foi adotado o nível de significância estatística de  $p < 0.05$ . A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

### 3.10.3 Análises de sobrevida

A sobrevida global (SG) foi calculada em meses, a partir da data de admissão neste estudo até a data do óbito ou da última consulta documentada (evento) ou censura. O dado foi censurado na data do último acompanhamento do estudo (24 meses da data de diagnóstico). A sobrevida global e seu respectivo intervalo de confiança a 95% foram estimados pelo método de *Kaplan-Meier*. A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada em meses, a partir da data do primeiro dia do tratamento neoadjuvante até a data da constatação da recorrência, seja local ou à distância. As SG e SLD foram estimadas pelo método de *Kaplan-Meier*.

### 3.10.4 Análises de SLD

A análise da SLD, utilizando como ponto de corte o valor de mediana ( $<$  ou  $\geq$  percentil 50) dos níveis percentuais de TCD3+, TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD28, PD1, FAS e CTLA4 obtidos após tratamento neoadjuvante, a partir da coleta do material biológico que ocorreu uma hora antes do procedimento cirúrgico. O teste de *Log-Rank* foi utilizado para comparação entre os grupos. Foi adotado o nível de significância estatística de  $p < 0.05$ . A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

## ***RESULTADOS***

---

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Foi realizada a análise de 30 pacientes com câncer de mama triplo-negativo localmente avançado. A idade das pacientes variou entre 27 e 60 anos, mediana de idade de 44,5 anos (35,5-51,7), a maioria das pacientes encontra-se na faixa etária  $\leq 50$  anos (43,3%). Em relação ao *status* menopausal, 62,1% estavam na pré-menopausa e 37,9% pós-menopausa. Quanto ao grau nuclear, 63% dos tumores eram de grau 3, seguido de 27% de grau 2. Em relação ao estágio clínico, 30% estavam no estágio IIIA, 63,4% estágio IIIB e 6,6% estágio IIIC. Na avaliação da resposta ao tratamento neoadjuvante 56,7% das pacientes tiveram resposta patológica completa, e 43,3% de resposta parcial. (Tabela 1). Das 30 pacientes avaliadas, 6 (20%) apresentaram recorrência a distância, cinco pacientes com recidiva no Sistema Nervoso Central e uma no pulmão, a taxa de óbito por câncer de mama foi de 13,3%.

**Tabela 1** - Distribuição das frequências absolutas e relativas das Características clínicas e histopatológicas de 30 pacientes com Câncer de Mama triplo-negativo localmente avançado, tratados no Hospital de Câncer de Pernambuco, 2015-2017.

CARACTERÍSTICAS	N	
<b>Idade (anos)</b>	44,5	
<b>mediana (IQR)</b>	(35,5-51,7)	
	N= 30	%
<b>Idade (anos)</b>		
≤ 50 anos	20	66,6
>50 ≤ 60 anos	10	33,3
<b>Status menopausa</b>		
Pré Menopausa	21	62,1
Pós Menopausa	9	37,9
<b>Grau nuclear</b>		
2	8	27,0
3	22	63,0
<b>Estadiamento</b>		
IIIA	9	30,0
IIIB	19	63,4
IIIC	2	6,6
<b>Resposta patológica completa</b>		
Sim	17	56,7
Não	13	43,3
<b>Recorrência à distância</b>		
Sim	6	20
Não	24	80
<b>Óbito por câncer</b>		
Sim	4	13,3
Não	26	86,7

IQR: Interquartil 25-75.

## **4.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS PERCENTUAIS DE CÉLULAS TCD3+, TCD4+, TCD8+ COM EXPRESSÃO NA MEMBRANA DE CD28, FAS E PD1 NO SANGUE PERIFÉRICO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO, DE ACORDO COM TIPO DE RESPOSTA A QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE**

Foram realizadas as análises entre os grupos de pacientes com CMTN que apresentou resposta completa (RC; mediana 43,0 anos, IQR 34-48) e parcial (RP; mediana 47 anos, IQR 37,2-51,2), e grupo controle. O grupo controle foi constituído de mulheres saudáveis com mediana da idade de 53 anos (48-58 anos). Antes das análises, foi realizada a comparação entre as medianas das idades do grupo controle e das pacientes, e não foi observado diferença significativa entre os grupos.

### **4.2.1 Células TCD3+**

Verificou-se níveis aumentados de TCD3+ CD28+ e TCD3+ PD1+ no sangue periférico dos grupos de mulheres que obteve RC e RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Para as demais análises, como níveis de TCD3+ e TCD3+ FAS+ não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 13A-D).

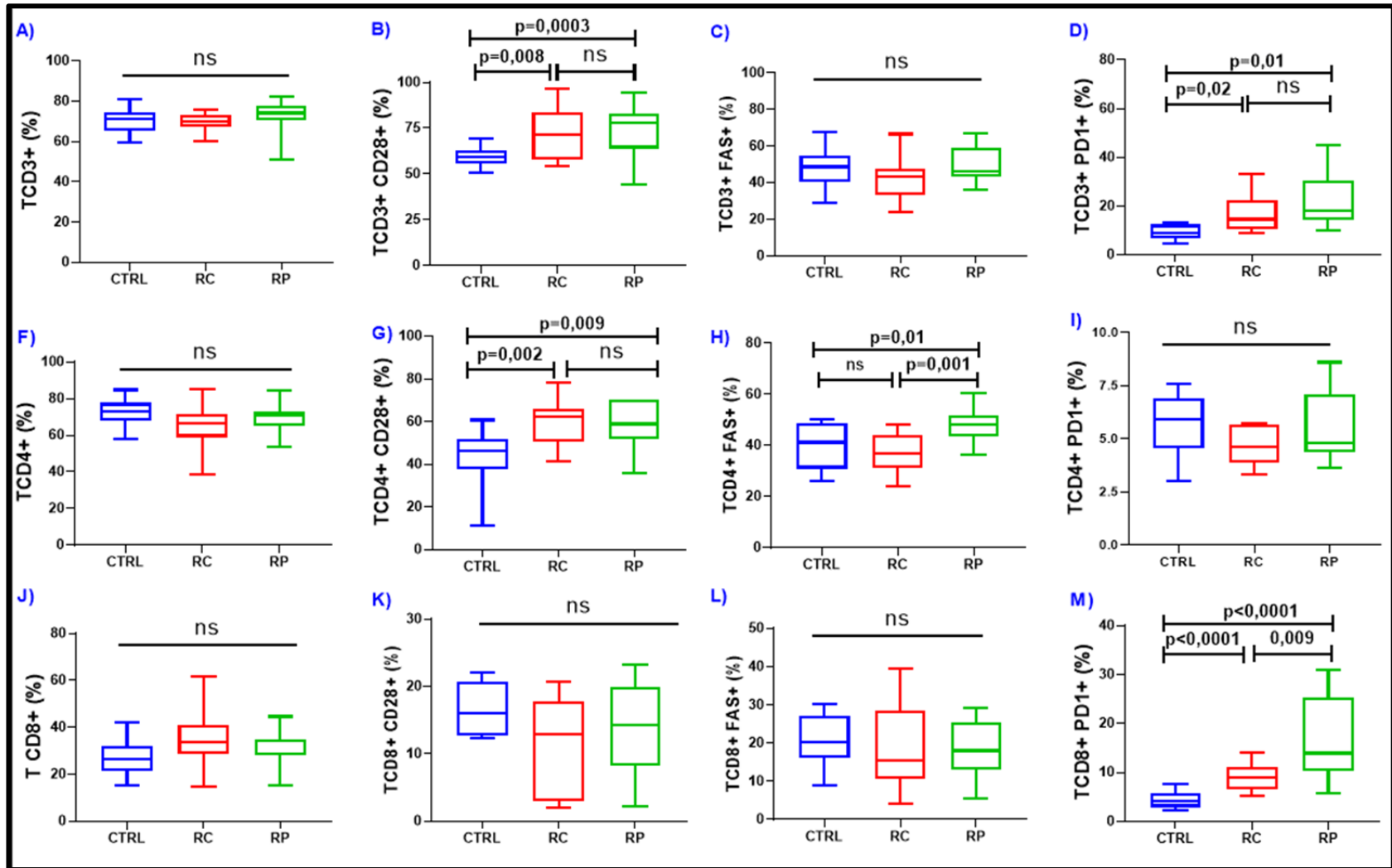
### **4.2.2 Células TCD4+**

Verificou-se níveis aumentados de TCD4+ CD28+ no sangue periférico dos grupos de mulheres que obteve RC e RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Foram observados níveis elevados de TCD4+ FAS+ no

grupo de pacientes com RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado aos grupos com RC e controle ( $p < 0,05$ ). Para as demais análises, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 13F-I)

#### **4.2.3 Células TCD8+**

Foram observados níveis aumentados de TCD8+ PD1+ nos grupos de pacientes com CMTN com RC e RP quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Porém, o grupo de pacientes com RP apresentou níveis mais elevados de TCD8+ com expressão de PD1+ quando comparado aos grupos com RC e controle ( $p < 0,05$ ). Para as demais análises, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 13J-M)

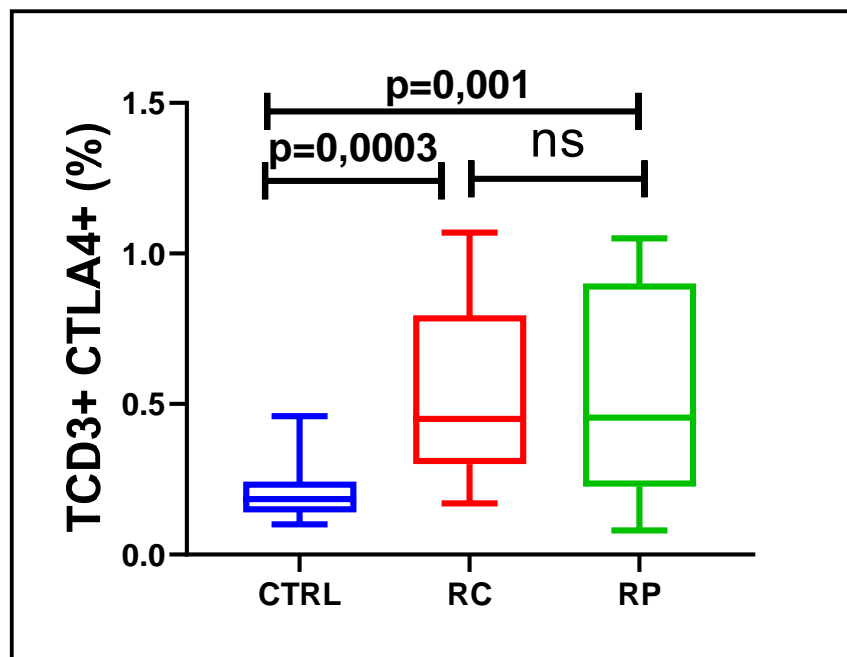


**Figura 13** - Análise dos níveis de linfócitos TCD3, TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD28, FAS e PD1 entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo que obtiveram resposta patológica completa (RC, n=17) e parcial (RP, n= 13) ao tratamento neoadjuvante, e controles (CTRL; n=30). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (IQR). Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . ns: não significativo.



### 4.3 ANÁLISES DOS NÍVEIS PERCENTUAIS DE CÉLULAS TCD3+ CTLA4+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO, DE ACORDO COM TIPO DE RESPOSTA A QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

Verificou-se níveis aumentados de TCD3+ CTLA4+ no sangue periférico dos grupos de mulheres que obtiveram RC e RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado ao grupo controle ( $p=0,0003$  e  $p=0,001$ , respectivamente) (Figura14).



**Figura 14** - Análise dos níveis de linfócitos TCD3 CTLA4+ entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo que obtiveram resposta patológica completa (RC,  $n=17$ ) e parcial (RP,  $n=13$ ) ao tratamento neoadjuvante, e controles (CTRL;  $n=30$ ). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (IQR). Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . ns: não significativo.

#### **4.4 ANÁLISES DOS ÍNDICES OBTIDOS NA RELAÇÃO TCD4+ / TCD8+, RELAÇÃO TCD4+CD28+ / TCD8+CD28+, RELAÇÃO TCD4+FAS+ / TCD8+FAS+ E RELAÇÃO TCD4+PD1+ / TCD8+PD1+**

##### **4.4.1 Relação TCD4+/TCD8+**

Foram realizadas as análises dos índices obtidos da relação TCD4+/TCD8+ entre os grupos de pacientes com CMTN que apresentou resposta completa (RC) e parcial (RP), e grupo controle. Não foi observada diferença significativa nos valores da relação TCD4+/TCD8+ entre os grupos (Figura 15A).

