

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SOLÚVEIS DE sTIM-3, s4-1BB E DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM MULHERES COM
CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO LOCALMENTE
AVANÇADO SUBMETIDAS A QUIMIOTERAPIA
NEOADJUVANTE**

CARLOS EDUARDO CAIADO ANUNCIAÇÃO

**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

**Orientadora: Dra. Ludmilla Thomé Domingos
Chinen**

Coorientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Torres

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Anunciação, Carlos Eduardo Caiado

Avaliação dos níveis solúveis de s TIM-3, s4-1BB e de citocinas inflamatórias em mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado submetidas a quimioterapia neoadjuvante / Carlos Eduardo Caiado Anunciação - São Paulo; 2020.

87p.

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.

Orientadora: Ludmilla Thomé Domingos Chinen

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. Citocinas inflamatórias/Inflammatory Cytokines

Às vezes, Deus te leva pelo caminho mais longo, não para te punir, mas sim para te preparar.

Autor Desconhecido

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Gláucia Caralcanti Anunciação* e *Carlos Eduardo Canuto Anunciação* que sempre me estimularam a estudar.

À minha esposa, *Patrícia Amorim Caiado Anunciação* pelo apoio e compreensão nessa jornada de quatro anos.

E aos meus filhos, *Luiza (Lulu)* e *Gabriel (Biel)*, os que mais sentiram minha ausência nos fins de semana em que estava estudando ao longo desse período.

AGRADECIMENTOS

Aos **pacientes** envolvidos nesta pesquisa, sem os quais não poderíamos realizar este projeto.

À Dra. **Ludmilla Thomé Domingos Chinen**, minha orientadora e sempre acessível quando precisei de suas orientações.

À Dra. **Leuridan Cavalcante Torres**, minha coorientadora, por ser uma pessoa extremamente dedicada ao que faz, sempre buscando novos conhecimentos e ajudando seus alunos nessa caminhada.

À **Diretoria do Hospital de Câncer de Pernambuco** pelo empenho de conseguir esse convênio com a Fundação Antônio Prudente para formação de novos doutores.

Aos **médicos, amigos e funcionários** do Departamento de Ensino e Pesquisa, da Oncologia Clínica, Mastologia e Patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco.

À **equipe do laboratório de Pesquisa Translacional** do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP).

RESUMO

Anunciação CEC. **Avaliação dos níveis solúveis de sTIM-3, s4-1BB e de citocinas inflamatórias em mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado submetidas a quimioterapia neoadjuvante.** São Paulo; 2020. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Introdução: O câncer de mama triplo negativo (CMTN) corresponde de 10 a 20% dos carcinomas invasivos de mama, é altamente agressivo e na maioria das vezes tem apenas a quimioterapia padrão como tratamento. As citocinas inflamatórias são um grupo heterogêneo de proteínas solúveis produzidas por diferentes tipos de células, que medeiam e regulam o sistema imune. A resposta imune celular é regulada por proteínas acessórias denominadas receptores co-estimuladores e co-inibidores, como 4-1BB e TIM-3, respectivamente. A procura por biomarcadores que possam prever resposta à quimioterapia neoadjuvante (QT neo) ainda é um desafio na medicina.

Objetivo: Avaliar os níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB, e de citocinas inflamatórias no sangue de mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado e associá-los à sobrevida livre de doença e com o tipo de resposta patológica à QT neo.

Métodos: O estudo foi realizado entre os anos de 2015 e 2017 no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Foram incluídas 29 mulheres, entre 18 e 60 anos de idade, com diagnóstico de CMTN localmente avançado e submetidas à QT neo, e um grupo de 30 mulheres saudáveis. Coletas de sangue periférico foram realizadas antes e após a QT neo. A dosagem dos níveis solúveis de s4-1BB e sTIM-3 foi realizada por *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). As dosagens de IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IL-10 foram realizadas pela técnica de Cytometric Bead Array por citometria de fluxo. O nível de significância estatística foi de $p < 0,05$. **Resultados:** Níveis mais elevados de IL-6 e de IL-10 foram observados no grupo de pacientes com tumor T4 com relação ao grupo T2-T3 ($p < 0,05$). Níveis elevados de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α no grupo CMTN com *status* linfonodal N2 versus N0 e N1 ($p < 0,05$). Os

níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram elevados no grupo com resposta patológica parcial (RP) quando comparado aos grupos com resposta patológica completa (RC) e controles ($p < 0,05$). Com relação aos níveis de IL-8, os grupos de pacientes RC e RP apresentaram níveis elevados quando comparados aos controles ($p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa de IL-8 entre os grupos RC e RP. Não foram observadas diferenças significativas em níveis de s4-1BB e sTIM-3 de acordo com o tumor primário e *status* linfonodal. Elevados níveis de s4-1BB foram observados no grupo RC comparado aos grupos RP e de controles ($p < 0,0004$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Da mesma forma, os níveis de sTIM-3 foram mais elevados nas pacientes com RC e RP em relação aos controles ($p < 0,0001$ e $p < 0,0003$, respectivamente). Para análise da sobrevida livre de doença (SLD) em 24 meses de seguimento, utilizamos como ponto de corte o valor da mediana ($<$ ou \geq percentil 50) dos níveis séricos de sTIM-3 e s4-1BB. Não houve diferenças significativas na SLD entre os grupos com níveis de s4-1BB ≥ 122 e < 122 pg/mL. A SLD foi de 93,33% no grupo com níveis de sTIM-3 < 2874 pg/mL e de 60% no grupo com níveis ≥ 2874 pg/mL ($p = 0,03$). **Conclusão:** O s4-1BB foi um bom indicador preditivo de resposta à QT neo, enquanto elevação de sTIM-3 mostrou estar associado ao risco de recidiva loco-regional e metástases à distância. Ambos, TIM-3 e 4-1BB, parecem ser potenciais alvos terapêuticos no CMTN localmente avançado por estarem associadas ao desfecho clínico da doença.

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

SUMMARY

Anunciação CEC. [Evaluation of soluble levels of sTIM-3, s4-1BB and inflammatory cytokines in women with locally advanced triple negative breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy]. São Paulo; 2020. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Introduction: Triple negative breast cancer (TNBC) corresponds to 10 to 20% of invasive breast carcinoma with high aggressiveness and in most cases has only standard chemotherapy as treatment. Inflammatory cytokines are heterogeneous group of soluble proteins produced by different types of cell, that mediate and regulate the immune system. The cellular immune response is regulated by accessory proteins called co-stimulatory and co-inhibitory receptors, such as 4-1BB and TIM-3, respectively. The search for biomarkers that can predict response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) is still a challenge to medicine. **Objective:** To evaluate the soluble levels of sTIM-3 and s4-1BB, and inflammatory cytokines in the blood of women with locally advanced triple negative breast cancer, and to associate them with disease-free survival and the type of pathological response to NAC. **Methods:** The study was carried out between the years 2015 and 2017 at the Hospital de Cancer de Pernanbuco (HCP) and Translational Research Laboratory of the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Twenty-nine women, between 18 and 60 years old, diagnosed with locally advanced TNBC, and submitted to NAC, and 30 healthy women were included. Peripheral blood samples were taken before and after neo QT. The determination of the soluble levels of s4-1BB and sTIM-3 was performed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The measurements of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and IL-10 were performed using the Cytometric Bead Array by flow cytometry. The level of statistical significance was $p < 0.05$. **Results:** There were higher levels of IL-6 and IL-10 in the group of patients with tumor size T4 compared to groups T2-T3 ($p < 0.05$). High levels of IL-6, IL8, IL-10 and TNF- α were found in the TNBC group with lymph node status in N2 in relation to N0 and N1 ($p < 0.05$).

High levels of IL1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α were observed in the group with partial pathological response (PR) when compared to groups with complete pathological response (RC) and controls ($p < 0.05$). With regard to IL-8 levels, the groups of CR and RP patients showed high levels when compared to controls ($p < 0.05$). There was no significant difference in IL-8 between the CR and PR groups. No significant differences were observed in the levels of s4-1BB and sTIM-3 in accordance with primary tumor and lymph node status. High levels of s4-1BB were observed in the RC group compared to the PR and control groups ($p < 0.0004$ and $p < 0.0001$, respectively). As well, the levels of sTIM-3 were higher in patients with CR and PR compared to controls ($p < 0.0001$ and $p < 0.0003$, respectively). In the analyses of disease-free survival (DFS) with 24 months of follow-up, we used as a cut-off point the median value ($<$ or \geq 50th percentile) of the soluble levels of sTIM-3 and s4-1BB. There were no significant differences in DFS at 24 months between groups with levels of s4-1BB ≥ 122 and < 122 pg/mL. The DFS was 93.33% in the group with sTIM-3 levels < 2874 pg/mL and 60% in the group with levels ≥ 2874 pg/mL ($p = 0.03$). **Conclusion:** s4-1BB was a good predictive indicator of response to NAC, while elevation of sTIM-3 levels was shown to be associated with the risk of locoregional recurrence and distant metastases. Both TIM-3 and 4-1BB appear to be potential therapeutic targets in locally advanced TNBC because they were associated with the clinical outcome of the disease.

Keywords: Triple Negative Breast Neoplasms. Neoadjuvant Therapy. Imune system. T Lymphocytes. Inflammatory Cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidente entre mulheres e homens estimados para 2020 no Brasil, exceto pele não melanoma ...	3
Figura 2	Diagrama das principais células imunes encontradas no microambiente do tumor	12
Figura 3	Imunidade antitumoral: mecanismos resposta imune envolvidos na eliminação e progressão do tumor	14
Figura 4	Representação esquemática dos mecanismos de ativação e inibição de células T por meio das interações entre as moléculas de co-estimuladoras e co-inibidoras	19
Figura 5	Representação esquemática das interações dos receptores de co-estimulação e co-inibição expressos nos linfócitos T e os seus respectivos ligantes	21
Figura 6	Representação esquemática das interações entre o ligante de PD1 (PDL-1) com seu receptor PD1 na membrana dos linfócitos T e do CTL4 com o seu ligante CD86 expresso na membrana do Tumor	21
Figura 7	Representação esquemática do bloqueio das vias PD-1 / PD-L1 com indução de expressão de PD-L1 em células tumorais e de TIM-3 em células T efetora	23
Figura 8	Representação esquemática das interações ente as células dendríticas (DCs) e células T mediadas pelos membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) / e a superfamília dos receptores de TNF (TNFRSF)	24

Figura 9	Representação esquemática da liberação na forma solúvel de s4-1BB/sCD137 após a hipóxia das células tumorais.....	25
Figura 10	Fluxograma de inclusão de pacientes e controles	34
Figura 11	Intervenção terapêutica e coleta de amostra biológica.....	35
Figura 12	Técnica de CBA para a detecção de quimiocinas. Fonte: adaptada do catálogo da BD Biociencias.....	37
Figura 13	Análise dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α (pg/mL) nas pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo com o tumor primário.....	46
Figura 14	Análise dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α (pg/mL) nas pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo com <i>status</i> linfonodal	47
Figura 15	Análise dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α (pg/mL) nas pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo como tipo de resposta a QT neo	49
Figura 16	Análise dos níveis séricos de sTIM-3 e s4-1BB (pg/mL) nas pacientes (n=29) com câncer de mama triplo negativo de acordo com a classificação do TNM.....	51
Figura 17	Níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB (pg/mL) no sangue de pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo como tipo de resposta a QT neo	53
Figura 18	Análise da sobrevida livre de doença, como ponto de corte o valor da mediana (< ou \geq percentil 50) dos níveis solúveis de s4-1BB e sTIM-3.....	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Critérios de classificação dos subtipos de câncer de mama de acordo com perfil imunohistoquímico.....	6
Quadro 2	Variáveis clínico-patológicas no câncer de mama e de evolução da doença.....	38
Tabela 1	Descrição das frequências das características clínicas e anatomopatológicas de 29 pacientes com câncer de mama triplo negativo entre os anos de 2015 e 2017.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno
ASCO	Do inglês, <i>American Society of Clinical Oncology</i>
CAP	Do inglês, <i>College of American Pathologists</i>
CM	Câncer de mama
CMTN	Câncer de mama triplo negativo
CTL	Do inglês, <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DC	Do inglês, <i>Dendritic cell</i>
DE	Doença estável
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FISH	Do inglês, <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
HER 2	Do inglês, <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2</i>
HIV	Do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>
HMGB1	Do inglês, <i>High mobility group protein 1</i>
HBXIP	Do inglês, <i>Hepatitis B virus X-interacting protein</i>
HTLV	Do inglês, <i>Human T-lymphotropic virus</i>
IFNγ	Do inglês, <i>Interferon gamma</i>
IL	Interleucina
IMIP	Instituto de Medicina Integral de Pernambuco
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IL12	Interleucina 12
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Do inglês, <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MDSC	Do inglês, <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>