##### **4.4.2 Relação TCD4+CD28+ / TCD8+CD28+**

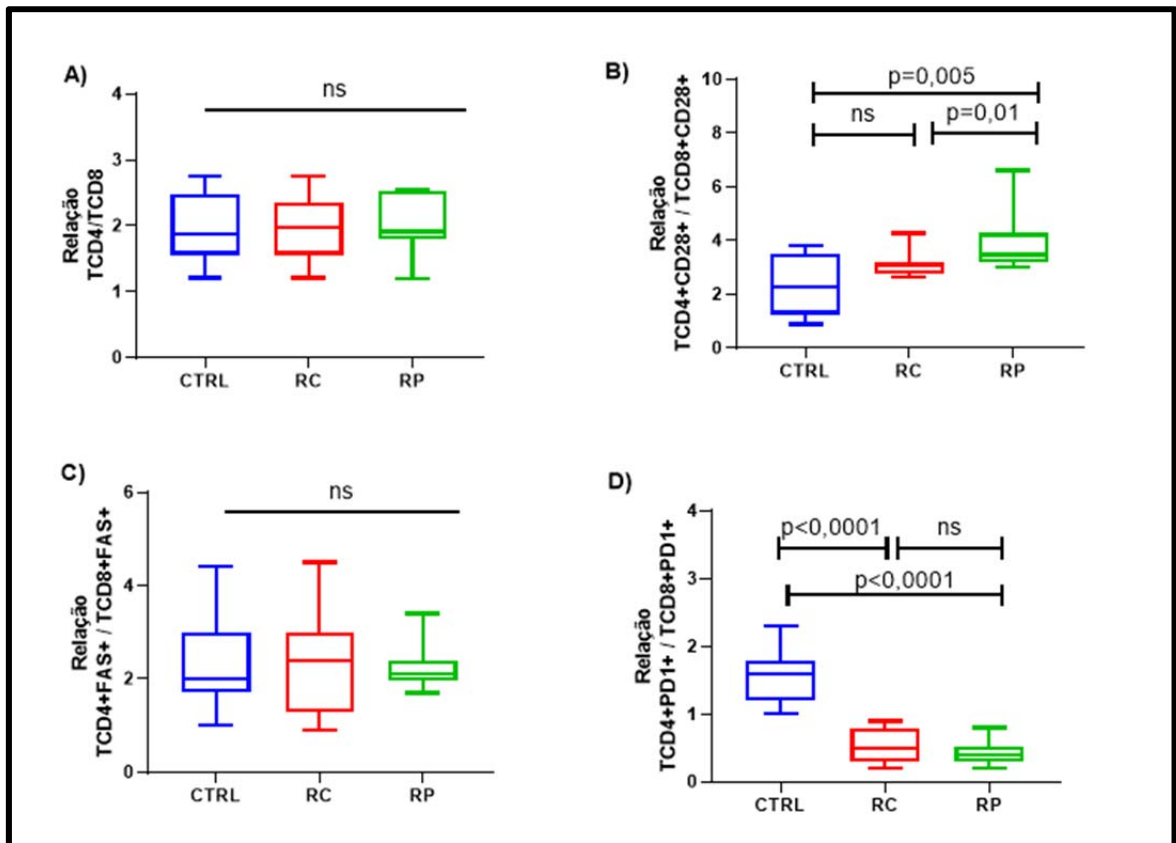
Verificou-se níveis aumentados nos índices obtidos na relação TCD4+CD28+/TCD8+CD28+ nos grupos de mulheres que obteve RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado aos grupos com RC e de controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15B).

##### **4.4.3 Relação TCD4+FAS+/TCD8+FAS+**

Não foi observada diferença significativa nos valores dos índices obtidos da relação TCD4+FAS+/TCD8+FAS+ entre os grupos (Figura 15C).

##### **4.4.4 Relação TCD4+PD1+/ TCD8+PD1+**

Verificou-se níveis reduzidos nos índices obtidos da relação TCD4+PD1+/TCD8+PD1+ nos grupos de mulheres que obteve RC e RP ao tratamento neoadjuvante quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 15D).



**Figura 15** - Análises dos valores da relação TCD4+/TCD8+, relação TCD4+CD28+/TCD8+CD28+, relação TCD4+FAS+/TCD8+FAS+ e relação TCD4+PD1+/TCD8+PD1+ entre os grupos de mulheres com câncer de mama triplo-negativo com resposta patológica completa (RC, n=17) e parcial (RP, n= 13) ao tratamento neoadjuvante, e de controles (CTRL; n=30). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (IQR). Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . ns: não significativo.

## **4.5 ANÁLISES PAREADA DOS NÍVEIS PERCENTUAIS DE CÉLULAS TCD3+, TCD4+, TCD8+ E DOS RECEPTORES CD28, FAS E PD1 NO SANGUE PERIFÉRICO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE**

### **4.5.1 Células TCD3+**

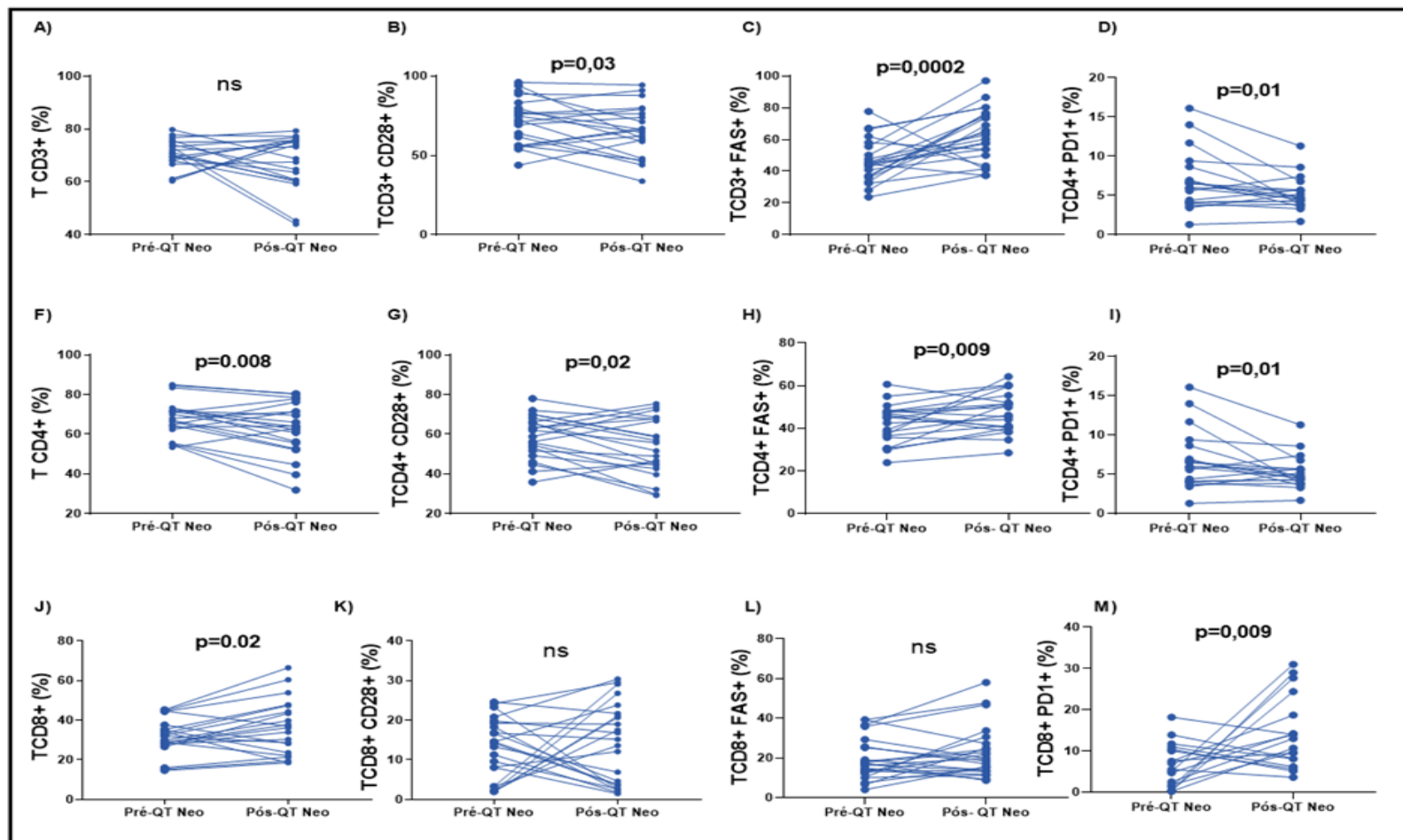
Verificou-se diferença significativa na análise pareada dos níveis percentuais de TCD3+CD28+, TCD3+FAS e TCD3+PD1+ encontrados no sangue periférico das mulheres com CMTN antes (Pré-QT Neo) e após do tratamento neoadjuvante (Pós-QT Neo) ( $p < 0,05$ ). Para as demais análises, não foram observadas diferenças significativas (Figura 16A-D).

### **4.5.2 Células TCD4+**

Verificou-se diferença significativa na análise pareada dos níveis percentuais de TCD4+, TCD4+CD28+, TCD4+FAS e TCD4+PD1+ encontrados no sangue periférico das mulheres com CMTN antes e após do tratamento neoadjuvante ( $p < 0,05$ ). (Figura 16F-I)

### **4.5.3 Células TCD8+**

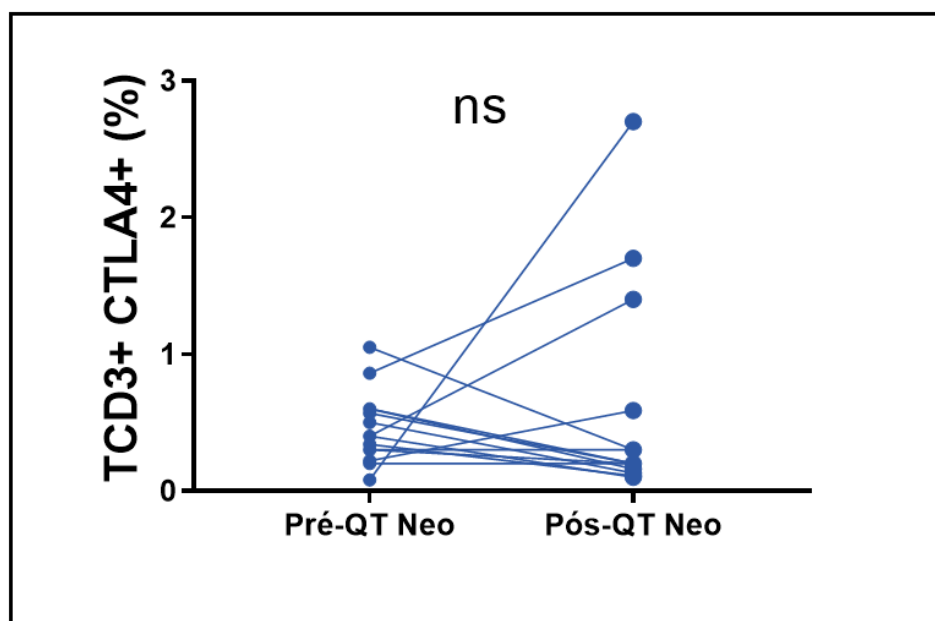
Verificou-se diferença significativa na análise pareada dos níveis percentuais de TCD8+ e TCD8+PD1+ encontrados no sangue periférico das mulheres com CMTN antes e após do tratamento neoadjuvante ( $p < 0,05$ ). Para as demais análises, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 16J-M)



**Figura 16** - Análise pareada dos níveis de linfócitos TCD3, TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD28, FAS e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo antes (Pré-QT Neo, n=30) e após (Pós-QT Neo, n=30) ao tratamento neoadjuvante. Foi realizado o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon*. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . ns: não significativo.

#### 4.6 ANÁLISES PAREADA DOS NÍVEIS PERCENTUAIS DE CÉLULAS TCD3+ CTLA4+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO, ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

Não foi observada diferença significativa na análise pareada dos níveis percentuais de TCD3+CTLA4+ encontrados no sangue periférico das mulheres com CMTN antes (Pré-QT Neo) e após do tratamento neoadjuvante (Pós-QT Neo) (Figura 17).