MHC	Do inglês, <i>Major histocompatibility complex</i>
MMP-9	Do inglês, <i>Matrix metalloproteinase 9</i>
NK	Do inglês, <i>Natural Killer Cell</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
QT neo	Quimioterapia neoadjuvante
PCR	Do inglês, <i>Polymerase chain reaction</i>
PD1	Do inglês, <i>Programmed death 1</i>
PDL1	Do inglês, <i>Programmed death-ligand 1</i>
RAGE	Do inglês, <i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
RP	Resposta patológica parcial
RC	Resposta patológica completa
SBR	Do inglês, Scarff-Bloom-Richardson System-Nottingham Modification
SNC	Sistema nervoso central
TADC	Do inglês, <i>Tumor-associated dendritic cells</i>
TAMs	Do inglês, <i>Tumor-associated macrophages</i>
TCD4⁺	Linfócito T CD4 positivo
TCD8⁺	Linfócito T CD8 positivo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF β	Do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i>
TGFβ1	Do inglês, <i>Transforming growth factor beta 1</i>
Th	Do inglês, <i>T helper</i>
TIL	Do inglês, <i>Tumor infiltrating lymphocytes</i>
TLR	Do inglês, <i>Toll-like receptors</i>
TNF	Do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1	Do inglês, <i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TNM	Sistema de classificação de tumores malignos
Tregs	Do inglês, <i>Regulatory T cells</i>
TRH	Terapia de reposição hormonal
VEGF	Do inglês, <i>Vascular endothelial growth factor</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Mama	2
1.1.1	Epidemiologia	2
1.1.2	Características clínicas e fatores de risco	3
1.1.3	Diagnóstico e prognóstico	4
1.1.4	Tratamentos	7
1.2	Descrição dos principais mecanismos antitumorais do sistema imune	10
1.2.1	Mediadores inflamatórios da resposta imune	15
1.2.2	Mecanismos de inibição e ativação da resposta imune	18
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo geral.....	29
3.1	Objetivos Específicos.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Aspectos Éticos	31
4.2	População de Estudo	31
4.3	Local e Período do Estudo	32
4.4	CrITÉRIOS de Elegibilidade.....	32
4.4.1	CrITÉRIOS de Inclusão.....	32
4.4.2	CrITÉRIOS de Exclusão	32
4.5	Procedimentos para seleção das pacientes	33
4.6	Tratamento quimioterápico neoadjuvante	35
4.7	Testes laboratoriais para avaliação imunológica.....	36
4.7.1	Determinação dos níveis de proteínas livres no plasma por <i>cytometric bead array</i> .	36
4.7.2	Quantificação de citocinas pela técnica <i>cytometric bead array</i> (CBA)	37
4.7.3	Quantificação das concentrações séricas de s4-1BB e sTIM-3 por <i>Enzyme Linked Immunonosorbent Assay</i> (ELISA)	37
4.8	Classificação e definição das variáveis clínicas e anatomopatológicas	38
4.9	Análise Estatística	40

4.9.1	Análises de associação	40
4.9.2	Análise de sobrevida livre de doença.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Descrição das características clínicas e anatomopatológicas das mulheres com CMTN	43
5.2	Análises dos níveis séricos das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias de acordo com estadiamento TNM	45
5.3	Análises dos níveis séricos das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias de acordo com o tipo de reposta a quimioterapia neoadjuvante	48
5.4	Análises dos níveis solúveis de s4-1BB e sTIM-3 de acordo com estadiamento TNM.....	50
5.5	Análise dos níveis solúveis de s4-1BB e sTIM-3 entre os grupos de pacientes de acordo com o tipo de reposta a QT neo.....	52
5.6	Curvas de sobrevida livre de doença de acordo com os níveis solúveis de s4-1BB e sTIM-3.....	54
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÕES	69
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

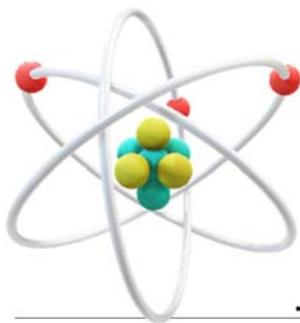
Apêndice 2 Lista de checagem

Apêndice 3 Formulário clínico

ANEXOS

Anexo 1 Sistema TNM de classificação de tumores malignos utilizado no estadiamento das participantes desta tese (AJCC/UICC-8ª edição)

Anexo 2 Cópia do Pareceres Substanciados de aprovação dos comitês de ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco e Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira



INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

1.1.1 Epidemiologia

O Câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna mais comum entre mulheres no mundo, sendo mais frequente em mulheres acima de 50 anos (WALKER et al. 2012). Considerando câncer de mama no sexo feminino e masculino, o câncer de mama representou 11,6% do total de casos de câncer no mundo em 2018 e quando avaliado apenas nas mulheres, correspondeu a 24,2 % de novos casos, sendo a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres, representando 15 % dos casos (BRAY et al. 2018). Nos Estados Unidos da América, segundo os dados do registro nacional de câncer norte americano, foram estimados 279.100 novos casos de câncer de mama para 2020, sendo também o tumor mais frequente entre as mulheres correspondendo a 30% dos casos. Porém, foi a segunda causa de mortalidade, ficando atrás do câncer de pulmão e brônquios que foi a principal causa (SIEGEL et al. 2020).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que em 2020 serão 66.280 novos casos de CM no Brasil (Figura 1), representando uma taxa de incidência de 61,61 casos por 100.000 mulheres (Ministério da Saúde 2019). O CM é o tipo tumoral mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (71,16/100 mil), Sudeste (81,06/100 mil), Centro-Oeste (45,24/100 mil), Nordeste (44,29/100 mil), e apenas na região Norte ficou em segundo lugar (21,34/100 mil), perdendo para o câncer de colo uterino. No estado de Pernambuco, foram estimados 2.390 novos casos em 2020, sendo 47,86



casos/100 mil mulheres e 560 novos casos ou 61,44 por 100 mil mulheres para a cidade do Recife (Ministério da Saúde 2019).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%	Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

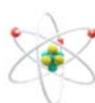
Fonte: Ministério da Saúde (2019)

Figura 1 - Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidente entre mulheres e homens estimados para 2020 no Brasil, exceto pele não melanoma.

1.1.2 Características clínicas e fatores de risco

A suspeita clínica do CM ocorre quando a paciente apresenta uma tumoração palpável endurecida de crescimento rápido e não muito móvel ou quando há lesões nos exames de imagem (mamografia, ultrassonografia ou ressonância nuclear magnética) em que a classificação de BIRADS® é suspeita (*Birads* 4 ou 5). A mamografia é o único exame de imagem que, realizado como *screening*, conseguiu diminuir a mortalidade por câncer de mama em torno de 30% (CASTILLO-GARCÍA et al. 2017).

O Câncer de mama triplo negativo (CMTN) corresponde de 10 a 20 % dos carcinomas de mama invasivo. Algumas características estão mais associadas aos tumores triplo negativos como: descendência afro-americana, nuliparidade, idade mais jovem do diagnóstico, mulheres pré-menopausadas, diagnóstico em estágio mais avançado, obesidade, alto grau nuclear e mutações nos genes BRCA 1 e 2 (20% BRCA 1 mutado) (BOYLE 2012).



Em relação aos fatores de risco para o câncer de mama, sabemos que é uma doença multifatorial. Um maior período de exposição hormonal ao longo da vida estaria relacionado a um maior risco. Então, mulheres com menarca precoce, menopausa tardia, uso de anticoncepcionais, uso de terapia de reposição hormonal na menopausa, idade para primeira gestação após 30 anos teriam maior risco (COLDITZ e BOHLKE 2014). As mais expostas ao risco são também mulheres com mutações genéticas (BRCA 1/2, TP53), faixa etária próxima a 50 anos, irradiação do tórax para tratamento de linfoma, mamas densas, obesidade, história familiar de câncer de mama, sedentarismo e lesões proliferativas da mama com atipias (EVANS e HOWELL 2007).

O CM pode ser causado por mutações somáticas (esporádico) ou hereditárias (germinativas), sendo que apenas 5 a 10% dos casos são hereditários e estão associados principalmente a mutações nos genes BRCA 1 e 2. As mulheres que apresentam mutações germinativas em BRCA1/2 tem um risco de 40 a 85% de desenvolver câncer de mama, e de 5 a 60% de câncer de ovário ao longo da vida (KUCHENBAECKER et al. 2017).

1.1.3 Diagnóstico e Prognóstico

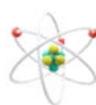
A biópsia de forma ambulatorial e precoce deve ser realizada para confirmação diagnóstica e assim, iniciar-se o tratamento. As biópsias de fragmento com agulha grossa (core-biopsy) ou biópsia à vácuo (mamotomia) são os procedimentos de eleição para o diagnóstico com sensibilidade em torno de 96 % (YOUK et al. 2007). Com material para exame histológico, é possível o diagnóstico com precisão e a realização do exame de imunoistoquímica para classificação tumoral. Segundo a quinta edição da classificação histológica dos tumores epiteliais de mama da OMS, o tipo histológico



mais frequente é o carcinoma invasivo tipo não especial. Dentre os subtipos de carcinomas especiais temos: o carcinoma microinvasivo, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma cribiforme, carcinoma mucinoso, cistoadenocarcinoma mucinoso, carcinoma micropapilar invasivo, carcinoma com diferenciação apócrina, carcinoma metaplásico e tumores raros e associados as glândulas salivares (World Health Organization-WHO 2019).

O diagnóstico no estágio inicial apresenta maior chance de cura. Algumas características do tumor como: acometimento linfonodal, tamanho tumoral, tipo histopatológico, grau histológico, invasão angiolinfática e outras características da biologia tumoral (*status* do receptor hormonal, HER-2 e índice de proliferação) estão relacionadas à agressividade da doença e a mortalidade (STANKOV et al. 2012). O método mais utilizado de estadiamento clínico anatômico é o proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC - 8ª edição), que preconiza a avaliação do tamanho tumoral e sua extensão para pele ou parede torácica (T), o acometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença de metástases à distância (M) (AMIN et al. 2017).

Um dos principais fatores de prognóstico está relacionado ao *status* dos receptores hormonais e expressão do HER-2 (do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*). A classificação molecular baseada na expressão gênica dos tumores de mama proposta por PEROU et al. (2000) em tumores Luminal A, Luminal B, HER-2 ou *basal* foi fundamental para um melhor entendimento do câncer de mama. Nesse estudo, os autores identificaram grupos distintos de tumores e desenvolveram uma nova classificação molecular dos carcinomas mamários através da análise de *microarray*, onde identificou 4 tipos biológicos diferentes de tumores de mama



(PEROU et al. 2000). A classificação baseada na imunoistoquímica é utilizada na prática clínica como fator preditivo e prognóstico e correlaciona-se com a classificação molecular. Na impossibilidade de acesso ao testes genéticos para classificação molecular do câncer de mama pelo alto custo, a classificação por imunoistoquímica é utilizada de forma rotineira, conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios de classificação dos subtipos de câncer de mama de acordo com perfil imunoistoquímico.

Subtipos intrínsecos	Classificação por imunoistoquímica
Luminal A	RE positivo; RP positivo ; HER2 negativo; Ki67 < 20%.
Luminal B	RE e/ou RP positivo; RP < 20% ou Ki67 ≥ 20%; HER2 negativo.
Luminal B HER 2 positivo	RE e/ou RP positivos; HER2 positivo
HER2 hiperexpresso	RE e RP negativos; HER2 positivo; qualquer Ki67
Triplo Negativo	RE e RP < 1%, HER 2 negativo; qualquer Ki67
Basal Like	RE e RP < 1%, HER 2 negativo, CK5/6 e ou EGFR+

Fonte: GOLDHIRSCH et al. (2013)

Abreviações: Positivo (+); RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER-2: *Human epidermal growth factor receptor 2*; Ki 67: marcador de proliferação celular, CK:Citoqueratina, EGFR: *Epidermal growth factor receptor*.

Então, o câncer de mama triplo-negativo é aquele com níveis de expressão por imunoistoquímica: <1% para receptores de estrogênio (RE); < 1% para receptores de progesterona (RP) e HER-2 negativo por imunoistoquímica ou preferencialmente por *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) (GOLDHIRSCH et al. 2013).

O CMTN apresenta-se como o subtipo mais frequente dos tumores de “intervalo”, baixa correlação entre tamanho tumoral versus *status* axilar, risco de

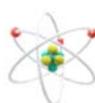


recorrência precoce (com maior pico entre 1 a 3 anos), a recorrência a distância geralmente não acompanha recorrência local, maior risco de morte nos primeiros 5 anos, rápida progressão para óbito quando há recorrência a distância, apresentam alta taxa de proliferação celular e prognóstico desfavorável (DENT et al. 2007; REDDY et al. 2018).

1.1.4 Tratamentos

As neoplasias de mama são usualmente subdivididas por tumor em estágio inicial, denominado estágio I e IIA, localmente avançado (IIB, IIIA, IIIB e IIIC) e metastático (estágio IV), conforme postulado pela AJCC (8ª edição). A definição do estágio da doença tem usualmente uma aplicação terapêutica, pois tumores iniciais, geralmente de melhor prognóstico, são abordados inicialmente com cirurgia e em seguida por tratamentos sistêmicos complementares de acordo com suas indicações (AMIN et al. 2017).

Pacientes com tumor de mama localmente avançado, iniciam o tratamento com terapia neoadjuvante, ou seja, tratamento sistêmico com quimioterápicos, bloqueadores hormonais ou terapias alvo antes da cirurgia definitiva. A terapia neoadjuvante tem como benefício: cirurgias menos mutilantes, transformação de tumores inoperáveis em operáveis, marcador individual do tumor e do seu comportamento biológico *in vivo*, monitoramento da resposta do tumor à droga utilizada e avaliação de terapia sistêmica adjuvante (CHO JH et al. 2013). Após a terapia neoadjuvante, as pacientes são encaminhadas para cirurgia (seja para realizar mastectomia ou cirurgia conservadora), radioterapia e terapia sistêmica adjuvante conforme os protocolos de tratamento.