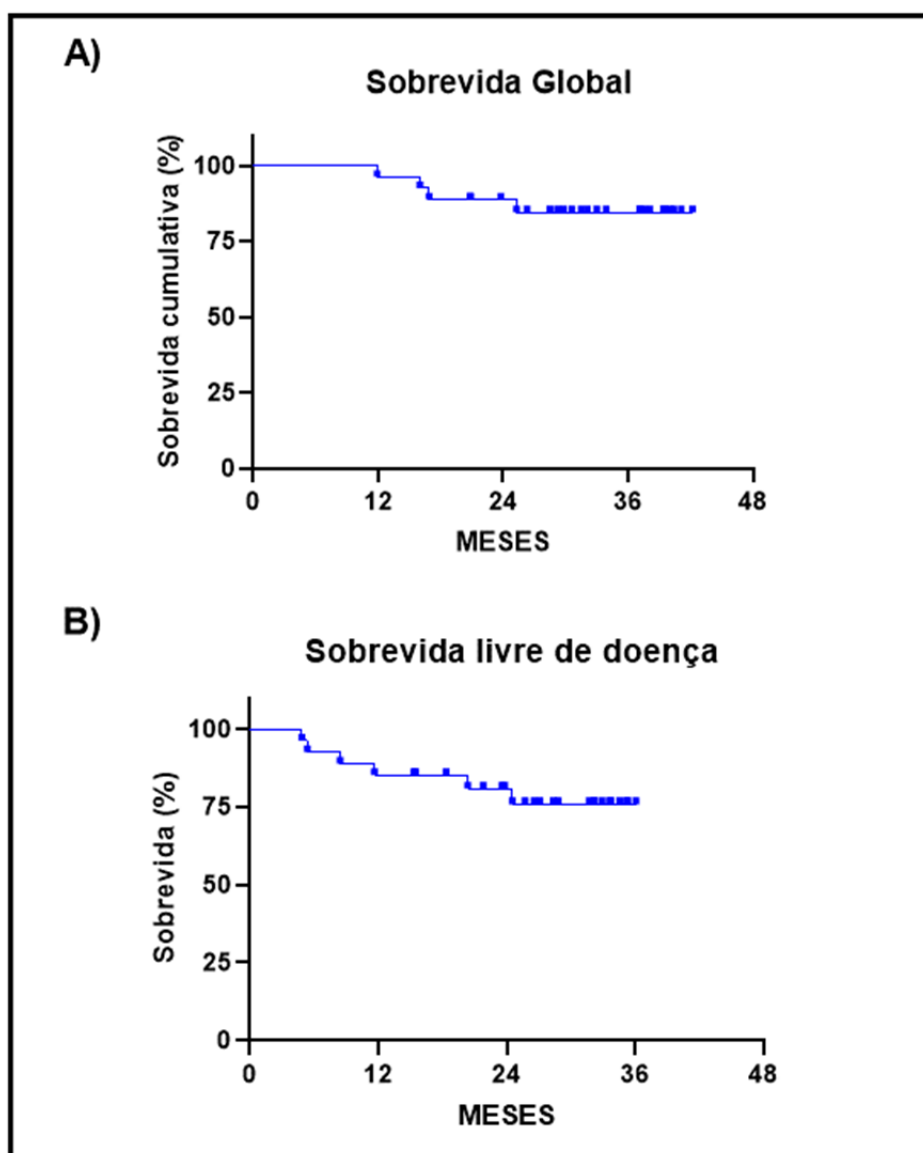


**Figura 17** - Análise pareada dos níveis de linfócitos TCD3+ CTLA4+ no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo antes (Pré-QT Neo, n=30) e após (Pós-QT Neo, n=30) ao tratamento neoadjuvante. Foi realizado o teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon*. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . ns: não significativo.

## 4.7 ANÁLISE DE SOBREVIDA

### 4.7.1 Sobrevida global da população do estudo

A sobrevida global (SG) das pacientes em 24 meses foi 84,6% e a sobrevida livre de doença foi de 80,9% (Figura 18).



**Figura 18** - Sobrevida global (meses) e livre de doença (meses) de mulheres com câncer de mama triplo-negativo (n=27) atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2015-2017.

#### **4.7.2 Curva de sobrevida livre de doença de acordo com o perfil dos níveis de células TCD3+, TCD4+, TCD8+ e dessas populações celulares com expressão de CD28, FAS, CTLA4 e PD1**

Para análises da sobrevida livre de doença foram utilizados os pontos de corte com base nos valores de medianas ( $<$  e  $\geq$  percentil 50) dos níveis percentuais das populações de linfócitos obtidos após tratamento neoadjuvante.

##### **4.7.2.1 Células TCD3+**

A sobrevida livre de doença em 24 meses foi de 52,1% no grupo de pacientes com níveis percentuais de TCD3  $<$  68,0 e de 100% no grupo com TCD3+  $\geq$  68,8 ( $p=0,007$ ), como mostra Figura 19.

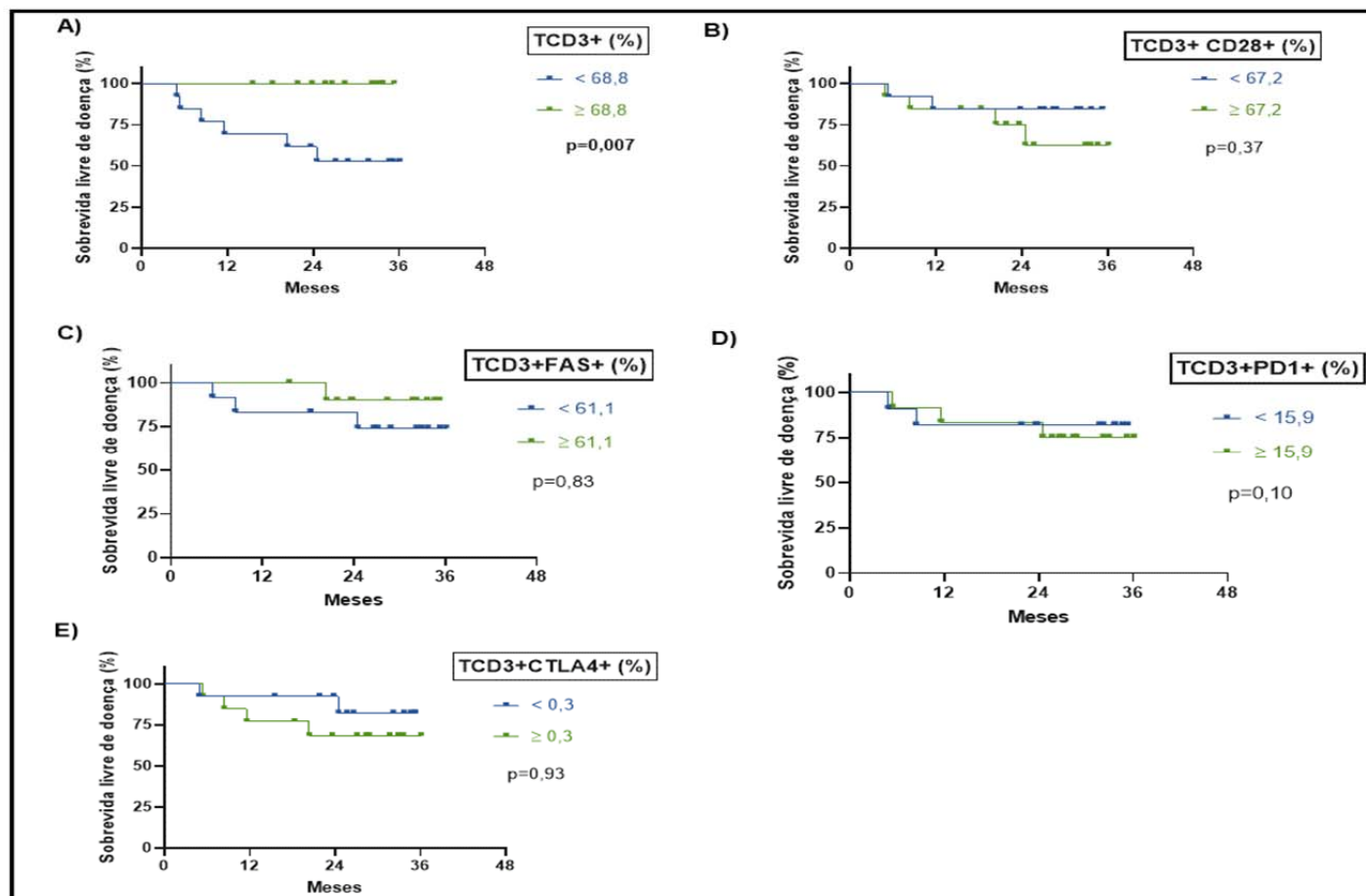
##### **4.7.2.2 Células TCD4+**

Foi observado que a sobrevida livre de doença (24 meses) foi de 54,1% nas pacientes no grupo de pacientes com níveis percentuais de TCD4+ FAS+  $\geq$  44,5 e de 100% no grupo com TCD4+ FAS+  $<$  44,5 ( $p=0,02$ ). Com relação TCD4+ PD1+, a sobrevida livre de doença foi 69,5% no grupo com níveis percentuais de TCD4+ PD1+  $\geq$  4,5 e de 100% no grupo TCD4+ PD1+  $<$  4,5 ( $p=0,01$ ), como mostra Figura 20.

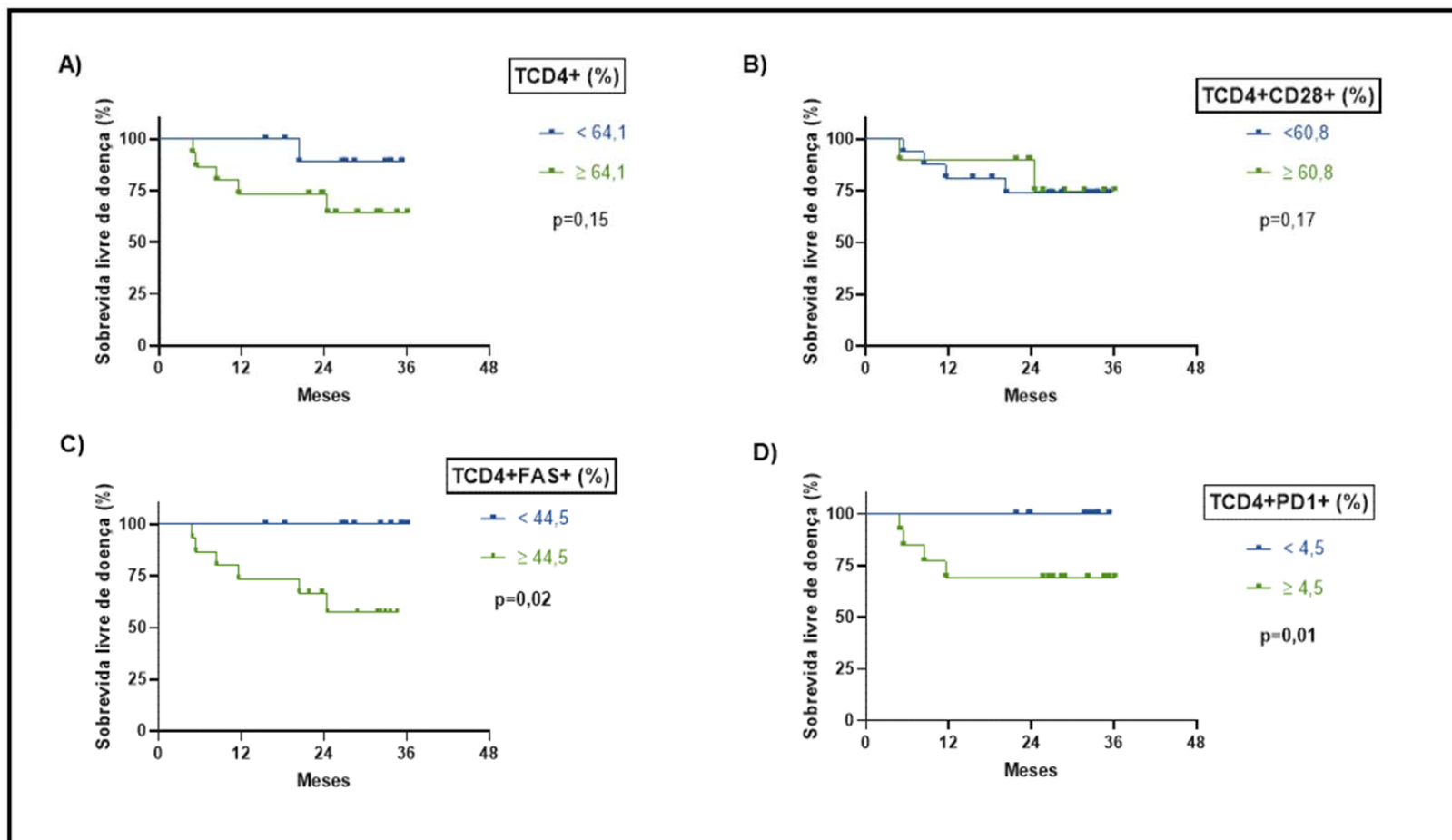
##### **4.7.2.3 Células TCD8+**

Não foram observadas diferenças significativas na sobrevida livre de doença na análise a partir dos valores de mediana dos níveis de células TCD8+ com expressão de CD28, FAS e PD1, como mostra a Figura 21.