Nos tumores de mama iniciais (estádios I e IIa), a cirurgia é realizada como abordagem inicial, seguida da radioterapia quando houve indicação e após o tratamento sistêmico adjuvante (quimioterapia, hormonioterapia, terapia alvo) de acordo com os protocolos de tratamento. Nesses casos, a quimioterapia adjuvante pode ser oferecida baseada nas características do tumor primário, tais como: tamanho do tumor, grau histológico, número de linfonodos comprometidos, positividade ou não para os receptores de estrógeno, progesterona e expressão do HER-2 (STANKOV et al. 2012). Os tumores triplo negativos e HER-2, mesmo em estádios iniciais, também tem iniciado seu tratamento com terapia sistêmica neoadjuvante.

A despeito de múltiplos protocolos de quimioterapia neoadjuvante (QT neo) disponíveis, há maior consenso quanto ao uso de antracíclicos e taxanes (RASTOGI et al. 2008). Além do uso dessas drogas, faz-se terapia alvo para o subtipo HER-2, utilizando anticorpos anti-HER-2. A QT neo padrão utilizada no CMTN também é baseada no uso de antracíclicos e taxanes (CHAUDHARY et al. 2018). A adição de platina na QT neo nas pacientes com CMTN tem sido incorporada na prática clínica, principalmente nas pacientes com tumores localmente avançado (CHANG et al. 2010). Novas terapias alvo têm surgido recentemente no cenário do tratamento do CMTN como o inibidor de PD-L1 (atezolizumabe), essa droga tem sido utilizada na neoadjuvância, adjuvância e nas pacientes metastáticas com bons resultados (SCHMID et al. 2018).

A resposta a QT neoadjuvante é avaliada no exame anatomopatológico da peça cirurgia. Então, a paciente pode apresentar resposta patológica completa (RC), quando há ausência de tumor invasivo no histopatológico da mama e dos linfonodos regionais. As pacientes também podem responder de forma parcial (RP) quando ainda há tumor

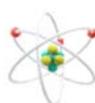


residual invasivo na mama e/ou axila no histopatológico ou podem ter ausência de resposta a QT neo quando não há evidência de alterações na celularidade do T ou do N no exame anatomopatológico ou quando há um aumento no T ou no N em relação ao estadiamento inicial (AMIN et al. 2017).

A resposta patológica completa está associada a melhor sobrevida livre de doença e sobrevida global (UNTCH e VON MINCKWITZ 2011) e difere de acordo com o subtipo do câncer de mama (MIEOG et al. 2007; ESSERMAN et al. 2012; CORTAZAR et al. 2014). A taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante é alta, em torno de 60 a 90%, apesar da RC ocorrer em apenas 20% dos casos. O uso da platina, tem aumentado as taxas de RC, porém com maior toxicidade hematológica, sendo uma opção para ser utilizada nos pacientes com CMTN na QT neo (POGGIO et al. 2018).

O desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento para do câncer de mama e para a doença metastática continua a ser uma das principais metas. O avanço nessa área pode proporcionar uma maior sobrevida nas pacientes metastáticas como também, uma melhor qualidade de vida. O rápido desenvolvimento do conhecimento em biologia molecular no câncer muda continuamente os desafios para a investigação terapêutica. As terapias eram apenas baseadas na histologia do tumor e nos últimos anos com o avanço nos estudos do genoma do câncer, surgiram novos alvos terapêuticos, e com isso a possibilidade de terapias mais efetivas (SCHREIBER et al. 2011).

Na última década, avanços significativos na genômica e proteômica permitiram ampliar o conhecimento das características biológicas das células tumorais e de biomarcadores moleculares envolvidos em múltiplas vias de sinalização. Isso resultou numa maior aplicabilidade na prática clínica, pois permitiu determinar mais



diagnósticos, detecção precoce de recidivas, identificação de novos alvos terapêuticos, previsão de resposta a tratamento e monitoramento. Nesse sentido, as evidências crescentes indicam que o microambiente do tumor não é meramente apenas o resultado da tumorigênese, mas consequência da resposta inflamatória resultante da presença de numerosas células que participam dos eventos associados a imunidade inata e adaptativa. (BOBRIE et al. 2012).

1.2 DESCRIÇÃO DOS PRINCIPAIS MECANISMOS ANTITUMORAIS DO SISTEMA IMUNE

O sistema imunológico possui complexos mecanismos de resposta antitumoral, e apresenta diversas funções nas neoplasias. As células imunológicas podem atuar tanto como supressoras dos tumores como podem estar envolvidas na progressão do tumor. Assim como, essas células também podem promover a proliferação, infiltração e metástase tumoral (GOLDSZMID et al. 2014).

As células da imunidade podem participar dos mecanismos antitumorais ou pró-tumorais em diferentes tipos de tumores, e variam de acordo com a origem do tumor, localização e características individuais do paciente. As células imunes inatas como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), células supressoras derivadas de linhagem mielóide (MDSCs, do inglês *myeloid-derived suppressor cells*) e células natural killer (NK) e da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) estão presentes e interagem com o tumor via contato direto ou através de sinalização de quimiocinas e citocinas que moldam o comportamento do tumor e sua resposta à terapia (Figura 2) (GOLDSZMID et al. 2014; DARCY et al. 2014).



Uma melhor compreensão do microambiente imune no câncer permitiu a identificação de novos biomarcadores imunológicos e o desenvolvimento de terapias alvo que visam regular as vias do sistema imune. O reconhecimento de antígenos tumorais por células da imunidade inata inicia uma cascata inflamatória que leva apresentação de antígenos para os linfócitos T por DCs ativando a resposta imune adaptativa (GOLDSZMID et al. 2014).

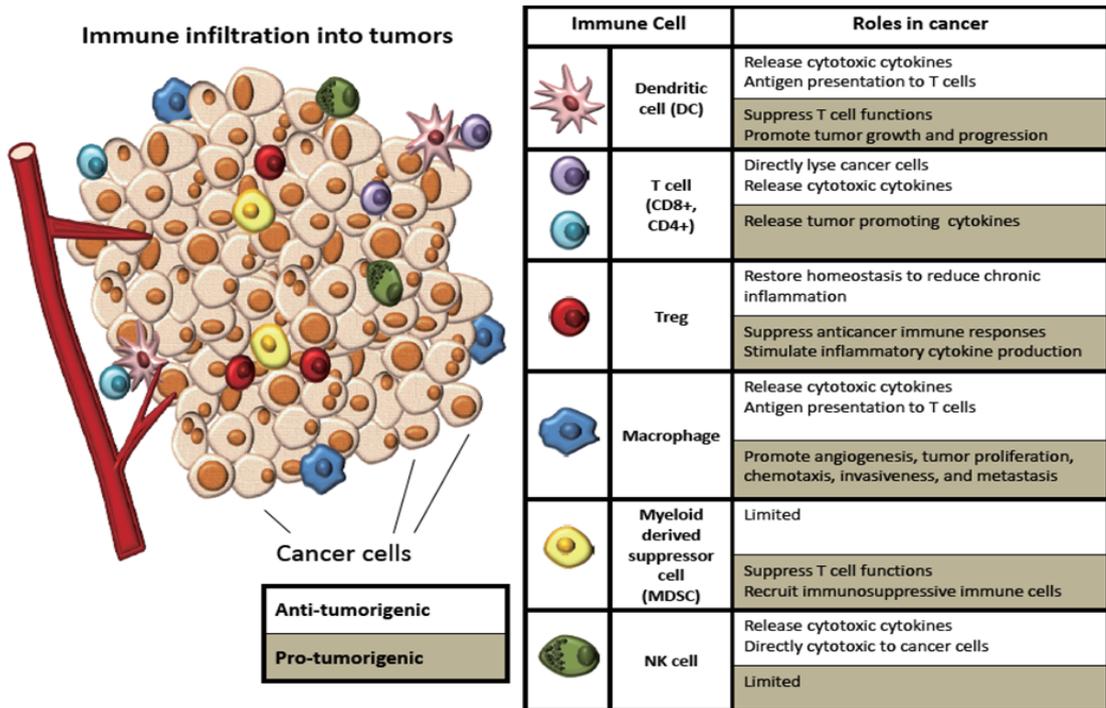
Um dos principais tipos de células envolvidas na imunovigilância são as células NK que podem causar citotoxicidade direta das células tumorais e freqüentemente não expressam alelos do MHC (Do inglês, *major histocompatibility complex*) classe I, tornando-as suscetíveis à morte por meio da liberação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzima B. Outras células imunes também estão envolvidas na morte de células tumorais, mas têm papéis mais complexos, elas mesmo também foram descritas em promover o crescimento tumoral (ZAMAI et al. 2007; HALAMA et al. 2011; HANAHAN e COUSSENS 2012).

Outras células participam da resposta imune contra o tumor, como T CD8⁺ que pode lisar diretamente células tumorais e produz citocinas como interferon gama (IFN- γ), que promove a resposta citotóxica. Também as TCD4⁺ efectoras, denominadas de T *helper* 1 (Th1) produzem citocinas como o IFN- γ que podem estimular a diferenciação de linfócitos T citotóxicos (PARDOLL 2002; SUN et al. 2002; ANKATHATTI MUNEGOWDA et al. 2011).

As células Th17 ativam também linfócitos T citotóxicos, como também promovem a diferenciação de células T reguladoras (Treg) que podem suprimir a resposta inflamatória por meio da liberação de interleucina (IL) -10 (GERRARD et al. 1981; ERDMAN et al. 2005; MITTENDORF et al. 2012). Os macrófagos também



podem participar da resposta imune antitumoral ao apresentar antígenos tumorais para células T de memória (GRIVENNIKOV et al. 2010; QIAN e POLLARD 2010; GALLOIS e BHARDWAJ 2013).



Fonte: MARKMAN e SHIAO (2015)

Figura 2 - Diagrama das principais células imunes encontradas no microambiente do tumor. Diferentes células imunes podem ser encontradas no microambiente tumoral em diferentes momentos e locais, dependendo de vários fatores do hospedeiro e do tumor. Muitas células imunes possuem funções anti e pró-tumoral.

A resposta imune antitumoral é mediada pelos componentes da imunidade adaptativa, células TCD4+ e TCD8+, que são linfócitos T ativados durante o reconhecimento de antígenos tumorais. A fase de eliminação do tumor se configura com a presença dos componentes celulares da imunidade inata como neutrófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas e Natural Killer (NK) que tentam eliminar as células tumorais, ao mesmo tempo que ativam a resposta imune adaptativa por meio



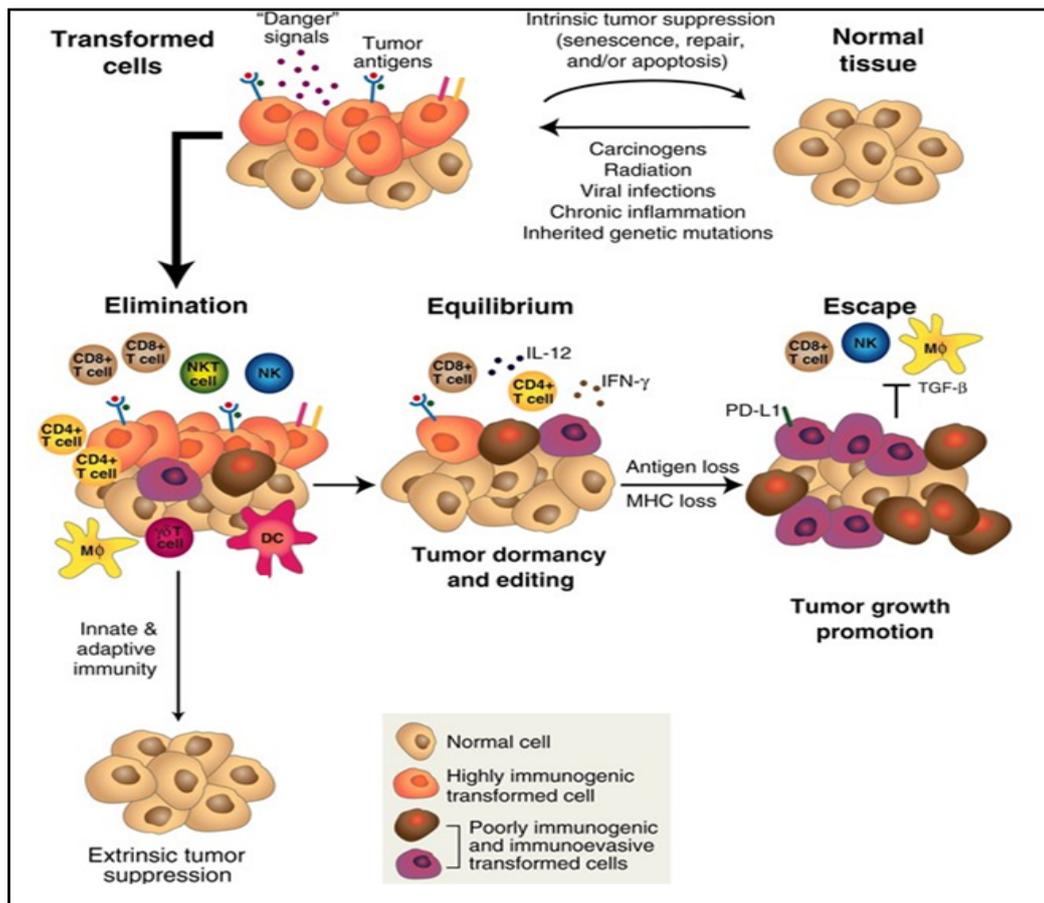
do reconhecimento pelos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de antígenos tumorais apresentados por moléculas MHC na superfície das células dendríticas (MEDZHITOV e JANEWAY 2000). Isso tudo ocorre no estágio bem inicial do aparecimento de células tumorais, não havendo formação estrutural do tumor, não sendo clinicamente detectável. Nessa fase, geralmente o sistema imune consegue eliminar essas células “estranhas” (tumorais) (SCHREIBER et al. 2011).