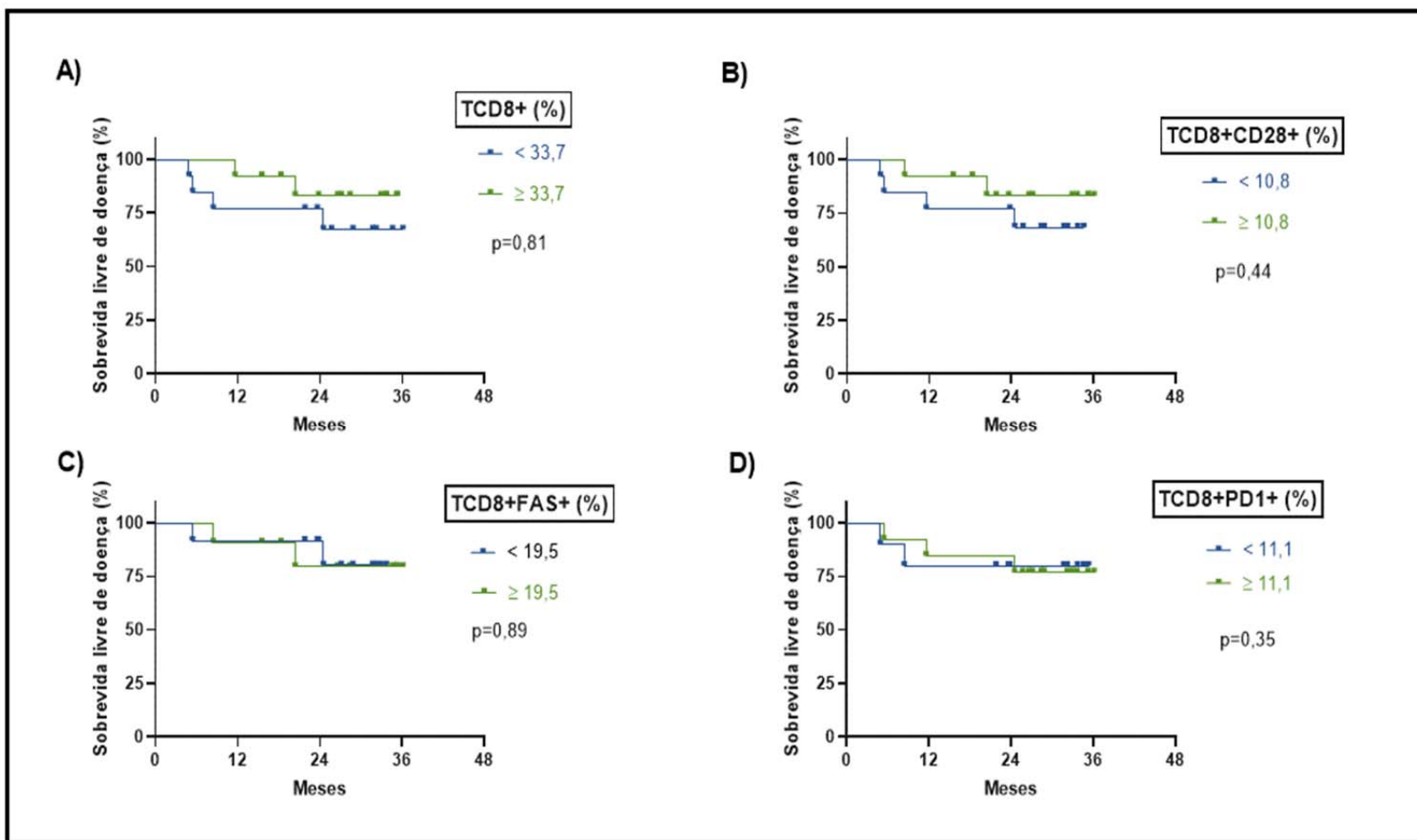




**Figura 19** - Análise da sobrevida livre de doença, utilizando como ponto de corte o valor de mediana (percentil 50) dos níveis percentuais de linfócitos TCD3+ com expressão dos receptores CD28, FAS, CTLA4 e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo após o tratamento neoadjuvante. *Log-rank* test. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .



**Figura 20** - Análise da sobrevida livre de doença, utilizando como ponto de corte o valor de mediana (percentil 50) dos níveis percentuais de linfócitos TCD4+ com expressão dos receptores CD28, FAS e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo após o tratamento neoadjuvante. *Log-rank* test. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .



**Figura 21** - Análise da sobrevida livre de doença, utilizando como ponto de corte o valor de mediana (percentil 50) dos níveis percentuais de linfócitos TCD8+ com expressão dos receptores CD28, FAS e PD1 no sangue periférico das mulheres com câncer de mama triplo-negativo após o tratamento neoadjuvante. *Log-rank* test. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

***DISCUSSÃO***

---

## 5 DISCUSSÃO

O sucesso obtido nas taxas de resposta aos imunoterápicos tem modificado os algoritmos de tratamento de diversas neoplasias agressivas como: melanoma (FRANKLIN et al. 2017); pulmão (REMON et al. 2017) e câncer de mama triplo-negativo (SCHMID et al. 2018). No entanto estas medicações de alto custo estão ativas em alguns pacientes e em outros não, fazendo com que estudos que visem avaliar os mecanismos da resposta imune sejam fundamentais para o surgimento de novas estratégias de tratamento.

Nesse trabalho, foi realizada a análise de alguns mecanismos de ativação e inibição da resposta imune celular em 30 mulheres com CMTN, localmente avançados e submetidas a quimioterapia neoadjuvante. A mediana de idade das pacientes foi de 44 anos, 62% estavam na menopausa e 63% possuíam carcinoma ductais de alto grau, dados compatíveis com a literatura para o subtipo triplo-negativo (DENT et al. 2007). Em relação a resposta patológica foi observada RC em 56,7% das participantes do estudo, o que difere da metanálise realizada por POGGIO e colaboradores (2018), que incluiu 2109 mulheres com CMTN, e encontraram uma taxa de RC de 37%. Após um seguimento de 24 meses, 6 pacientes (20%) desenvolveram recorrência sistêmica, destas 5 recidivaram no SNC e uma paciente no pulmão, corroborando com o estudo de LIN et al. (2009). Esses autores mostraram que principais sítios de recidiva do CMTN foram o pulmão e SNC, e uma baixa frequência de metástases ósseas nestas pacientes.

Foi realizada a análise dos valores percentuais das populações de linfócitos T total (TCD3+), TCD4+ e TCD8+ com expressão dos receptores CD28+, CTLA-4+,

FAS+ e PD1+ no sangue de mulheres com CMTN antes e após tratamento neoadjuvante. As primeiras análises foram realizadas comparando os níveis de dessas populações antes do início do tratamento com intuito de observar o perfil de resposta imune celular anti-tumoral no CMTN. Ao mesmo tempo, verificar se algum dos mecanismos estudados poderia apresentar alterações antes do tratamento e predizer resposta a quimioterapia neoadjuvante. Por isso, foi avaliado os níveis percentuais dessas populações encontrados entre os grupos de pacientes que apresentaram RC, RP, e controles saudáveis. No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TCD3+, TCD4+ e TCD8+ entre os grupos, o que demonstra não haver alterações quantitativas dessas populações na presença do tumor de mama localmente avançado.

Nesse sentido, foram analisados os níveis de TCD3+ com expressão dos receptores CD28+, CTLA4+, FAS+ e PD1+ entre os grupos de pacientes que apresentaram RC e RP, e controles. Verificou-se aumentos dos níveis de TCD3+ com expressão dos receptores CD28+, CTLA4+ e PD1+ nas pacientes com CM com RC e RP quando comparado aos controles. Esses dados mostram que existe um envolvimento desses mecanismos na resposta imune celular no CMTN, e que são mecanismos presentes durante a ativação da resposta imune celular frente a antígenos estranhos. O aumento de linfócitos TCD3+ CD28+ deve estar associado ao aumento dos níveis de TCD4+CD28+, já que não foi observado alterações dos níveis de TCD8+ CD28+. Além disso, noventa a 100% das células TCD4+ *naive* expressam de forma constitutiva a molécula co-estimuladora CD28+, sendo que essas células representam cerca de 70-80% dos linfócitos TCD3+ totais circulantes. As moléculas CD28 estão ainda envolvidas na sobrevivência, produção de IL-2, e expansão clonal

das células TCD4+, durante o início da ativação da resposta imune nos linfonodos (SCHMIDT et al. 1996a e b; WARRINGTON et al. 2003).

Diferente dos resultados deste estudo, GONG et al. (2012), relataram níveis reduzidos de CD28 no sangue periférico de pacientes com câncer mama ductal invasivo quando comparado aos controles saudáveis, porém esses autores não realizaram análises entre os subtipos moleculares de CM. O aumento dos níveis de TCD4+CD28+ no sangue das mulheres com CMTN corrobora com os resultados encontrados nas análises dos índices da relação TCD4+ CD28+/ TCD8+CD28+, onde foi observado aumento desses índices no grupo de pacientes CMTN com RP quando comparado aos grupos de CMTN com RC e controles. Isso mostra uma relação de quatro vezes TCD4+ CD28+ para cada célula TCD8+ CD28+ nas pacientes com RP, enquanto os controles obtiveram uma relação de duas vezes de TCD4+ CD28+ para cada célula TCD8+ CD28+. Isso sugere uma desregulação nas proporções de célula T com expressão de CD28+ e análises desses índices podem ser potenciais biomarcadores preditivos de resposta ao tratamento neoadjuvante no CMTN.

Por sua vez, as pacientes com RC e RP apresentaram níveis elevados de TCD3+CTLA4+ e TCD3+ PD1+ quando comparado aos controles. As vias CTLA-4 e PD-1 aparecem em diferentes estágios da resposta imune. O CTLA-4 é considerado o “líder” dos inibidores de resposta imune, pois interrompe as células T potencialmente autorreativas na fase inicial da ativação de células T, normalmente nos linfonodos. Já as moléculas PD-1 são expressas nas células T efetoras, nas fases mais tardias da resposta imune, principalmente nos tecidos periféricos. No câncer de mama, CTLA-4 tem demonstrado ser um preditivo independente de menor sobrevida livre de doença, mas diferenças na expressão de CTLA-4 em subtipos de câncer de

mama não foram descritos (GOLDRATH e BEVAN 1999; FIFE e BLUESTONE 2008; SHARMA e ALLISON 2015).

Contudo, foi observado os níveis mais elevados de linfócitos TCD4+FAS+ no grupo de pacientes que obtiveram RP a quimioterapia neoadjuvante quando comparado aos grupos de pacientes com RC e controles. Isso mostra que as pacientes com RP a QT Neo já apresentavam mecanismos de inibição da resposta imune antes de iniciar o tratamento. A via FAS/FASL desempenha um papel importante na regulação do sistema imune através do mecanismo de apoptose e anergia celular, promovendo regulação da resposta imune, uma vez que os mecanismos das vias de apoptose FAS- FASL estão diretamente associadas ao escape tumoral. As células tumorais induzem a expressão de FASL que interagem com o seu receptor FAS presentes nos linfócitos T, ativando a cascata de sinalização intracelular que causa a apoptose de células T (RABINOVICH et al. 2007). De fato, a elevação dos níveis séricos de moléculas FAS e FASL foi descrita em mulheres com câncer de mama e relacionada com progressão tumoral (EL-SARHA et al. 2009) e metástase (MALLETER et al. 2013).

Em contrapartida, em relação a PD1, houve um aumento de células TCD8+PD1+ nas pacientes com CMTN quando comparado aos controles, sendo os níveis mais elevados no grupo de pacientes com RP do que no grupo com RC ao tratamento neoadjuvante. As moléculas de PD-1 são expressas em linfócitos T ativados, células mononucleares, células NK e células dendríticas (FRANCISCO et al. 2010). Quando a molécula PD-1 se liga ao seu ligante (PD-L1), ocorre uma inibição da função de células T, sendo esse mecanismo fundamental para regulação da resposta imune (PARRY et al. 2005). Porém, as moléculas PD-L1 são expressas em vários tumores sólidos, incluindo câncer de mama, câncer colorretal, melanoma e



câncer de pulmão (KOGANEMARU et al. 2017; MINGHUI et al. 2017; VILAIN et al. 2017; WANG et al. 2017), sendo comumente expresso no CMTN. Num estudo que incluiu 35 mulheres com CMTN, foi observada elevada expressão de PD-L1. MITTENDORF et al. (2014) encontraram maior expressão de PDL1 no CMTN, do que em outros tipos de câncer. O aumento dos níveis de TCD8+PD1+ no sangue das mulheres com CMTN corrobora com os resultados encontrados nas análises dos índices da relação TCD4+ PD1+/ TCD8+PD1+, no qual foi observado baixos índices no CMTN quando comparado aos controles. Os controles apresentaram uma relação de duas vezes mais de células TCD4+ PD1+ para cada TCD8+PD1+, enquanto as pacientes apresentaram uma proporção de duas vezes mais TCD8+ PD1+ para cada célula TCD4+ PD1+.