Se, no entanto, uma variante rara das células tumorais escapar da fase de eliminação, pode progredir para a fase de equilíbrio, na qual seu crescimento é impedido por mecanismos da resposta imune, porém sem efetiva eliminação das células tumorais. Essa fase é mediada pela ativação de clones de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ efetores/memória que produzem mediadores inflamatórios como IL-12 e IFN γ , citocinas importantes para ativação desses clones de linfócitos T que migram para os tecidos, impedindo a expansão do número de células tumorais. A fase de equilíbrio pode se manter por anos e ser a fase final do processo, restringindo o crescimento de tumores ocultos durante toda vida do indivíduo (SCHREIBER et al. 2011), como mostra a Figura 3.

No entanto, a ativação contínua da resposta imune adaptativa com o propósito de regular o crescimento tumoral pode levar ao escape de células tumorais que sofrem mudanças na estrutura do DNA e se adaptam ao microambiente formado pelas células do sistema imune. Os clones de células tumorais com pequenas recombinações do DNA produzem outros tipos de proteínas que não são mais reconhecidas pelos linfócitos T efetores. Esses clones tornam-se resistentes aos mecanismos da resposta imune, ou escapam da resposta imune por induzir um microambiente com mecanismos de imunossupressão do sistema imune, como a liberação de TGF β 1 (do inglês,



transforming growth factor beta 1) e/ou expressão de receptores de inibição da resposta imune como o PD-L1 (do inglês, *Programmed death-ligand 1*), e temos a chamada na fase de escape e de progressão tumoral (SCHREIBER et al. 2011).



Fonte: SCHREIBER et al. (2011)

Figura 3 - Imunidade antitumoral: mecanismos resposta imune envolvidos na eliminação e progressão do tumor. IL-12: interleucina (IL) 12; IFN- γ : interferon *gamma*; TGF β 1: *transforming growth factor beta 1*; PD-L1: *Programmed death-ligand 1*. Natural Killer (NK).



1.2.1 Mediadores inflamatórios da resposta imune

Os mediadores inflamatórios da resposta imune, também conhecidos como citocinas inflamatórias, são um grupo heterogêneo de proteínas solúveis produzidas por diferentes tipos celulares, medeiam e regulam todos os aspectos da imunidade inata e adaptativa (DRANOFF 2004). As citocinas podem atuar em diversos tipos de células e exercer múltiplos efeitos biológicos (ZAMARRON e CHEN 2011). Uma citocina pode estimular (efeitos sinérgicos) ou inibir (efeitos antagônicos) a produção de outras. As células T ativadas secretam citocinas durante o reconhecimento antigênico, constituindo a denominada sinapse imunológica (FRANCISZKIEWICZ et al. 2012).

No microambiente tumoral, as citocinas modulam a resposta antitumoral, e durante o processo inflamatório crônico, essas proteínas solúveis e seus respectivos receptores têm sido descritos como indutores de transformação maligna, a depender do sincronismo entre as citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, das suas concentrações, da expressão dos seus receptores, e também do *status* de ativação das células no microambiente tumoral (LANDSKRON et al. 2014).

As células da imunidade inata responsáveis por produzir grande quantidade de citocinas são as células dendríticas e os macrófagos. Essas células processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC, estimulando, assim, a resposta mediada por linfócitos T efetores, sendo denominadas de células apresentadoras de antígenos (FRIDMAN et al. 2012).

Os macrófagos são fagócitos que podem ser ativados pelos microorganismos e por substâncias produzidas a partir da injúria tecidual, desempenhando um papel fundamental na homeostase e reparo dos tecidos (LEVIN et al. 2015). Quando essas células são expostas a estímulos, secretam citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e



fator de necrose tumoral (TNF). Embora monócitos e macrófagos sejam as principais fontes dessas citocinas, elas também são produzidas por linfócitos ativados, células endoteliais e fibroblastos. Como essas células estão envolvidas no processo inflamatório associado ao câncer, elas estão presentes em todas as etapas da progressão da neoplasia, desde a transformação em células neoplásicas até a progressão tumoral (NOY e POLLARD 2014; KITAMURA et al. 2015).

A IL-1 β é abundantemente encontrada no tecido tumoral e estimula a carcinogênese e o crescimento tumoral, sendo relacionada à progressão tumoral mediada por processo inflamatório (APTE et al. 2006). A estimulação da IL-1 β ativa várias vias de sinalização como a MAPK e NF κ B, ativando a produção de metaloproteinase de matriz (MMP)-9 que é uma proteína reguladora da invasão tumoral (REN et al. 2015). Estudo publicado 2016 em câncer de mama, demonstrou correlação entre a expressão da IL-1 β com a progressão da doença e metástases ósseas indicando um pior prognóstico (HOLEN et al. 2016).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica derivada das células T, tem um papel importante na resposta imune em especial na fase aguda, regula a proliferação celular, apoptose e o crescimento celular. Apresenta também papel regulador na secreção e proliferação de metaloproteinases de matriz em carcinoma de ovário (RABINOVICH et al. 2007). Foi demonstrado também um papel importante da IL-6 na angiogênese tumoral, junto com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outros marcadores de inflamação (ANGELO e KURZROCK 2007).

A IL-8 é uma citocina envolvida no processo inflamatório e imunológico com propriedades angionênicas e tumoregênicas (WAUGH e WILSON 2008). Essa citocina induz a migração de células mielóides supressoras para o microambiente

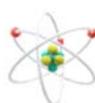


tumoral, sendo um dos principais componentes celulares que promovem o crescimento e metástase tumoral por meio de interações com as células do sistema imune e/ou de liberação de citocinas imunossupressoras. Essas células surgiram como principais reguladores das respostas imunes e principais alvos para o tratamento do câncer (PALENA et al. 2012).

O aumento de infiltrado de MDSCs foi descrita em pacientes com câncer de mama, podendo ser importante marcador prognóstico (FRANCISZKIEWICZ et al. 2012). Estudo publicado em 2017 mostrou que o bloqueio da IL-8 em pacientes com câncer de mama triplo negativo diminui o recrutamento de MDSCs para o ambiente tumoral, reverte a supressão da resposta imune, sendo um potencial alvo de tratamento (DOMINGUEZ et al. 2017).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs, do inglês *tumor-associated macrophages*) apresentam fenótipos pró-inflamatórios (tipo M1) ou anti-inflamatórios (tipo M2) (MANTOVANI et al. 2002). Os macrófagos que se diferenciam em M1 desempenham um papel relevante na eliminação de células tumorais. À medida que o tumor progride, os mediadores inflamatórios produzidos no microambiente tumoral no processo de exaustão da resposta imune celular induz a diferenciação em células M2, também conhecida como pró-tumoral (MANTOVANI et al. 2017).

Os TAMs promovem a progressão tumoral de diferentes maneiras, como o aumento da angiogênese e linfangiogênese, promovendo metástases por produzir mediadores de imunossupressão da resposta imune (DENARDO et al. 2011; QIAN et al. 2015; MANTOVANI et al. 2017). Um dos principais mediadores que causam imunossupressão é a IL-10 (NG et al. 2013) e TGF- β (MCINTIRE et al. 2004) que induz a imunossupressão da resposta imune antitumoral.



A IL-10 produzida por macrófagos M2 pode inibir a produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α (GLIMCHER e MURPHY 2000). Apesar da produção de IL-10 pelos macrófagos M2 estar relacionada a progressão tumoral, essa citocina possui funções controversas, como a ativação de apoptose e inibição do crescimento tumoral, assim como promoção da invasão e agressividade tumoral (MOCELLIN et al. 2004). A IL-10 também pode limitar a extensão do processo inflamatório, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias das células T e macrófagos, suprimindo a resposta imune antitumoral (LI et al. 2017). BHATTACHARJEE et al. em 2016 mostraram que níveis elevados de IL-10 em pacientes com câncer de mama estariam associados a um pior prognóstico.

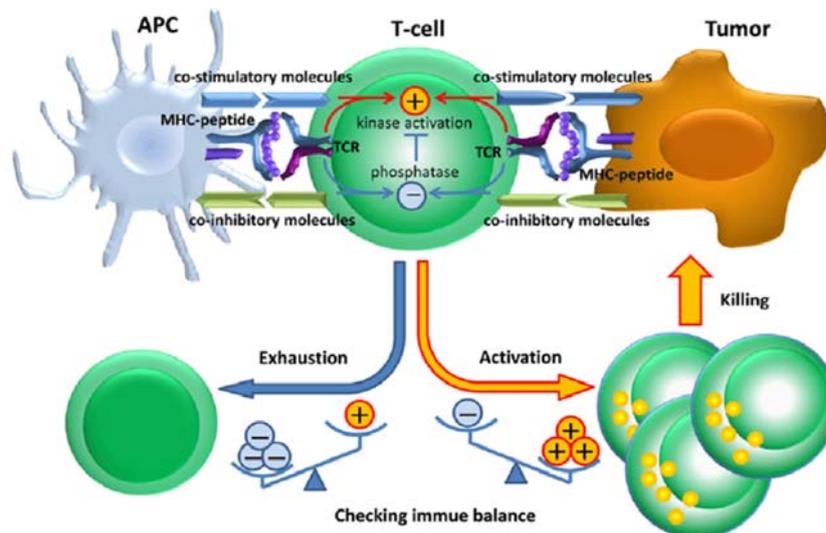
Em relação ao TNF- α , a sua ação é mediada pela interação dessa citocina com dois receptores presentes na membrana celular, o TNFR1 e o TNFR2, cuja ativação pode levar à indução de proliferação ou apoptose celular (CABAL-HIERRO e LAZO 2012; GENG et al. 2013). Estudo publicado em 2017 mostrou que tratamentos com TNF- α tinham efetiva atividade antitumoral, seja sozinho, ou em associação com a quimioterapia ou radioterapia, porém teve uma utilização restrita por causa de sua toxicidade (MARTÍNEZ-REZA et al. 2017).

1.2.2 Mecanismos de inibição e ativação da resposta imune

Por sua vez, os mecanismos imunológicos antitumorais passaram a ser bem estudados nas últimas décadas, com a perspectiva de melhor compreender as vias envolvidas na ativação e inibição da resposta imune em diferentes tipos e estágios tumorais, objetivando o desenvolvimento de imunoterapias que possam ajudar na eliminação do tumor (CHEN e MELLMAN 2013).



As imunoterapias surgiram como nova promessa de tratamentos contra o câncer, sendo uma abordagem inovadora que melhora a resposta imune contra as células tumorais, e podem resultar em remissão prolongada de alguns tipos de tumores. A fase de escape ou tolerância imunológica, já descrita, está presente nos tumores em estágios avançados (estádio III e IV), cujos tratamentos padrão não são suficientes para eliminação de antígenos tumorais, mas pode levar a ativação da resposta imune. As abordagens terapêuticas com imunobiológicos capazes de ativar a resposta imune por mecanismos de bloqueio de receptores de inibição (antagonistas), e/ou por estimular (agonistas) os receptores de co-estimulação dos linfócitos T, reverte o status não respondedor dos linfócitos T, aumentando a produção de proteínas que participam da citólise tumoral (SUZUKI et al. 2016) (Figura 4).



Fonte: SUZUKI et al. (2016)

Figura 4 - Representação esquemática dos mecanismos de ativação e inibição de células T por meio das interações entre as moléculas co-estimuladoras e co-inibidoras. TCR: T cell receptor; MHC: *major histocompatibility complex*; APCs: antigen presenting cells;

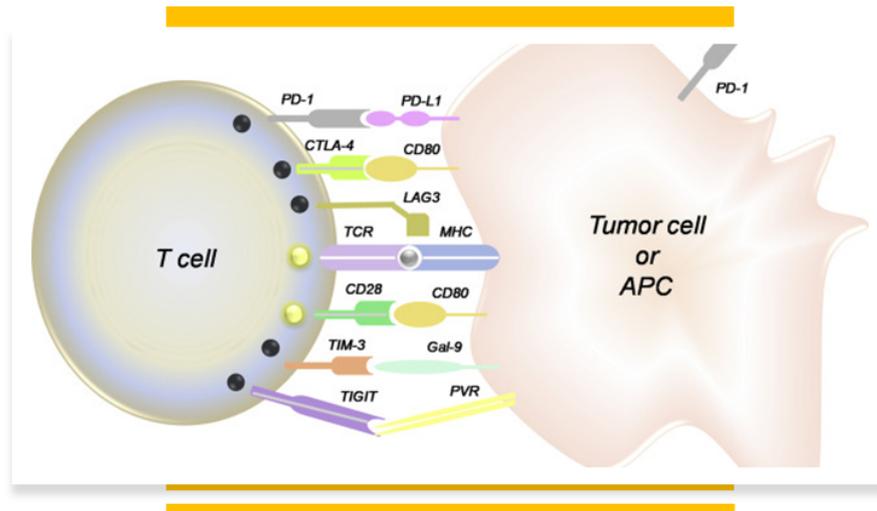


No que diz respeito as células T, essas são cuidadosamente reguladas por várias proteínas acessórias presentes na superfície celular, denominadas receptores co-estimuladores e co-inibidores (*immune checkpoint receptors*). Os receptores de *checkpoint* estão implicados na ativação da resposta imune e na regulação de sua intensidade e duração (SHARMA e ALLISON 2015; SHIN e RIBAS 2015). Dois dos receptores co-inibidores mais bem estudados que promovem a inibição dos linfócitos T são o CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) e o PD-1 (do inglês, *programed cell death-1*), sendo membros da superfamília do TNF (WARD-KAVANAGH et al. 2016).

A principal função desses receptores co-inibidores é manter a tolerância aos antígenos próprios e prevenir a autoimunidade. Além disso, eles participam das respostas imunes mediadas por células T, promovendo a regulação da produção de mediadores inflamatórios. Um dos mecanismos de escape das células tumorais a resposta imune ocorre pelo aumento de expressão desses co-inibidores (receptores e seus ligantes), induzindo supressão das funções mediadas pelas células T (Figura 5) (MELERO et al. 2014; MAHONEY et al. 2015; HOOS 2016; KHALIL et al. 2016).

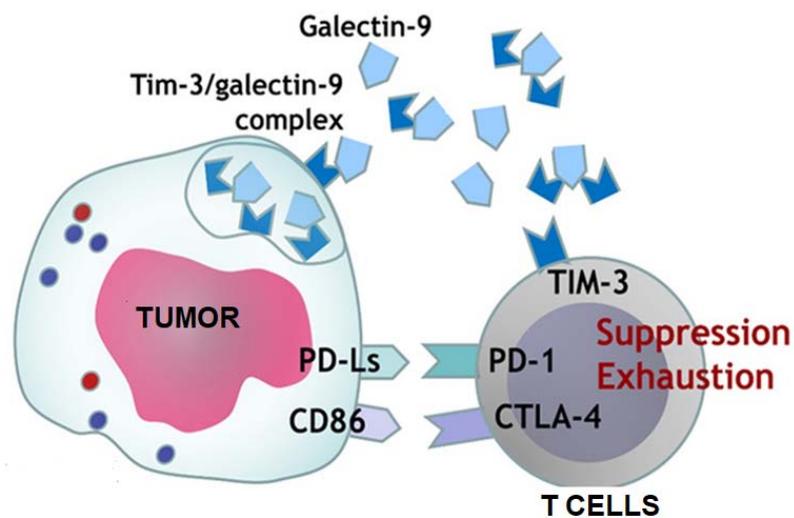
Uma outra molécula de inibição que pode ser expressa em células T ou células tumorais é o *T-cell immunoglobulin and mucin domain-3* (TIM-3) pertence à família TIM e consiste em três membros (TIM-1, TIM-3 e TIM-4) em humanos. As proteínas TIM individuais diferem na estrutura molecular e nos padrões de expressão, bem como em suas funções reguladoras e impacto nas respostas das células T. O TIM-3 utiliza a lectina do tipo C (GAL-9 - galectina-9) como seu ligante, sendo expresso na superfície da membrana celular e livre no plasma (solúvel: sTIM3) (FREEMAN et al. 2010; ANDERSON 2014) (Figura 6).





Fonte: ABDEL-AZIZ et al. (2019)

Figura 5 - Representação esquemática das interações dos receptores de co-estimulação e co-inibição expressos nos linfócitos T e os seus respectivos ligantes.



Fonte: Adaptado de KURSUNEL e ESENDAGLI (2017)

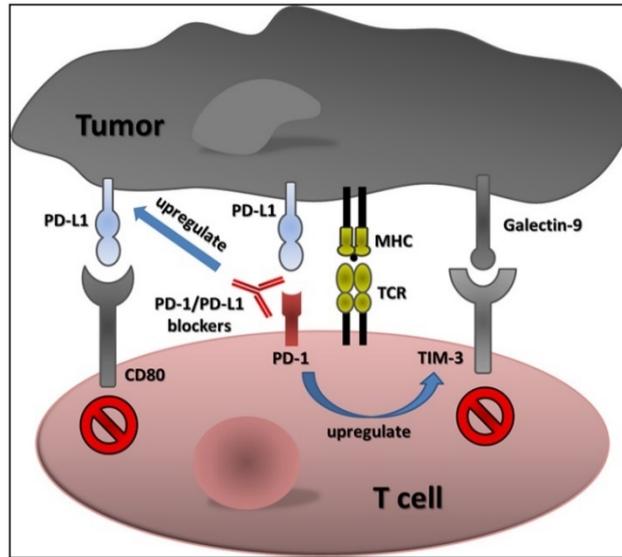
Figura 6 - Representação esquemática das interações entre o ligante de PD1 (PDL-1) com seu receptor PD1 na membrana dos linfócitos T e do CTLA-4 com o seu ligante CD86 expresso na membrana do Tumor. Interações entre a galectina-9 (sGAL-9) e/ou TIM-3 na sua forma solúvel, assim como do complexo sTIM-3-sgalectina-9 com a molécula de TIM-3 na membrana do tumor, um mecanismo aliado para suprimir e escapar da resposta imune.



Alguns autores demonstraram em camundongos deficientes e normais que quando utilizado uma proteína que bloqueia a sinalização da via TIM-3, esses camundongos apresentam defeitos na indução de tolerância a antígenos (SABATOS et al. 2003; SÁNCHEZ-FUEYO et al. 2003). O TIM-3 é um receptor de *immune checkpoint* que funciona para limitar duração e magnitude das respostas imunes mediadas por células TCD4+ e TCD8+, contribuindo na manutenção da homeostase (SABATOS et al. 2003; SÁNCHEZ-FUEYO et al. 2003; MATSUZAKI et al. 2010). A co-expressão de TIM-3 e PD1 na superfície de células T induz a redução dos mecanismos efetores da resposta imune celular (SAKUIISHI et al. 2010; ZHOU et al. 2011; ARAI et al. 2012). Nesse contexto, a combinação de anticorpos monoclonais anti-TIM-3 e anti-PD-1 teve um efeito sinérgico na supressão do crescimento tumoral (FOURCADE et al. 2010; SAKUIISHI et al. 2010; KOYAMA et al. 2016).

A inibição das funções efetoras de células T do tipo T helper 1 (Th1) induzida pelas interações entre TIM-3 e GAL-9 leva a redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e relaciona-se com a progressão do câncer (GOLDEN-MASON et al. 2015). Estudo publicado em 2015, mostrou que a IL-15 em combinação com um anticorpo anti-TIM-3 pode induzir uma potente resposta de células T CD8+ citotóxicas *in vitro* contra células tumorais de câncer de mama (HEON et al. 2015). A Figura 7 mostra o bloqueio das vias PD1/PDL1 com aumento da expressão de PDL1 pelas células tumorais e de TIM3 por linfócitos T.





Fonte: WONG e CAMERON (2017)

Figura 7 - Representação esquemática do bloqueio das vias PD-1 / PD-L1 com indução de expressão de PD-L1 em células tumorais e de TIM-3 em células T efetoras. Mecanismo de compensação pelo bloqueio das vias PD1/PDL1.

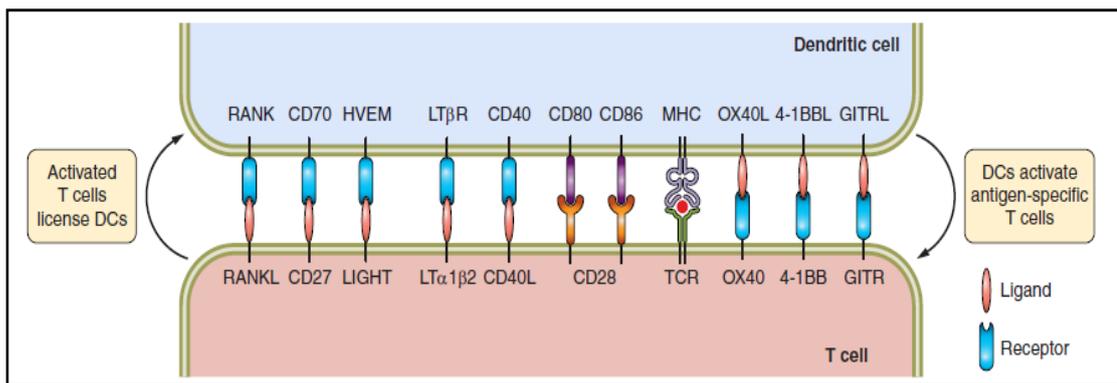
Por outro lado, alguns membros da superfamília do TNF fornecem sinais co-estimuladores essenciais para a imunidade inata e adaptativa, com ênfase nas respostas imune de células T (CELLA et al. 1996). Os linfócitos T naive (virgens) necessitam do envolvimento do receptor de antígeno T (TCR) e de sinais de receptores adicionais (co-estimuladores) para ativação, proliferação e diferenciação celular. A apresentação do antígeno à célula T pelas células dendríticas resulta em interações dos ligantes de CD40 (CD40L) e o seu respectivo receptor CD40. A sinalização CD40 resulta na produção de interleucina 12 e dos ligantes de 4-1BB (4-1BBL ou CD137L), de OX40 (OX40L) e do GITRL (do inglês, *Glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) pelas células dendríticas (DCs).

As interações entre células T e células DCs durante a apresentação do antígeno resultam na ativação de várias vias de sinalização dos membros do TNF nas células dendríticas, o que leva ao aumento de expressão de CD40, de moléculas MHC e co-



estimuladores (CD80 e CD86) (CELLA et al. 1996). A produção de citocinas IL-1 β , IL-6, e IL-12, induz a expressão de moléculas co-estimuladoras e a apresentação de antígenos são reguladas pelas interações de CD40 expresso na membrana das DCs. Assim, tanto a maturação das DCs e a subsequente ativação e diferenciação das células T são desencadeadas pela sinalização entre o CD40 e seu ligante (CD40L) (MA e CLARK 2009) (Figura 8).

Para os linfócitos T, as interações mediadas pelas interações do receptor de antígenos (TCR), 4-1BB, OX40 e GITR promovem uma forte ativação e proliferação desses linfócitos, produção de interferon tipo I (IFN α/β) e sua diferenciação em células T efetores e de memória (CELLA et al. 1996). Um dos mediadores que se tem estudado e que se relaciona com a ativação do sistema imune é o 4-1BB (CD137/TNFRSF9), um receptor da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFR), que atua como co-estimulador de linfócitos T efetores, sendo fundamental na ativação e sobrevivência das células T de memória (CHEN e FLIES 2013; SCHMIED et al. 2015).

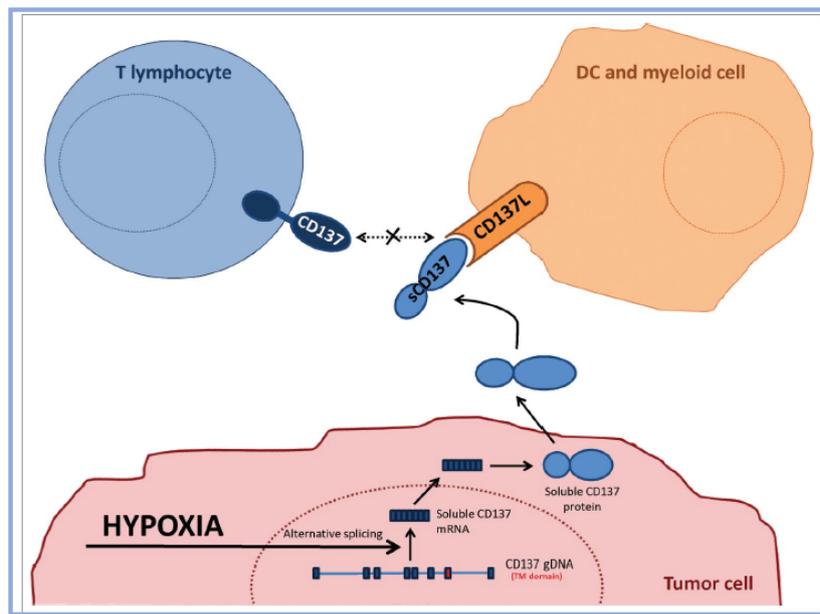


Fonte: DOSTERT et al. (2019)

Figura 8 - Representação esquemática das interações entre as células dendríticas (DCs) e células T mediadas pelos membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) / e a superfamília dos receptores de TNF (TNFRSF).



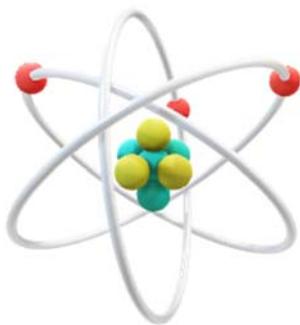
A sinalização via 4-1BB/4-1BBL estimula a proliferação de células TCD4+ e TCD8+ e há um aumento na produção de citocinas como INF γ e IL-2 melhorando a sobrevivência das células por ativar fatores de transcrição anti-apoptóticos (MAKKOUK et al. 2016). As interações entre os ligantes de 4-1BB expressos em macrófagos e células dendríticas com os seus respectivos receptores resultam no aumento da produção IL-8 e IL-12, o que promove a regulação da sobrevivência das células T (VINAY et al. 2006). Além da forma anexada de membrana do 4-1BB (CD137), uma forma solúvel resultante do *splicing* alternativo foi identificada. As moléculas de s4-1BB (sCD137) circulantes foram detectadas no soro de pacientes com câncer colorretal (DIMBERG et al. 2006; SHAO et al. 2008; KIM et al. 2011) (Figura 9).



Fonte: LABIANO et al. (2015)

Figura 9 - Representação esquemática da liberação na forma solúvel de s4-1BB/sCD137 após a hipóxia das células tumorais. A interação entre s4-1BB/sCD137 com o ligante presente nas células dendríticas (DCs) bloqueia as interações entre 4-1BB/CD137 presente na membrana de linfócitos T com o seu ligante 4-1BBL/CD137L.