Nos últimos anos, o processo inflamatório e a evasão do sistema tumoral foram reconhecidos como marcas da progressão do câncer. No câncer de mama, cada vez mais as evidências científicas mostram que os tumores podem induzir uma desregulação da resposta imune que leva a alterações dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adaptativa no microambiente tumoral, com favorecimento da progressão do tumor. Em particular, o tratamento quimioterápico pode desencadear uma resposta imune, o que contribui para a resposta ao tratamento.

Existem trabalhos na literatura que mostram a influência da quimioterapia neoadjuvante na mudança do perfil da resposta imune celular no infiltrado tumoral no CM (DIECI et al. 2017). Assim como a modulação da resposta imune por meio da ação das medicações anti-neoplásicas no CMTN pode ser preditiva de resposta patológica completa (GARCÍA-MARTÍNEZ et al. 2014; WIMBERLY et al. 2015; RADOSEVIC-ROBIN et al. 2017). Em alguns estudos com câncer de mama, os TILCD8+ indicam um melhor prognóstico enquanto aqueles TIL FOXP3+ indicam

um pior prognóstico (KIM et al. 2013). Nesse sentido, SAVAS et al (2018), relataram que aumento dos níveis de linfócitos TCD8+ de memória no TIL foi associado a melhor sobrevida no câncer de mama triplo-negativo em estágio inicial.

Os linfócitos TCD8+ e NK são as principais células efetoras contra o câncer de mama (MITTENDORF et al. 2012) e a presença infiltrado TCD8+ no TIL está associado com melhores resultados de sobrevida livre de doença e global (MAHMOUD et al. 2011; SAVAS et al. 2018). Sabe-se que os linfócitos TCD8+ atuam de forma dependente de antígenos tumorais e é bem conhecido o aumento da sua eficiência durante a quimioterapia e radioterapia (MEDLER et al. 2015). Porém, a maioria dos estudos avaliam a resposta imune no infiltrado tumoral no CM após quimioterapia neoadjuvante, sendo poucos os trabalhos na literatura que mostraram o perfil de alterações da resposta imune celular no sangue periférico após tratamento antineoplásico.

O câncer de mama triplo-negativo é o subtipo dos tumores de mama que apresenta o comportamento mais agressivo, pior prognóstico (SASAKI e TSUDA 2009) e maior infiltrado de linfócitos (STATON et al. 2016). Considerando que a resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante é relacionada a uma maior sobrevida global nos tumores triplo-negativo (CORTAZAR et al. 2014), a descoberta e validação de preditores de RC representa um marco para a prática clínica.

Em virtude de uma melhor compreensão das diferenças biológicas entre os vários subtipos de câncer de mama e os avanços da imunologia, tem-se dado bastante atenção aos mecanismos do sistema imune envolvidos com o câncer de mama (DOMSCHKE et al. 2016). Particularmente, o TIL foi extensamente estudado no cenário adjuvante e neoadjuvante. O papel do infiltrado de linfócitos como preditor

de RC a quimioterapia neoadjuvante foi confirmado pela meta-análise de 6 estudos alemães, onde foi encontrado que TIL alto (infiltrado de linfócitos > 60% no estroma) foi associado a melhor sobrevida livre de doença (DENKET et al. 2017). Um primeiro relato de ASANO et al. (2018) sugere que a combinação da carga residual de câncer e TIL é um bom biomarcador preditivo para recidiva no câncer de mama após tratamento neoadjuvante e pode ser um indicador mais sensível do que TIL isoladamente.

Neste trabalho, foram realizadas análises pareadas dos níveis de TCD3+, TCD4+ e TCD8+ com expressão de CD28, FAS, CTLA4 e PD1 no sangue de mulheres com CMTN, antes e após quimioterapia neoadjuvante. Verificou-se que a quimioterapia neoadjuvante modula os níveis de TCD4+ e TCD8+ circulantes, como também os níveis de TCD3+ e TCD4+ com expressão dos receptores CD28, FAS e PD1 na membrana celular. Porém, em relação a expressão desses receptores em TCD8+, apenas foram observadas alterações dos níveis de TCD8+ PD1+ após QT Neo. No câncer gástrico, HE et al. (2017) mostraram níveis elevados TCD8+ e diminuídos Tregs após o tratamento quimioterapia, sendo associada à resposta à quimioterapia, com melhora a sobrevida global. Não houve alterações de TCD3+ e TCD4+ após a quimioterapia ou associações com o resultado clínico (HE et al. 2017). A associação de TILs e diferentes subpopulações de linfócitos em pacientes com câncer de mama submetidos a QT neo. DEMARIA et al. (2001) mostraram pela primeira vez que alterações de TILs após tratamento com paclitaxel, e associou com a resposta patológica completa no CM. Vários estudos subsequentemente mostraram que as TILs são importantes biomarcadores preditivos de resposta completa e que o tratamento quimioterápico neoadjuvante pode modular a resposta imune no CM

(ANDRE et al. 2010; DENKERT et al. 2010; YAMAGUCHI et al. 2012; ONO et al. 2012).

Na análise da sobrevida livre de doença (SLD), utilizando os pontos de corte com base nos valores de medianas ( $<$  e  $\geq$  percentil 50) dos níveis percentuais das populações de linfócitos obtidos após tratamento neoadjuvante. Verificou-se neste estudo que a SLD em 24 meses foi de 52,1% no grupo de pacientes com níveis percentuais de TCD3  $<$  68,0 e de 100% no grupo com TCD3+  $\geq$  68,8 ( $p=0,007$ ), como também foi de 54,1% no grupo de pacientes com níveis percentuais de TCD4+ FAS+  $\geq$  44,5 e de 100% no grupo com TCD4+ FAS+  $<$  44,5. Em relação a TCD4+ PD1+, a sobrevida livre de doença foi 69,5% no grupo com níveis percentuais de TCD4+ PD1+  $\geq$  4,5 e de 100% no grupo TCD4+ PD1+  $<$  4,5.

Nossos resultados mostram que um houve um impacto no prognóstico das pacientes devido as alterações da resposta imune celular mediadas por quimioterapia; e isso pode ajudar na identificação das pacientes com CMTN de alto risco após QT neo por meio da análise do perfil celular no sangue. GARCÍA-MARTÍNEZ et al. (2014), também mostraram uma associação da sobrevida livre de doença com o perfil de infiltrado linfocitário tumoral após quimioterápico neoadjuvante no CM e mudança na resposta imune após quimioterapia neoadjuvante pode predizer resposta ao tratamento e prognóstico do câncer de mama.

Avaliar o valor preditivo do TIL é um desafio em virtude dos diferentes métodos de mensuração. A medida do TIL foi relatada como: contagem (MAHMOUD et al. 2012), densidade (SEO et al. 2013) escalas semi-quantitativas (LADOIRE et al. 2011) ou percentagem de infiltrado estromal (LOI et al. 2013). A localização do TIL foi realizada intratumoral ou estroma, que é subdividido em estroma adjacente e distante (HORNYCHOVA et al. 2008). Outra variável é o

número de campos analisados, principalmente considerando a heterogeneidade do TIL. Talvez a questão mais significativa que assola a quantificação do TIL seja a subjetividade e não reprodutibilidade (BROWN et al. 2014). Em 2015 o grupo da *International Immuno-Oncology Biomarker working Group on Breast Cancer*, publicou a padronização das análises do TIL após a quimioterapia neoadjuvante em portadoras de câncer de mama (SALGADO et al. 2015).

Poucos trabalhos avaliaram os níveis percentuais de populações linfocitárias no sangue no CMTN, utilizando técnicas automatizadas quantitativas, o que reduz os vieses nos pontos de corte utilizados nos níveis percentuais das populações de linfócitos no sangue. Além disso, a investigação do perfil linfocitário no sangue periférico apresenta algumas vantagens como ser menos invasiva, fácil acesso e possibilita análises desde o diagnóstico, tratamento e recidiva. Nosso trabalho tem algumas limitações, sendo a principal delas o tamanho limitado da amostra. Esse fato impediu a análise pareada da resposta imune antes e após QT neo, dos grupos com RC e RP separadamente. No entanto, esse estudo amplia o conhecimento sobre a participação das subpopulações de células T circulantes (T total, TCD4+ e TCD8) e a expressão dos receptores de inibição e ativação da resposta imune (FAS, FASL, CTLA4, PD1/PDL1e CD28) no câncer de mama triplo-negativo e sua associação com resposta patológica completa.

## ***CONCLUSÕES***

---

---

## 6 CONCLUSÕES

Com este estudo, conclui-se:

- Existem alterações na resposta imune celular nas pacientes com CMTN e que são detectáveis no sangue periférico das pacientes, isso sugere que é possível avaliar o perfil de resposta celular, sendo a coleta de sangue menos invasiva, de fácil acesso e possibilita análises desde o diagnóstico, tratamento e recidiva
- Alterações dos níveis TCD4+/FAS+ e TCD8+/PD1+ circulantes antes do tratamento estão associadas a resposta patológica completa, o que sugere ser potenciais biomarcadores preditivos de resposta a QT neo no CMTN;
- As maiores alterações no perfil da resposta imune celular após a quimioterapia neoadjuvante no CMTN foram observadas nos níveis de TCD3+ e TCD4+ com expressão de CD28, FAS e PD1, isso mostra que o tratamento pode modular a resposta imune, e que está associada ao prognóstico das pacientes;
- As alterações nos níveis circulantes de TCD3+, TCD4+FAS+ e TCD4+PD1+ após QT neo estão associadas a sobrevida livre de doença nas pacientes com CMTN, o que sugere que essas populações celulares e os receptores de inibição da resposta imune, FAS e PD1, estão envolvidos no prognóstico do CMTN.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albini A, Sporn MB. The tumors microenvironment as a target for chemoprevention. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:139-47.

Andre F, Berrada N, Desmedt C. Implication of tumor microenvironment in the resistance to chemotherapy in breast cancer patients. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:547-51.

Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1997; 94:13862-13867.

Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, et al. Prediction of treatment responses to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer by analysis of immune checkpoint protein expression. **J Transl Med** 2018; 16:87.

Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H. Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. **Blood** 2005; 105:1396-404.

Barreto ASB, Mendes MFM, Thuler LCS. Evaluation of a strategy adopted to expand adherence to breast cancer. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2012; 34:86-91.

Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. **J Clin Oncol** 2006; 24:5373-80.

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. **Nature** 1995; 377:630-2.

Boyle P, Levin B. **World Cancer Report 2008**. Lyon: IARC; 2008.

Brown JR, Wimberly H, Lannin DR, Nixon C, Rimm DL, Bossuyt V. Multiplex quantitative analysis of CD3, CD8 and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2014; 20:5995-6005.

Burkholder B, Huang RY, Burgess R, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochim Biophys Acta** 2014; 1845:182-201.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2329-34.

Carlson GW, Wood WC, Management of axillary lymph node metastasis in breast cancer: making progress. **JAMA** 2011; 305:606-7.

Caughran J, Braun TM, Breslin TM, et al. The effect of 2009 USPSTF breast cancer screening recommendations on breast cancer in Michigan. **Breast J** 2018; 24:730-7.

Cohen JJ, Duke RC. Apoptosis and programmed cell death in immunity. **Ann Rev Immunol** 1992; 10:267-93.

Collet K, Stefansson IM, Eide J, et al. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:1108-12.

Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet** 2014; 384:164-72.

Coussens LM, Pollard JW. Leukocytes in mammary development and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2011; 13:a003285.

de Charette M, Marabelle A, Houot R. Turning tumour cells into antigen presenting cells: The next step to improve cancer immunotherapy? **Eur J Cancer** 2016; 68:134-47.

Debatin K-M, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. **Oncogene** 2004; 23:2950-66.

Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, et al. Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. **Clin Cancer Res** 2001; 7:3025-30.

DeNardo D, Coussens LM. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Res** 2007; 9:212.

Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J Clin Oncol**. 2010; 28:105-13.

Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, et al. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes as predictive and prognostic biomarker in different subtypes of breast cancer treated with neoadjuvant therapy – a meta-analysis of 3771 patients. **Cancer Res** 2017; 77(4 suppl): S1-09. [Presented at the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 6-10, 2016; San Antonio, Texas].