JUSTIFICATIVA



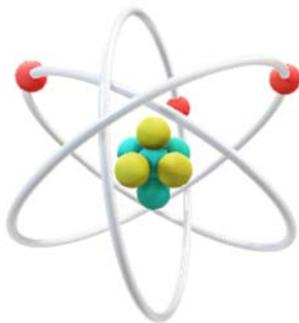
2 JUSTIFICATIVA

O avanço no conhecimento e o aprofundamento nos estudos na área da Imunologia têm despertado interesse na comunidade científica à procura de biomarcadores mais sensíveis e específicos que possam estar relacionados à progressão, monitorização e metastatização das pacientes com câncer.

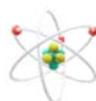
A procura por mediadores da resposta imune que possam predizer resposta a quimioterapia também é um desafio, principalmente nas pacientes com CMTN que basicamente têm a quimioterapia padrão como única forma de tratamento. Novas abordagens de tratamento que atuem diretamente no sistema imune são importantes para alguns tipos de tumores, pois podem modificar o prognóstico dessas pacientes.

A identificação de mediadores no sangue periférico é um método acessível, rápido, de baixo custo e que pode nos proporcionar informações em tempo real de vários momentos da doença em diversas fases do tratamento.





OBJETIVOS



3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

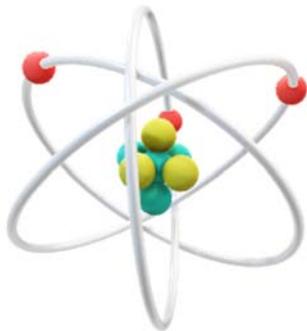
Avaliar os níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB, e de citocinas inflamatórias no sangue de mulheres com câncer de mama triplo negativo localmente avançado, e associá-los a sobrevida livre de doença e com o tipo de resposta à quimioterapia neoadjuvante

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em mulheres com câncer de mama triplo negativo antes e após quimioterapia neoadjuvante (QT neo):

- Determinar os níveis dos mediadores solúveis sTIM-3, s4-1BB, e das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IL-10);
- Associar os níveis séricos dos mediadores inflamatórios estudados com a classificação T e N do TNM;
- Avaliar a relação dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios com o tipo de resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante;
- Avaliar a relação dos níveis de sTIM-3, s4-1BB com a sobrevida livre de doença em 24 meses de seguimento.





MATERIAIS E MÉTODOS



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este foi um estudo exploratório e translacional realizado em mulheres com câncer de mama triplo negativo (CMTN) avançado incluídas entre Março de 2015 a Julho de 2017. O seguimento de todas as pacientes foi de 24 meses a partir da data do diagnóstico.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e Hospital de Câncer de Pernambuco sob os números CAAE 39967014.3.3002.5201 e CAAE 39967014.3.0000.5205, respectivamente. Este estudo faz parte do projeto âncora “Investigação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nos tumores de mama HER-2 e triplo-negativo localmente avançado”, cuja pesquisadora responsável é a Dra. Leuridan Cavalcante Torres.

4.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Pacientes: Foram incluídas 29 mulheres com idade entre 18 e 60 anos e diagnóstico de câncer de mama localmente avançado triplo negativo (TN) 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. Constituída por mulheres acompanhantes de pacientes e funcionários que concordaram em participar da pesquisa.

4.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado no serviço de mastologia/oncologia do HCP e no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). O período do estudo para inclusão de pacientes foi de 01 de março de 2015 a 30 julho de 2017. As pacientes foram acompanhadas para observar o desfecho clínico até 30 de outubro de 2019.

4.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

4.4.1 Critérios de inclusão

- Mulheres com idade entre 18 e 60 anos com diagnóstico de carcinoma invasivo de mama, estadiamento III (A, B e C), e de subtipo triplo negativo confirmado por exames de imunistoquímica realizados em dois diferentes laboratórios de anatomopatologia e pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante.

4.4.2 Critérios de exclusão

- Metástases à distância diagnosticados por método de imagem no momento do diagnóstico; gestação e lactação; neoplasia prévia, exceto câncer de pele não melanoma; uso de antibióticos ou drogas imunossupressores nos últimos 30 dias antes da coleta de sangue; história clínica de doenças autoimunes, e de



infecções por HTLV e HIV; história clínica de processo inflamatório agudo, infeccioso ou não, nos últimos 30 dias antes da coleta de sangue.

4.5 PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO DAS PACIENTES

As pacientes atendidas no ambulatório de oncologia clínica e/ou mastologia, com diagnóstico de câncer de mama localmente avançado foram avaliadas quanto aos critérios de elegibilidade. A paciente foi informada sobre as características da pesquisa sendo aplicado a lista de checagem (Apêndice 1) e solicitado a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 2). Logo após, foi aplicado um formulário clínico utilizado para captação dos dados das pacientes (Apêndice 3).

A coleta de dados das pacientes foi realizada durante a anamnese oncológica e todas as pacientes selecionadas receberam informações e concordaram voluntariamente em participar do estudo. Foram avaliadas um total de 32 pacientes com câncer de mama triplo negativo em estágio III (localmente avançada) na admissão, sendo um total de 3 perdas (pacientes não realizaram todos os ciclos da QT neo - tratamento incompleto) (Figura 10).



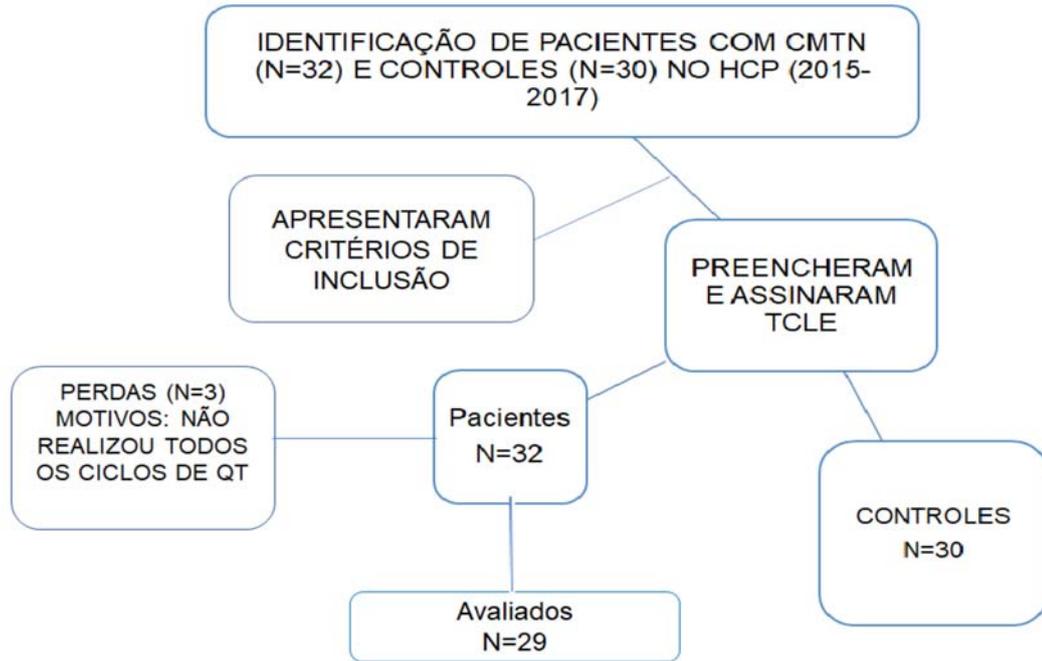
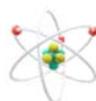


Figura 10 - Fluxograma de inclusão de pacientes e controles

A coleta da primeira amostra de sangue periférico foi realizada uma hora antes do início da quimioterapia neoadjuvante e a segunda coleta após 30 dias da finalização da QT neo. Nenhuma das pacientes foi submetida a radioterapia ou quimioterapia antes da coleta de sangue periférico.

O preenchimento do instrumento de coleta de dados (apêndice 3) foi complementado por anotações do prontuário da paciente. Para avaliação do estadiamento do câncer de mama foi utilizado o Sistema TNM do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) de classificação de tumores malignos (8ª edição) preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) (AMIN et al. 2017).



4.6 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NEOADJUVANTE

O tratamento quimioterápico foi realizado com as medicações antineoplásicas adriplastina RD e paclitaxel do laboratório Pfizer e a ciclofosfamida do laboratório Baxter que foram adquiridas exclusivamente para este 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 de quatro ciclos de adriamicina (dose de 60 mg/m²) e ciclofosfamida (dose de 600 mg/m²) em dose densa a cada 15 dias associado a filgastrina (dose de 300 µg/dia) subcutânea por 5 dias, seguida de doze ciclos de paclitaxel (dose 80 mg/m²) a cada 7 dias. Antes de cada ciclo de quimioterapia neoadjuvante, a paciente foi avaliada pelo oncologista, sendo avaliado 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 e foi seguindo o seguinte fluxograma de intervenção conforme descrito em Figura 11.

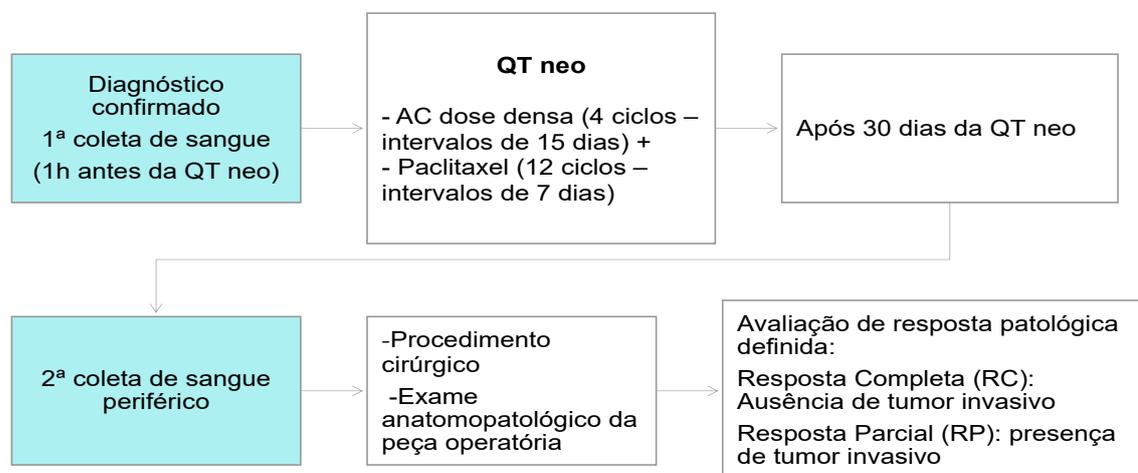


Figura 11 - Intervenção terapêutica e coleta de amostra biológica



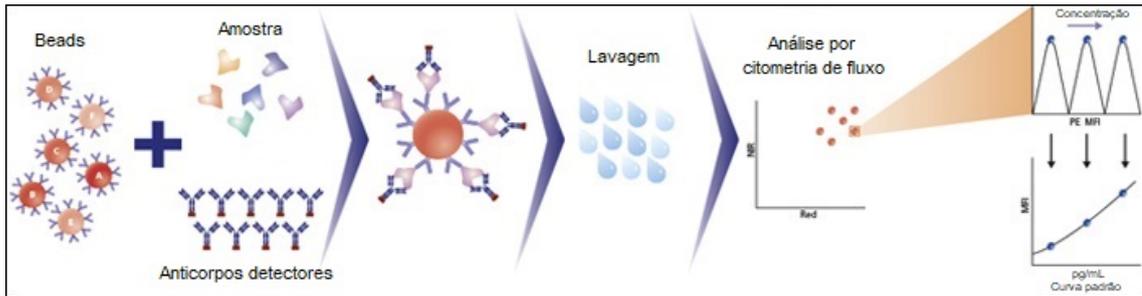
4.7 TESTES LABORATORIAIS PARA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

Para os testes laboratoriais, o volume total de 4 mL de sangue foi colhido em tubo com anticoagulante, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (BD Vacutainer®). Foi realizada a separação do plasma por meio de centrifugação a 300 g por 5 min à temperatura de 4 °C.

4.7.1 Determinação dos níveis de proteínas livres no plasma por *Cytometric Bead Array (CBA)*

O CBA é uma técnica que se baseia no uso de esferas de poliestireno, denominadas esferas de captura, marcadas com diferentes graus de fluorescência e recobertas com anticorpos monoclonais específicos para cada molécula solúvel (Figura 12). Essa técnica permite a avaliação simultânea de diversos analitos no mesmo ensaio utilizando volumes pequenos de amostra. Para dosagens, 25 µL da amostra de plasma, alíquotas de 25 µL da mistura de esferas de captura e 25 µL do reagente de detecção, anticorpos monoclonais específicos para cada molécula solúvel/citocina conjugados ao fluoróforo PE foram utilizados. Após a incubação, foi realizada etapa de lavagem e aquisição no citômetro de fluxo. Foram adquiridos 300 eventos por molécula solúvel/citocina no equipamento de citometria de fluxo, e as concentrações nas amostras expressas em pg/mL. As concentrações foram determinadas a partir das curvas-padrão utilizando o *FCAP Array Software* (BD BIOSCIENCES, CA).





Fonte: Adaptada do catálogo da BD Biosciences.

Figura 12 - Técnica de CBA para a detecção de quimiocinas.

4.7.2 Quantificação de citocinas pela técnica *Cytometric Bead Array (CBA)*

A concentração das citocinas séricas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IL-10) foi determinada no soro das pacientes e controles. A determinação foi realizada por citometria de fluxo, utilizando BD™ CBA – *Human pro-inflammatory Kit*, seguindo instruções do fabricante. Foram adquiridos 1800 eventos no aparelho de citometria de fluxo (FACsVerse™, BD BIOSCIENCES, Sunnyvale, CA). Os dados foram analisados com o programa BD FACSuite™ (BD Biosciences, CA) e expressos em pg/mL.

4.7.3 Quantificação das concentrações séricas de s4-1BB e sTIM-3 por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Um volume total de 100 uL foi utilizado para dosagem por ELISA, e o teste foi realizado em duplicata. Foram utilizados os kits comerciais para os testes laboratoriais: Human TIM-3 DuoSet ELISA DY2365 (R&D® Systems); CD137/s4-1BB (Soluble) Human ELISA Kit (Invitrogen, Thermo Scientific, cat#BMS289). A leitura da absorbância foi realizada utilizando a leitora de placas Human Reader HS (Human, Wiesbaden, Germany). A leitura das absorbâncias foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram expressas em pg/mL.



4.8 CLASSIFICAÇÃO E DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS

Quadro 2 - Variáveis clínico-patológicas no câncer de mama e de evolução da doença.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Tumor primário (T)	<p>TNM 8ª EDIÇÃO (Estadiamento clínico)</p> <p>TX – Tumor primário não avaliável</p> <p>T0 – Sem evidência de tumor primário</p> <p>Tis – Carcinoma in situ:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tis (CDIS) Carcinoma ductal in situ; • Tis (Paget's) Doença de Paget sem carcinoma invasivo e/ou in situ. <p>T1 – Tumor ≤ 2 cm na sua maior dimensão:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 até 2,0 cm na sua maior dimensão. <p>T2 – Tumor > 2,0 cm e ≤ 5cm na sua maior dimensão</p> <p>T3 – Tumor > 5,0 cm</p> <p>T4 – Tumor de qualquer dimensão com extensão à parede torácica ou à pele:</p> <ul style="list-style-type: none"> • T4a – Extensão à parede torácica acometendo o músculo peitoral e sem acometer parede torácica • T4b – Edema ou ulceração da pele ou nódulos satélites confinados à mama (inclui pele em casca de laranja) sem critérios para carcinoma inflamatório; • T4c – T4a + T4b; • T4 d – Carcinoma inflamatório. 	<p>Variável nominal policotômica</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. TX 2. T0 3. Tis 4. T1 5. T2 6. T3 7. T4



Cont/ Quadro 2

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Envolvimento ganglionar regional (N)	<p>Nx: Gânglios regionais não avaliáveis</p> <p>N0: Sem metástase ganglionar regional</p> <p>N1: Metástases nos gânglios axilares ipsilaterais móveis</p> <p>N2: Metástases nos gânglios axilares ipsilaterais fixos ou nos gânglios da cadeia mamária interna clinicamente invadidos na ausência de gânglios axilares:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N2a – Gânglios axilares ipsilaterais fixos ou fixos a outras estruturas; • N2b – Metástases clinicamente aparentes na cadeia mamária interna na ausência de gânglios linfáticos axilares. <p>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:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N3a – Metástases nos gânglios infraclaviculares ipsilaterais; • N3b – Metástases nos gânglios da mamária interna ipsilateral e nos gânglios axilares; • N3c – Metástases nos gânglios supraclaviculares ipsilaterais. 	<p>Variável nominal policotômica</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. NX 2. N0 3. N1 4. N1a 5. N1b 6. N1c 7. N2 8. N2a 9. N2b 10. N3 11. N3a 12. N3b 13. N3c
Grau histológico	<p>Diagnóstico de carcinoma invasivo de mama confirmado por exame histopatológico da peça cirúrgica:</p> <p>G1 –baixo grau histológico (bem diferenciado); SBR score 3-5 pontos</p> <p>G2 – Grau histológico intermediário (moderadamente diferenciado); SBR score 6-7 pontos</p> <p>G3- Alto grau histológico (pouco diferenciado); SBR 8-9 pontos</p>	<p>Variável nominal policotômica</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. G1 2. G2 3. G3
Taxa de resposta	<p>A avaliação de resposta patológica foi realizada no exame anatomopatológico e foi utilizado a classificação da AJCC 8ª edição, com as seguintes definições:</p> <p>Resposta patológica completa (RC): Ausência de carcinoma invasivo na mama ou axila.</p> <p>Resposta patológica parcial (RP): Presença de carcinoma invasivo na mama ou axila.</p> <p>Ausência de resposta patológica: Quando não há evidência de alterações na celularidade do T ou do N no exame anatomopatológico ou quando há um aumento no T ou no N em relação ao estadiamento inicial</p>	<p>Variável nominal dicotômica</p> <p>0 - sem resposta</p> <p>1 - RP</p> <p>2 - RC</p>



Cont/ Quadro 2

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Recorrência local	A recorrência local é definida como a recidiva no tumor primário e/ou em linfonodos loco-regionais. A data da recorrência local foi considerada a data do histológico que confirma a progressão.	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim
Recorrência à distância	A recorrência a distância é definida como a recidiva fora da região mama e linfonodos loco-regionais, incluindo: Óssea, hepática, pulmonar, pele e SNC. A data da recorrência a distância foi considerada a data do exame de imagem que confirme progressão.	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim
Sobrevida livre de doença	A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada em meses, a partir da data do tratamento cirúrgico (dia da cirurgia) até a data da constatação da recorrência, seja local ou à distância.	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**4.9.1 Análises de associação**

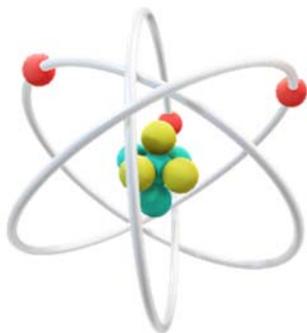
A estatística descritiva das variáveis categóricas foi apresentada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central, mediana e interquartil (IQR).

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas deste estudo foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). O teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparação entre dois grupos. O teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* foi utilizado para comparação entre três ou mais grupos. Para evitar erro estatístico tipo I, as análises pelo teste *Kruskal-Wallis* 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 v8.0 (Graphpad software, San Diego, CA).

4.9.2 Análise de sobrevida livre de doença

A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada em meses, a partir da data do tratamento cirúrgico (dia da cirurgia) até a data da constatação da recorrência, seja local ou à distância. Na análise da SLD, utilizamos como ponto de corte o valor da mediana ($<$ ou \geq percentil 50) dos níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB obtidos na coleta 30 dias após o tratamento neoadjuvante, e 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 v8.0 (Graphpad software, San Diego, CA).





RESULTADOS



5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DAS MULHERES COM CMTN

Foram analisadas 29 pacientes com câncer de mama triplo negativo com mediana de idade de 45 anos. Foram incluídas 30 mulheres saudáveis como grupo controle, cuja mediana de idade foi de 47 anos. Não houve diferença significativa dos valores de mediana de idade entre pacientes e controles. Todas as pacientes tinham como tipo histológico o carcinoma invasivo do tipo não especial (WHO 2019). O grau histológico mais encontrado foi o III (75,9%).

Todas as pacientes admitidas tinham tumor localmente avançado (estágio IIIA, B e C). A maioria com tumores invadiam a parede torácica ou na pele (T4; 68,9%), seguido de tumores com tamanho > 2 a ≤ 5 cm (T2) e > 5 cm (T3), representando 31,0% dos casos. A maioria das pacientes apresentavam metástase em linfonodos axilares móveis (N1- 51,2%), seguido de ausência de metástases em linfonodos regionais (N0- 24,1%) e metástase linfonodos axilares fixos (N2- 20,7%). A resposta patológica completa (RC) foi observada em 48,28% das pacientes e 6 pacientes evoluíram com recidiva, sendo 4 com metástase no SNC e duas com recidiva loco-regional, uma delas progredindo para fígado e pulmão (Tabela 1).



Tabela 1 – Descrição das frequências das características clínicas e anatomopatológicas de 29 pacientes com câncer de mama triplo negativo entre os anos de 2015 e 2017

VARIABLES	CMTN	Controles	
	N=29 (%)	N=30	
Idade (anos)			p=0,23*
Mediana (IQR)	45 (37-52)	47 (44 – 53)	
Tipo Histológico			
Carcinoma invasivo tipo não especial	29 (100)		
Grau histológico			
I	0		
II	5 (17,24)		
III	22 (75,86)		
Desconhecido	2 (6,90)		
Tumor primário (T)			
T2 – T3	9 (31,0)		
T4	20 (67,0)		
Status linfonodal (N)			
N0	7 (24,1)		
N1	16 (55,2)		
N2	6 (20,7)		
Tipo resposta a QT neo			
RC	14 (48,3)		
RP	15 (51,7)		
Ausência de resposta	0		

CMTN – câncer de mama triplo negativo / RC- resposta patológica completa / RP – resposta patológica parcial. QT neo: Quimioterapia neoadjuvante. IQR: interquartil 25-75. *Mann Whitney test



5.2 ANÁLISES DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS DE ACORDO COM ESTADIAMENTO TNM

Foram realizadas análises de citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β , IL-8 e TNF- α e anti-inflamatória IL-10 na amostra de sangue periférico de 29 pacientes coletada uma hora antes do início da QT neo e antes de qualquer tratamento.

- **Entre os grupos de pacientes de acordo com tumor primário**

Verificou-se níveis mais elevados de IL-6 e de IL-10 no grupo de pacientes com tumores (T4) com relação ao grupo T2-T3 ($p=0,003$, $p=0,02$, respectivamente). Não houve diferença significativa dos níveis de IL-1 β , IL-8 e TNF- α de acordo com a classificação do tumor primário (Figura 13).

- **Entre os grupos de pacientes de acordo com o *status* linfonodal**

Verificou-se níveis séricos mais elevados de IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α no grupo de pacientes com status linfonodal N2 com relação aos grupos N0 e N1 ($p<0,05$). Não houve diferença estatística nos níveis de IL-1 β entre os grupos N0, N1 e N2 (Figura 14).



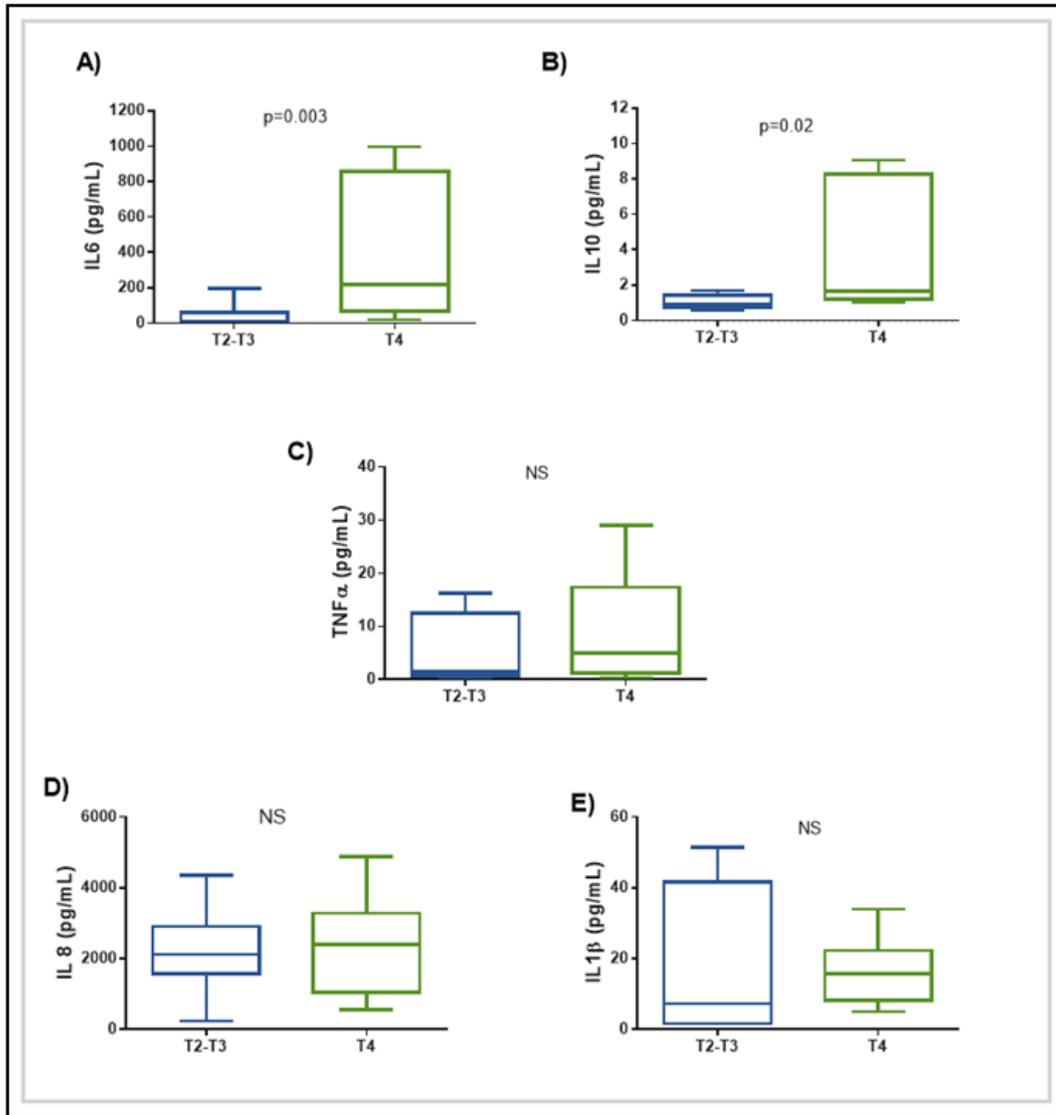


Figura 13 - Análise dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α (pg/mL) nas pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo com o tumor primário. Foram formados grupos com tamanho tumoral de > 2 a ≤ 5 cm (T2) e > 5 cm (T3) (n=9), e grupo com tumores que invadiam a parede torácica ou pele (T4, n=20). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi utilizado teste de *Mann-Whitney*. Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo.