Dent R, Trudeau M, Pritchard KL, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and pattern of recurrence. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4429-34.

Dieci M, Criscitiello C, Goubar A, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. **Ann Oncol** 2014; 25:611-8.

Dieci MV, Frassoldati A, Generali D, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and molecular response after neoadjuvant therapy for HR+/HER2- breast cancer: results from two prospective trials. **Breast Cancer Res Treat** 2017; 163:295-302.

Dillon D, Guidi AJ, Schnitt SJ. Pathology of invasive breast cancer. In: Harris Jr, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, editors. **Diseases of the breast**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health; 2014. p.374-407.

Disis ML. Immune regulation of cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:4531-8.

Dolle JM, Dailing JR, White E, et al. Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:1157-66.

Domschke C, Schneeweiss A, Stefanovic S, et al. Cellular immune responses and immune escape mechanisms in breast cancer: determinants of immunotherapy. **Breast Care (Basel)** 2016; 11:102-7.

Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med** 2002; 8:793-800.

Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nat Med** 1999; 5:1365-9.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. **Annu Rev Immunol** 2004; 22:329-60.

Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. **Immunity** 2002; 16:23-35.

El-Sarha AI, Magour GM, Zaki SM, El-Sammak MY. Serum sFas and tumor tissue fasl negatively correlated with survival in egyptian patients suffering from breast ductal carcinoma. **Pathol Oncol Res** 2009; 15:241-50.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer: the value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1991; 19:403-10.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer** 2019; 144:1941-53.

Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. **Immunol Rev** 2008; 224:166-82.

Fitzmaurice C, Naghavi M, Murray CJL, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability and disability-adjusted life-years for 32 Cancer groups 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. **JAMA Oncol** 2017; 3:524-48.

Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. **Immunol Rev** 2010; 236:219-42.

Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. **Eur J Surg Oncol** 2017; 43:604-11.

French JD, Kotnis GR, Said S, et al. Programmed death-1+ T cells and regulatory T cells are enriched in tumor-involved lymph nodes and associated with aggressive features in papillary thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 2012; 97:E934-43.

Fridman WH, Galon J, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. **Cancer Res** 2011; 71:5601-5.

Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumors: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:298-306.

Friedewald SM, Rafferty EA, Rose SL, et al. Breast cancer screening using tomosynthesis in combination with digital mammography. **JAMA** 2014; 311:2499-507.

Fulford L, Easton D, Reis-Filho J, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. **Histopathology** 2006; 49:22-34.

Fulop T, Larbi A, Kotb R, de Angelis F, Pawelec G. Aging, immunity, and cancer. **Discov Med** 2011; 11:537-50.

García-Martínez E, Gil GL, Chaves Benito A, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2014; 16:1-17.

Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. **Neoplasia** 2006; 8:190-8.

Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple negative breast cancer current status and future directions. **Ann Oncol** 2009; 20:1913-27.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol** 2011; 22:1736-47.

Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. **Nature** 1999; 402:255–62.

Gong J, Pan W, Yang C, Guo F, Sun Y. Expression of co-stimulators CD28/B7-1 in peripheral blood of patients with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 136:621-2.

Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res** 2011; 17:1082-9.

Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. **J Clin Oncol** 2008; 26:814-9.

Gutierrez LS, Elisa M, Niven-Fairchild T, Naftolin F, Mor G. The Fas/Fas-ligand system: a mechanism for immune evasion in human breast carcinomas. **Breast Cancer Res Treat** 1999; 54:245-53.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Haque W, Verma V, Farach A, Brian Butler E, Teh BS. Postmastectomy radiation therapy for triple negative, node-negative breast cancer. **Radiother Oncol** 2019; 132:48-54.

Hasan A, Ghebeh H, Lehe C, Ahmad R, Dermime S. Therapeutic targeting of B7–H1 in breast cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2011; 15:1211-25.

Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. **Science** 1993; 262:905-7.

Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1496-506.

Hayes DF, Trock B, Harris AL. Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? **Breast Cancer Res Treat** 1998; 52:305-9.

He Q, Li G, Ji X, et al. Impact of the immune cell population in peripheral blood on response and survival in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. **Tumour Biol** 2017; 39:1010428317697571.

Hornychova H, Melichar B, Tomsova M, Mergancova J, Urminska H, Ryska A. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. **Cancer Invest** 2008; 26:1024-31.

Hortobagyi GN, Connolly JL, D'Orsi CJ, et al. Breast. In: Amin MB, Gress DM, Vega LRM, et al. editors. **AJCC cancer staging manual**. 8<sup>th</sup> ed. New York: Springer; 2017. p.589-636.

Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER cancer statistics review 1975-2013**. 2016. Available from: <URL: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/)> [2019 fev 12]

Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. **Cancer Res** 2006; 66:1123-31.

Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. **Oncologist** 2011; 16 Suppl 1:1-11.



Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, et al. Prognosis of medullary breast cancer: analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. **Ann Oncol** 2012; 23:2843-51.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:277-88.

Igney FH, Krammer PH. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **J Leukoc Biol** 2002; 71:907-920.

Jiang X, Patterson NM, Ling Y, Xie J, Shapiro DJ. Low concentrations of the soy phytoestrogen genistein induce proteinase inhibitor 9 and block killing of breast cancer cells by immune cells. **Endocrinology** 2008; 149:5366-73.

Jiang X, Shapiro D. The immune system and inflammation in breast cancer. **Mol Cell Endocrinol** 2014; 382: 673-83.

Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. **Immunol Today** 1993; 14:338-9.

Kaneko K, Ishigami S, Kijima Y, Natsugoe S. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. **BMC Cancer** 2011; 11:454.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol** 2008; 26:677-704.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. **Nat Immunol** 2002; 3:999-1005.

Kim ST, Jeong H, Woo OH, et al. Tumor infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer. **Am J Clin Oncol** 2013; 36:224-31.

Koganemaru S, Inoshita N, Miura Y, et al. Prognostic value of programmed death-ligand 1 expression in patients with stage III colorectal cancer. **Cancer Sci** 2017; 108:853-8.

Konjevic G, Spuzic I. Stage dependence of NKcell activity and its modulation by interleukin 2 in patients with breast cancer. **Neoplasma** 1993; 40:81-5.

Kozłowski M, Kowalczyk O, Sulewska A, et al. Serum soluble Fas ligand (sFasL) in patients with primary squamous cell carcinoma of the esophagus. **Folia Histochem Cytobiol** 2007; 45:199-204.

Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. **J Pathol** 2011; 224:389-400.

Latchman Y, Wood C, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cells activation. **Nat Immunol** 2001; 2:261-8.

Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, Simon SD, Finkelstein DM, Goss PE. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol** 2012; 13:e95-e102.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triplenegative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest** 2011; 121:2750-67.

Lehmann BD, Pietersen JA, Tan AR. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and new targets for therapy. **Am Soc Clin Oncol Educ Book** 2015; 35e31-9.

Lenardo M, Chan KM, Hornung F, et al. Mature T lymphocyte apoptosis: immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Annu Rev Immunol** 1999; 17:221-53.

Liedke C, Mazouni C, Hess KR et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:1275-81.

Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathological features and sites of recurrence according to breast cancer subtypes in the National Comprehensive Cancer Network (NCCN). **J Clin Oncol** 2009; 27(15\_suppl): A543. [Presented at the ASCO Annual Meeting 2009; 29 May to 2 June, Orlando-Florida]

Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. Pillars article: T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/ BB-1. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:5031-5.

Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity** 1994; 1:793-801.

Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. **J Clin Oncol** 2013; 31:860-7.

MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. **N Engl J Med** 2003; 348:567-68.

Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumor counterattack. **Immunol Cell Biol** 2002; 80:131-7.

Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, et al. Tumor-infiltrating CD8+lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:1949-55.

Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan ED, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 132:54-53.

Malleter M, Tauzin S, Bessede A, et al. CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. **Cancer Res** 2013; 73:6711-21.

Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, et al. Human breast cancer cells enhance self-tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. **J Clin Invest** 2011; 121:3609-22.

Martin M, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, et al. Molecular predictors of efficacy of adjuvant weekly paclitaxel in early breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 123:149-57.

Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. **Clin Cancer Res** 2013; 19:5533-40.

Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, et al. Adjuvant capecitabine for breast cancer after preoperative chemotherapy. **N Engl J Med** 2017; 376:2147-59.

Medler TR, Cotechini T, Coussens LM. Immune response to cancer therapy: mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance. **Trends Cancer** 2015; 1:66-75.

Millikan R, Newman B, Tse C-K, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2008; 109:123-39.

Minghui Z, Dalong W, Qi S, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression and 18F-FDG PET/CT in surgical pulmonary squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 2017; 8:51630-40.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA: 2018.

Mittendorf EA, Alatrash G, Qiao N, et al. Breast cancer cell uptake of the inflammatory mediator neutrophil elastase triggers an anticancer adaptive immune response. **Cancer Res** 2012; 72:3153-62.

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. **Cancer Immunol Res** 2014; 2:361-70.

Mizutani Y, Hongo F, Sato N, Ogawa O, Yoshida O, Miki T. Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. **Cancer** 2001; 92:287-93.

Morrow M. Physical examination of the breast. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, editors. **Diseases of the breast**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer Health; 2014. chap. 3.

Muenst S, Soysal SD, Gao F, Obermann EC, Oertli D, Gillanders WE. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 139:667-76.

Nagarajan D, McArdle S. Immune Landscape of breast cancers. **Biomedicines** 2018; 6:20.

[NCCN]. National Comprehensive Cancer Network. **NCCN Clinical practice guidelines in oncology: breast cancer**. Version 1.2019-March 14. 2019. Available from: <URL:<https://bit.ly/1UnB3vL>> [2019 fev 20]

[NCI] National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER). **Cancer stat facts: female breast cancer**. Available from: <URL:<https://bit.ly/2iGoIHA>> [2018 dez 11].

Nicholls C, Pinto AR, Li H, Li L, Wang L, Simpson R, Liu JP. Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase (GAPDH) induces cancer cell senescence by interacting with telomerase RNA component. **Proc Natl Acad Sci USA** 2012; 109:13308-13.

Nofech-Mozes S, Trudeau M, Kaln H, et al. Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 118:131-7.

Odorizzi PM, Wherry EJ. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. **J Immunol** 2012; 188:2957-65.

Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2947-53.

Ono M, Tsuda H, Shimizu C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. 2012; 132:793-805.

Park HJ, Kusunadi A, Lee EJ, et al. Tumor infiltrating regulatory T cells delineated by upregulation of PD-1 and inhibitory receptors. **Cell Immunol** 2012; 278:76-83.

Park TS, Thomas SM, Rosenberg LH, et al. The association of extent of axillary surgery and survival in women with N2-N3 invasive breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2018; 25:3019-29.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. **Mol Cell Biol** 2005; 25:9543-53

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Pierobon M, Frankenfeld CL. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review of the literature. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 137:307-14.

Pilewskie M, Morrow M. Axillary nodal management following neoadjuvant chemotherapy: a review. **JAMA Oncol** 2017; 3:549-55.

Poggio F, Bruzzone M, Lambertini M, et al. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Ann Oncol** 2018; 29:1497-508.

Prashant G, Emily M, Amar JS, et al. Predictors of locoregional recurrence after failure to achieve pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **J Natl Compr Canc Netw** 2019; 17:348-56.

Pusztai L, Karn T, Safonov A, et al. New strategies in breast cancer: immunotherapy. **Clin Cancer Res** 2016; 22:2105-10.

Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. **Science** 2011; 332:600-3.

Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. **Annu Rev Immunol** 2007; 25:267-96.

Radosevic-Robin N, Béguinot M, Penault-Llorca F. Evaluation of the immune infiltrate in breast cancer. **Bull Cancer** 2017; 104:52-68.

Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE, Thomson AW. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. **J Immunol** 2006; 176:2808-16.

Rakha E, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer** 2007; 109:25-32.

Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, et al. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4 T cells. **Nature** 1995; 376:181-4.

Ravaoli A, Pasini G, Polselli A, et al. Staging of breast cancer: new recommended standard procedure. **Breast Cancer Res Treat** 2002; 72:53.

Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Breast Cancer** 2011; 378:1812-23.

Remon J, Besse B, Sorrie JC. Successes and failures: what did we learn from recent first-line treatment immunotherapy trials in non-small cell lung cancer? **BMC Med** 2017; 15:55.

Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. **Immunol Rev** 2009; 229:12-26.

Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2012; 109:2796-801.

Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. **Ann Oncol** 2006; 17:597-604.

Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. **Oncotarget** 2015; 6:5449-64.



Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. **Nat Rev Immunol** 2010; 10:490-500.

Salgado R, Denkert C, Demaria S, Loi S, et al. International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. **Ann Oncol** 2015; 26:259-71.

Sasaki Y, Tsuda H. Clinicopathological characteristics of triple-negative breast cancers. **Breast Cancer** 2009; 16:254-9.

Savas P, Virassamy B, Ye C, et al. Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. **Nat Med** 2018; 24:986-93.

Schmid P, Adams S, Molinero S, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2018; 379:2018-121.

Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4<sup>+</sup> CD7<sup>-</sup> CD28<sup>-</sup>T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. **J Clin Invest** 1996a; 97:2027-37.

Schmidt D, Martens PB, Weyand CM, Goronzy JJ. The repertoire of CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells in rheumatoid arthritis. **Mol Med** 1996b; 2:608-18.

Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol** 2010; 23 Suppl 2:S60-4.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth ML. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science** 2011; 331:1565-70.

Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, et al. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. **J Immunol** 2003; 170:3637-44.

Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, et al. Tumour-infiltrating CD8+lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. **Br J Cancer** 2013; 109:2705-13.

Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. **Cell** 2015; 161:205-14.

Shimizu M, Kondo M, Ito Y, Kume H, Suzuki R, Yamaki K. Soluble Fas and Fas ligand provide new information on metastasis and response to chemotherapy in SCLC patients. **Cancer Detect Prev** 2005; 29:175-80.

Siegel RL, Miller KD, Jemal DVM, et al. Cancer Statistics 2018. **CA Cancer J Clin** 2018;68:7-30.

Simon S, Bines J, Barrios C, et al. Clinical Characteristics and outcomes of treatment of Brazilian Women with breast cancer treated at public and private institutions – The AMAZONE III project of Brazilian Breast Cancer Group (GBECAM). **Cancer Res** 2009; 69(24 Suppl): A3082. [Presented at the Thirty-Second Annual CTSC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium, Dec 10-13, 2009; San Antonio, TX].  
Smith TJ. Breast Cancer Surveillance Guidelines. **J Clin Oncol Pract** 2013; 9:65-67.

Spring LM, Fell G, Arfe A, et al. Pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy and impact on breast cancer recurrence and mortality, stratified by breast cancer subtypes and adjuvant chemotherapy usage: Individual patient-level meta-analyses of over 27,000 patients. **SABCS** 2018; GS2-03.

Staton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. **JAMA Oncol** 2016; 2:1354-60.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell**. 1993; 75:1169-1178.

Takemura Y, Fukuo K, Yasuda O, et al. Fas signaling induces Akt activation and upregulation of endothelial nitric oxide synthase expression. **Hypertension** 2004; 43:880-4.

Teh BS, Verma V, Brian Butler, Farach A, Haque W, Postmastectomy radiation therapy for triple negative, node-negative breast cancer. **Radiother Oncol** 2019; 132:48-54.

Thomssen C, Hartung C, Porsch M, Vetter M, et al. Subtyping of triple-negative breast cancer (TNBC): a cohort study. **J Clin Oncol** 2018; 36(15\_suppl): e12563. [Presented at the ASCO Annual Meeting, 2018, June 1 to June 5, Chicago, Illinois]

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:2443-54.

Treitl D, Radkani P, Rizer M, El Hussein S, Paramo JC, Mesko TW. Adenoid cystic carcinoma of the breast 20 years of experience in a single center with review of literature. **Breast Cancer** 2018; 25:28-33.

Tsukerman P, Stern-Ginossar N, Gur C, et al. MiR-10b downregulates the stress-induced cell surface molecule MICB, a critical ligand for cancer cell recognition by natural killer cells. **Cancer Res** 2012; 72:5463-72.

Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res** 2013; 19:6380-8.

Untch M, Harbeck N, Huober J, et al. Primary therapy of patients with early breast cancer: evidence, controversies, consensus: opinions of german specialists to the 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015 (Vienna 2015). **Geburtshilfe Frauenheilkd** 2015; 75:556-65.

Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science** 1998; 280:243-8.

Verma C, Eremin JM, Robins A, et al. Abnormal T regulatory cells (Tregs: FOXP3+, CTLA-4+), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs: monocytic, granulocytic) and polarized T helper cell profiles (Th1, Th2, Th17) in women with large and locally advanced breast cancers undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC) and surgery: failure of abolition of abnormal treg profile with treatment and correlation of Treg levels with pathological response to NAC. **J Transl Med** 2013; 11:16.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol** 2011; 29:235-71.

Vilain RE, Menzies AM, Wilmott JS, et al. Dynamic changes in PDL1 expression and immune infiltrates early during treatment predict response to PD-1 blockade in melanoma. **Clin Cancer Res** 2017; 23:5024-33.

Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. **J Clin Oncol** 2012; 30:1796-804.

Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. **Oncogene** 2008; 27:5932-4.

Walks AG, Winer EP. Breast cancer treatment. **JAMA** 2019; 321:288-300.

Wang J, Zheng L, Lobito A, et al. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. **Cell** 1999; 98:47-58.

Wang Z-Q, Milne K, Derocher H, et al. PD-L1 and intratumoral immune response in breast cancer. **Oncotarget** 2017; 8:51641-51.

Warner E, Hill K, Causer P, et al. Prospective study of breast cancer incidence in women with a BRCA 1 or BRCA2 mutation under surveillance with and without magnetic resonance. **J Clin Oncol** 2011; 29:1644-51.

Warrington KJ, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. CD28 loss in senescent CD4+ T cells: reversal by interleukin-12 stimulation. **Blood** 2003; 101:3543-9.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature** 1992; 356:314-7.

Wei W, Xu B, Wang Y, Wu C, Jiang J. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors. **Medicine (Baltimore)** 2018; 97:e9617.

Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast cancer are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 117:273-80.

Wimberly H, Brown JR, Schalper K, et al. PD-L1 expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Cancer Immunol Res** 2015; 3:326-32.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science** 2008; 322:271-5.

Xu D, Takeshita F, Hino Y, et al. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. **J Cell Biol** 2011; 193:409-24.

Yamada A, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual Role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. **Front Immunol** 2017; 8:403.

Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, Tse GM, Yamaguchi M. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. **Hum Pathol** 2012; 43:1688-94.

Yu H, Yang J, Jiao S, Li Y, Zhang W, Wang J. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in breast cancer: implications for prognosis. **Cancer Immunol Immunother** 2015; 64:853-60.

Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy chemotherapeutic regimens. **Nat Rev Clin Oncol** 2011; 8:151-60.

## ***ANEXOS E APÊNDICES***

---

---

**Anexo 1 – Sistema TNM de classificação de tumores malignos (7<sup>A</sup> EDIÇÃO)  
ASCC/UICC**

**T – TUMOR PRIMÁRIO**

TX – Tumor primário não avaliável

TO – Sem evidência de tumor primário

Tis – Carcinoma in situ:

- Tis (CDIS) Carcinoma ductal in situ;
- Tis (CLIS) Carcinoma lobular in situ;
- Tis (Paget's) Doença de Paget sem carcinoma invasivo.

T1 – Tumor  $\leq 2$  cm na sua maior dimensão:

- T1 mic – microinvasão 0,1 cm;
- T1a – Tumor com mais de 0,1 cm e menos que 0,5 cm na sua maior dimensão;
- T1b – Tumor com mais de 0,5 cm e menos que 1,0 cm na sua maior dimensão;
- T1c – Tumor com mais de 1,0 cm e menos que 2,0 cm na sua maior dimensão.

T2 – Tumor  $> 2,0$  cm e  $\leq 5$ cm na sua maior dimensão

T3 – Tumor  $> 5,0$  cm

T4 – Tumor de qualquer dimensão com extensão à parede torácica ou à pele:

- T4a – Extensão à parede torácica sem atingir o músculo peitoral;
- T4b – Edema ou ulceração da pele ou nódulos satélites confinados à mama

(inclui pele de laranja);

- T4c – T4a + T4b;
- T4 d – Carcinoma inflamatório.

**N – ENVOLVIMENTO GANGLIONAR REGIONAL**

Nx – Gânglios regionais não avaliáveis

N0 – Sem metástase ganglionar regional

N1 – Metástases nos gânglios axilares ipsilaterais



N2 – Metástases nos gânglios axilares ipsilaterais fixos ou nos gânglios da cadeia mamária interna clinicamente invadidos na ausência de gânglios axilares:

- N2a – Gânglios axilares ipsilaterais fixos ou fixos a outras estruturas;
- N2b – Metástases clinicamente aparentes na cadeia mamária interna na ausência de gânglios linfáticos axilares.

N3 – Metástases nos gânglios infraclaviculares ipsilaterais com ou sem gânglios linfáticos axilares, ou metástases clinicamente aparentes na cadeia mamária interna com nódulos axilares; ou metástases supraclaviculares com ou sem gânglios linfáticos axilares ou na mamária interna invadidos:

- N3a – Metástases nos gânglios infraclaviculares ipsilaterais;
- N3b – Metástases nos gânglios da mamária interna ipsilateral e nos gânglios axilares;
- N3c – Metástases nos gânglios supraclaviculares ipsilaterais.

M – METÁSTASE À DISTÂNCIA

MX – Metástase à distância não avaliada

M0 – Sem metástase à distância

M1 – Com metástase à distância

#### **ESTADIAMENTO TUMORAL UICC**

ESTADIO 0	Tis	N0	M0
ESTADIO I	T1	N0	M0
ESTADIO IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
ESTADIO IIB	T2	N0	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
ESTADIO IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
ESTADIO IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
ESTADIO IIIC	QUALQUER T	N3	M0
ESTADIO IV	QUALQUER T	QUALQUER N	M1

## Anexo 2 - Pareceres consubstanciados – CEP HCP E IMIP

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Investigação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nos tumores de mama Her2 e triplo negativo localmente avançado

**Pesquisador:** LEURIDAN CAVALCANTE TORRES

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 39967014.3.0000.5205

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 950.832

**Data da Relatoria:** 09/02/2015

#### Apresentação do Projeto:

O câncer de mama localmente avançado é um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, no Brasil 30% dos casos novos desta neoplasia são diagnosticados neste estágio. O tratamento padrão consiste de quimioterapia neoadjuvante seguido de tratamento cirúrgico, radioterapia adjuvante e tratamento hormonal, esses tratamentos proporcionam sobrevida extremamente variável a depender do estágio, características moleculares do tumor e acesso a tratamento oncológico adequado. Na tentativa de individualização do tratamento oncológico, desde 2001 os tumores são tratados de acordo com seu estágio clínico e classificação molecular. Recentemente vários estudos clínicos têm avaliado o prognóstico e valor preditivo das características do infiltrado linfocitário tumoral em câncer de mama e sua relação com a sobrevida global e sobrevida livre de doença.

#### Objetivo da Pesquisa:

Investigação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular dos tumores de mama Her-2 e triplo negativo

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para os sujeitos são inerentes ao tipo de tratamento e não a pesquisa em questão, embora os benefícios diretos para os sujeitos sejam

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597

**Bairro:** Santo Amaro

**CEP:** 50.040-000

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (813)217--8197

**Fax:** (813)217--8197

**E-mail:** cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC



Continuação do Parecer: 950.832

inexistentes, há preocupação em informá-los acerca destas limitações. Os riscos para a comunidade são mínimos

O potencial benefício advindo das informações geradas na pesquisa pode contribuir para o manejo de casos semelhantes no futuro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nenhum

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos foram entregues

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

nenhuma

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

RECIFE, 11 de Fevereiro de 2015

---

Assinado por:  
ISABEL CRISTINA LEAL  
(Coordenador)

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Investigação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nos tumores de mama Her2 e triplo negativo localmente avançado

**Pesquisador:** LEURIDAN CAVALCANTE TORRES

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 39967014.3.3002.5201

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.027.429

**Data da Relatoria:** 15/04/2015

**Apresentação do Projeto:**

O tratamento considerado padrão para as pacientes com neoplasia mama localmente avançada proporciona sobrevida ruim, a depender do estágio, características moleculares do tumor e acesso ao tratamento oncológico adequado. Durante anos utilizou-se da resposta patológica completa (RPC) como end point para a sobrevida global e livre de doença nas pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante, entretanto Berruti e colaboradores ao analisarem meta-análise de 29 estudos neoadjuvantes concluíram que a RPC não pode ser utilizado como end point da eficácia do tratamento em pacientes não selecionadas de câncer de mama localmente avançado.

O esquema de quimioterapia que será adotado neste trabalho já é utilizado no cenário neoadjuvante de pacientes com neoplasia de mama localmente avançado e a toxicidade esperada é, em sua maior parte, previsível e manejável.

O estudo tem caráter observacional e os procedimentos a serem realizados já são considerados padrão para o tratamento do CM.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar os mecanismos de regulação ou inibição da resposta imune no infiltrado e microambiente do tumor maligno de mama do tipo Triplo-Negativo (grupo 1) e Her2+ (grupo 2).

**Endereço:** Rua dos Coelhos, 300

**Bairro:** Boa Vista

**CEP:** 50.070-550

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2122-4756

**Fax:** (81)2122-4782

**E-mail:** comitedeetica@imp.org.br

Continuação do Parecer: 1.027.429

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Quanto aos benefícios acredita-se a associação destes marcadores estudados aos desfechos clínicos pode auxiliar na determinação de uma ferramenta para selecionar pacientes com maior chance de se beneficiar do tratamento neoadjuvante.

Quanto aos riscos, estes serão associados ao tratamento propriamente dito e não diretamente à pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não comentários.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram devidamente descritos e anexados. Consta em anexo um parecer com aprovação de outro CEP o qual está vinculado à instituição onde as voluntárias serão captadas.

**Recomendações:**

Não recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

RECIFE, 17 de Abril de 2015

---

Assinado por:  
Jose Eulalio Cabral Filho  
(Coordenador)

### Anexo 3 – ECOG Performance Status

#### ECOG PERFORMANCE STATUS

<b>Grade</b>	<b>ECOG</b>
0	Totalmente ativo e capaz de manter todo o desempenho pré-doença sem restrição.
1	Restrito em atividade física extenuante, porém capaz de realizar um trabalho de natureza leve.
2	Ambulatorial e capaz de se cuidar, mas incapaz de realizar qualquer atividade de trabalho. Maior que 50% das horas acordado fora
3	Capaz de se cuidar limitado, confinado a uma cama ou cadeira mais de 50% das horas acordado.
4	Completamente restrito. Não pode exercer qualquer autocuidado. Totalmente confinado a uma cama ou cadeira
5	Morto

**Apêndice 1 - Lista de checagem**

**NOME** \_\_\_\_\_ **REGISTRO:** \_\_\_\_\_

**CRITÉRIOS DE INCLUSÃO** **SIM** √ **NÃO** X

É do sexo feminino		
Tem idade entre 18 e 60 anos		
Tem diagnóstico de CDI		
Tem IHQ confirmando triplo-negativo		
Tem estadiamento TNM de III		
Tem performance status 0-2		

**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:** **SIM** √ **NÃO** X

Usa imunossupressores por mais de 30 dias		
Tem imunodeficiência primária ou secundária (HIV, HTLV)		
Tem sinais clínicos de infecção		
Tem sorologia positiva para hepatite A, B ou C		
Tem doença autoimune (DA) ou parentes com história de DA		
Está gestante ou lactante		
Tem neoplasia prévia, exceto pele não melanoma		

**CONCLUSÃO:** **SIM** √ **NÃO** X

Elegível		
Não elegível		

**SE ELEGÍVEL, CONCORDA EM PARTICIPAR?**

Sim	√	
Não	X	

## Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1. NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: .....

SEXO: M  F  DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO:

.....BAIRRO:.....CIDADE

.....CEP:.....

TELEFONE: DDD (.....) .....

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Investigação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular dos tumores de mama Her2 e triplo-negativo localmente avançado**

2. PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: CARGO/FUNÇÃO:

Dra. Leuridan Cavalcante Torres – Pesquisadora do Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

Dr Marcelo Ramos Tejo Salgado – Oncologista Clínico e Coordenador do setor de oncologia clínica HCPe

3. UNIDADE: Hospital do Cancer de Pernambuco, Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP

4. PESQUISADORES COLABORADORES:

Dra Denise Viana Sobral

Carolina de Souza Vasconcelos

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO <input type="checkbox"/>	RISCO MÍNIMO	RISCO
MÉDIO X	RISCO BAIXO <input type="checkbox"/>	RISCO MAIOR <input type="checkbox"/>

6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

7. Gostaríamos de convidá-la a participar de nossa pesquisa.

8. Justificativa: Existem evidências de que o câncer de mama triplo-negativo ou não possuem um comportamento diferente, por vezes mais agressivo. Conhecidos na atualidade como tumores de mama triplo-negativo, a imunohistoquímica distingue ao menos cinco subtipos, porém com a conduta de tratamento semelhante entre estes. É importante investigar também se existem alterações na defesa do organismo ou no próprio tumor para que possamos ter conhecimentos que ajudarão a conhecer melhor essa doença, possíveis fatores imunológicos e genéticos envolvidos e, com isso, melhorar as formas tratamento que poderão qualidade de vida.

9. O objetivo deste trabalho é estudar se existem diferenças no sistema de defesa (sistema imune) de mulheres com câncer de mama de diferentes tipos entre si e entre mulheres saudáveis e também no material da biópsia. Além disso, estudaremos as suas defesas e marcadores no seu sangue que possibilitem um maior conhecimento de fatores genéticos e imunológicos que estejam relacionados com o câncer de mama e as diferenças com relação a pessoas saudáveis.



10. Os testes laboratoriais serão realizados no sangue onde estudaremos a sua imunidade e marcadores no sangue, ou no material de biópsia.

11. Com relação ao material de biópsia, este será processado para obter o diagnóstico ou a confirmação do mesmo além de realizar outros testes imunohistoquímicos que possibilitem uma melhor classificação do tumor de mama e a avaliação de infiltrado inflamatório, habitualmente tais testes são dispensáveis, pois não alteram a conduta do seu tratamento, mas conhecê-los pode ser de utilidade para o futuro. Serão também realizadas coletas de 20 mL de sangue periférico para realização dos testes laboratoriais que avaliarão a sua imunidade e também possíveis marcadores no sangue relacionados com sua doença, porém que não irão alterar o tipo do seu tratamento.

12. Existe um risco mínimo para o participante de pesquisa. Será colocada pomada anestésica (EMLA) antes da coleta de sangue para evitar a dor da picada da agulha. A coleta poderá provocar uma mancha vermelha ou roxa no local da picada da agulha. Os pais dos pacientes serão orientados de como tratar, caso ocorra mancha vermelha ou roxa no local

13. O sangue colhido será usado para os exames laboratoriais e o material de biópsia será guardado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do câncer de Pernambuco

14. Não existe benefício direto para o participante da pesquisa. No final do estudo, teremos um melhor conhecimento das causas que provocaram as alterações na imunidade nos doentes e de possíveis alterações que possam estar relacionadas com a sua doença.

15. Os pesquisadores envolvidos com este projeto estarão disponíveis para esclarecer as dúvidas que surgirão durante o desenvolvimento do estudo. Os principais investigadores são **Dra. Leuridan Cavalcante Torres e Dr. Marcelo Ramos Tejo Salgado** que é encontrada no Departamento de Oncologia Clínica do Hospital do Câncer de Pernambuco na Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife – PE (Telefone: 81 32178000); Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em Pesquisa do HCP na Avenida Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife – PE (Telefone: 81 32178000). Horário: segunda a sexta, das 8h às 12h e das 14h às 16h.

16. Não serão divulgados os nomes dos pacientes ou doentes.

17. Os pacientes poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.

18. Os pacientes não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os pacientes.

19. Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue, o participante tem direito a tratamento médico no Hospital do Câncer de Pernambuco

### **CONSENTIMENTO**

**Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o objetivo e os testes laboratoriais que serão realizados neste trabalho.**

**Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os testes laboratoriais que serão realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também estou isenta de despesas e que terei a garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.**

**Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, que terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento, bem como retirada deste**

consentimento a qualquer momento. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

Se os meus materiais biológicos guardados Biorrepositório do IMIP/HCP forem utilizados em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, escolho livremente a opção abaixo assinalada:

Autorizo a utilização dos meus materiais biológicos sem necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

Desejo ser contatada para autorizar o uso dos meus materiais biológicos a cada pesquisa e em caso de impossibilidade de contato comigo, indico que a nova autorização seja fornecida pelo senhor (A):

\_\_\_\_\_  
(nome e contato do familiar ou representante legal)

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura do paciente

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável Legal/Testemunha Imparcial

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Data

Recife, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 20\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Dra. Leuridan Cavalcante Torres  
Dr. Marcelo Ramos Tejo Salgado  
(Pesquisadores responsáveis)

Apêndice 3 – Formulário Clínico

Formulário clínico - Projeto Câncer de Mama				Prontuário	
Nome: _____			Data de Nascimento: ____/____/____		
Pai: _____		Mãe: _____			
Endereço: _____			Telefone (____) _____ - _____		
Naturalidade: _____		Profissão: _____		CEP - _____	
Idade da Menarca Anos		Tipo de Ciclo		Patologias mamárias prévias	
		Regular Irregular		Sim Não	
Idade da Menopausa Anos		Quanto tempo		Se sim, Quais: _____	
		1 – 5 anos 6 – 10 anos Mais de 10 anos			
Apresenta histórico familiar de câncer		Tipo de Câncer		Grau de parentesco	
Sim Não					
Dados Clínicos e Patológicos					
Como foi diagnosticado o câncer?			Frequência do autoexame		Localidade
Exame clínica			Por ano		Mama direita
Autoexame da mama					Mama esquerda
Mamografia					
Local da lesão					
QSL	QIL	RRA	JQS	JQL	Cauda axilar
QSM	QIM	Papila	JQM	JQI	
Mamografia				Ultrassom	
Data: ____/____/____			Data: ____/____/____		
BI-RADS	0	1	2	3	4
					5
					6
Biópsia		Incisional	Core	Agulhamento	Excisional
Data: ____/____/____					Mamotomia
Tipo Histológico					

Carcinoma microinvasivo Carcinoma ductal invasivo Carcinoma invasivo do tipo não especial Carcinoma tubular Carcinoma cribiforme Carcinoma mucinoso Carcinoma lobular misto Carcinoma com características medulares (carcinoma medular, medula atípico e SOE com características medulares). Carcinoma lobular invasivo (Do tipo clássico e variante: sólida, alveolar, pleomórfica, túbulo lobular).		Carcinoma com diferenciação apócrina Carcinoma com diferenciação em anel de síntese. Carcinoma micro papilar invasivo Carcinoma metaplásico do tipo não especial Carcinoma com características neuroendócrinas. Carcinoma secretor Carcinoma papilar invasivo Carcinoma adenoide cístico	
<b>Grau Histológico do Carcinoma Invasivo</b> <b>(Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis)</b>			
<b>Diferenciação Tubular</b> 1 2 3 Não avaliado	<b>Índice Mitótico</b> 1 2 3 Não avaliado	<b>Grau Nuclear</b> 1 2 3 Não avaliado	<b>Grau histológico</b> Alto Médio Baixo
Multifocalidade e Multicentricidade Presente Ausente	<b>Invasão Vascular Linfática</b> Presente Ausente Não avaliado	<b>Invasão Vascular Sanguínea</b> Presente Ausente Não avaliado	
<b>Margens Cirúrgicas</b> Livre Exígua Comprometida Não avaliado	<b>Linfonodos axilares</b> Linfadenectomia BLS	Número de Linfonodos examinado  Número de Linfonodos comprometidos	
<b>Imuno-histoquímica</b>			Data:    /    /
<b>Receptor de Progesterona</b> Positivo Negativo Porcentagem:    %	<b>Receptor de Estrógeno</b> Positivo Negativo Porcentagem:    %	<b>HER2</b> +1 +2 +3	<b>FISH</b> Positivo Negativo

Tamanho do Tumor						
pTx	CLIS	pT1a > 0,1 e ≤ 0,5 cm		pT3 > 5 cm		
pT0	Paget	pT1b > 0,5 e ≤ 1 cm		pT4a - Extensão da parede do tórax		
pTis	pT1 ≤ 2 cm	pT1c > 1 e ≤ 2 cm		pT4b – edema, ulcerações ou nódulo satélite		
CDS	pT1 - micro-invasão	pT2 > 2 e ≤ 5 cm		pT4c – a + c		
				pT4d – inflamatório		
Linfonodos Regionais			Metástase a Distância		Estadiamento	
pN0 (i+)	pN1 mi	pN2a	pMx pM0 pM1	IA	IIIA	
pN0 (i-)	pN1a	pN2b		IB	IIIB	
pN0 (mol+)	pN1b	pN3a		IIA	IIIC	
pN0 (mol-)	pN1c	pN3b pN3c		IIB	IV	
Quimioterapia						
<b>Neoadjuvante</b>	Sim	Não	Início: ____ / ____ / ____		Término: ____ / ____ / ____	
Esquema						
AC x 4 + T (dose densa)						
Evolução						
Resposta Patológica Completa: SIM ou NÃO						
Resposta Patológica Parcial: SIM ou NÃO						
Recorrência local: SIM ou NÃO						
Recorrência à Distância: SIM ou NÃO						