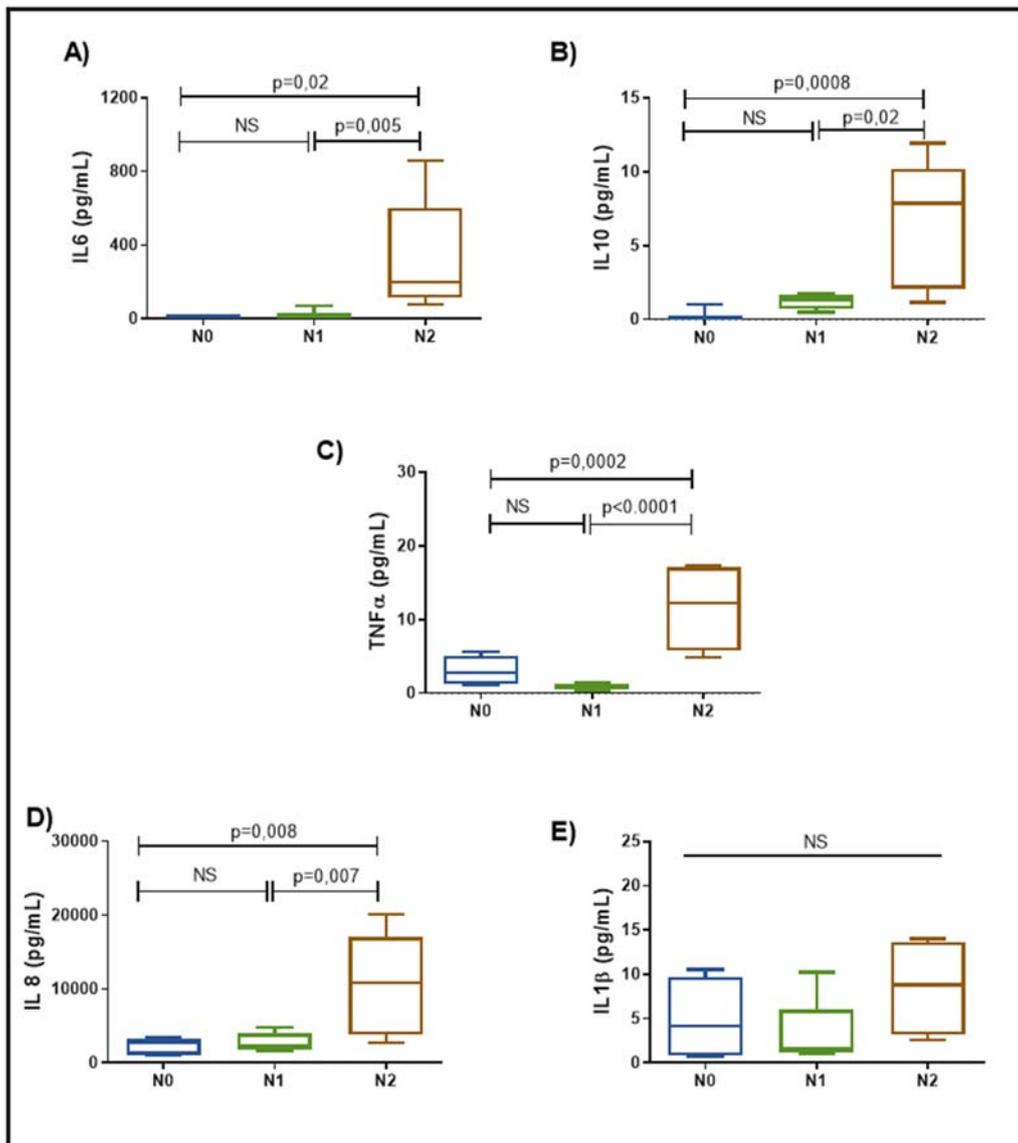


Figura 14 - Análise dos níveis séricos de IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF- α (pg/mL) nas pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo com *status* linfonodal. Foram distribuídos em 3 grupos: N0 - sem metástases ganglionar regional (n=7), N1- metástase em linfonodos axilares móveis (n=16) e N2 - metástase em linfonodos axilares fixos (n=6). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi realizado o teste de *Kruskall-Wallis*. Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo.



5.3 ANÁLISES DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS DE ACORDO COM O TIPO DE REPOSTA A QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

- **Entre os grupos de pacientes de acordo com o tipo de resposta a QT neo e de controles**

Os grupos foram formados por pacientes que obtiveram resposta patológica completa (RC) e parcial (RP) à QT neo. Os níveis de IL1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram elevados no grupo de pacientes com RP quando comparado aos grupos RC e controles ($p < 0,05$) (Figura 15).

Com relação aos níveis de IL-8, os grupos de pacientes RC e RP apresentaram níveis elevados quando comparado aos controles ($p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa de IL-8 entre os grupos RC e RP (Figura 15).



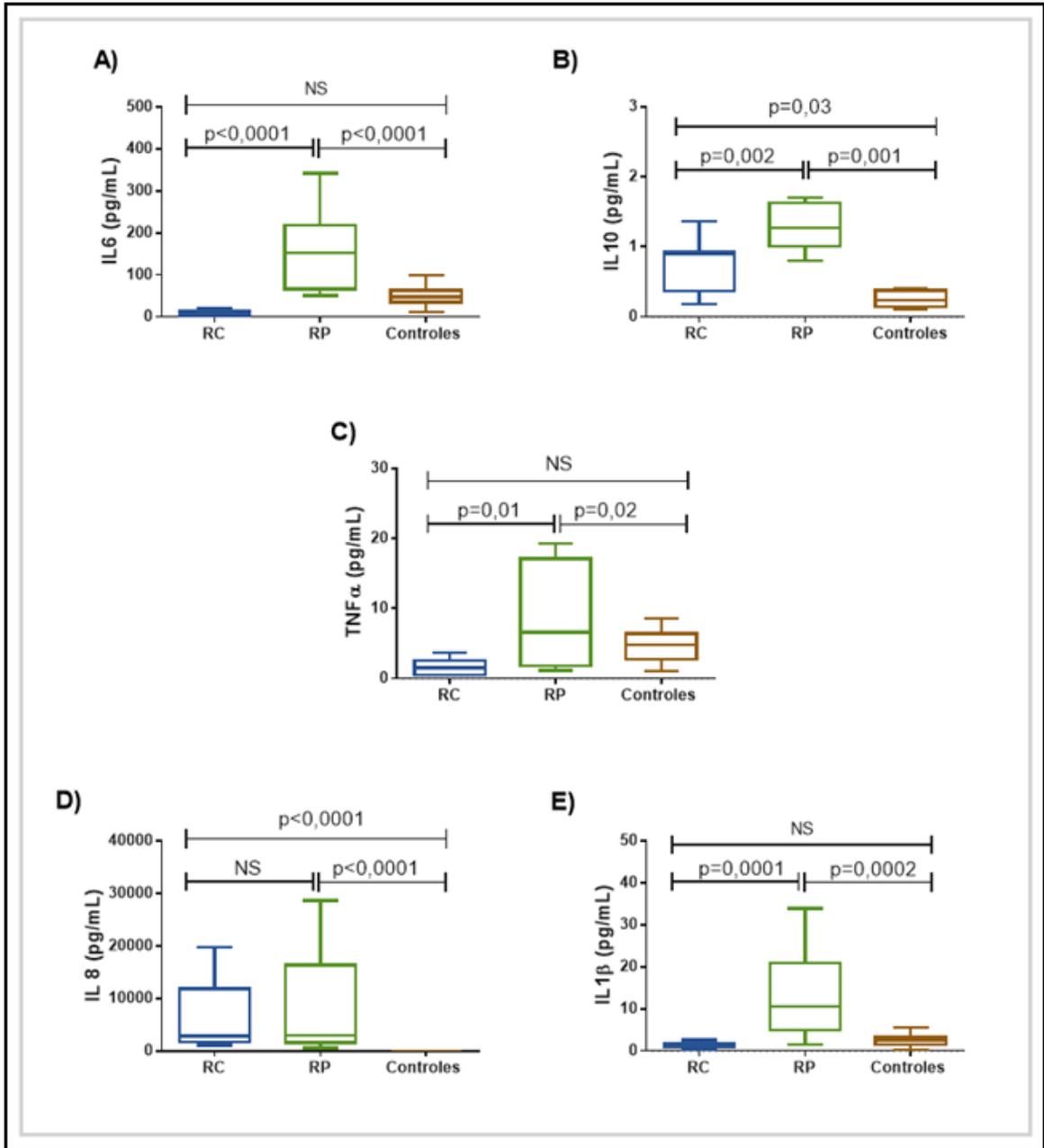


Figura 15 - Análise dos níveis séricos de IL-6, IL-1β, IL-8, IL-10 e TNF-α (pg/mL) nas pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo como tipo de resposta a QT neo. Foram formados 3 grupos de pacientes, um grupo que obteve resposta patológica completa (RC, n=14), resposta parcial (RP, n=15) e o grupo controle. Foi realizada a análise no sangue coletado antes de qualquer tratamento. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo.



5.4 ANÁLISES DOS NÍVEIS SOLUVEIS DE S4-1BB E STIM-3 ACORDO COM ESTADIAMENTO TNM

- **Entre os grupos de pacientes de acordo com o tumor primário**

Não houve diferenças significativas entre os grupos T2-T3 e T4 com relação aos níveis de s4-1BB E sTIM-3 (Figura 16 A e C).

- **Entre os grupos de pacientes de acordo com o *status* linfonodal**

Não houve diferenças estatísticas nos níveis s4-1BB E sTIM-3 entre os grupos com status linfonodal N0, N1 e N2 (Figura 16 B e D).



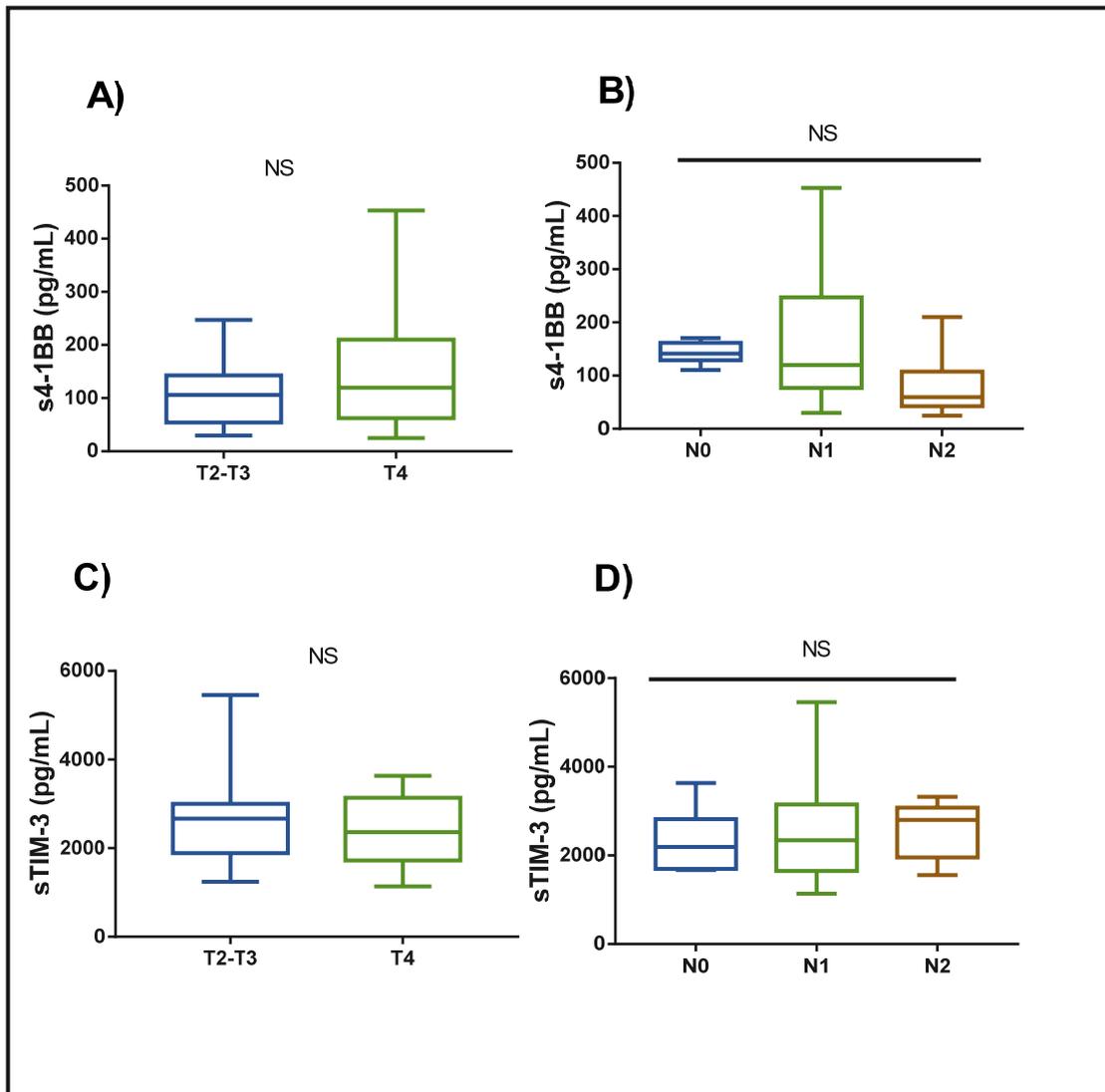


Figura 16 - Análise dos níveis séricos de sTIM-3 e s4-1BB (pg/mL) nas pacientes (n=29) com câncer de mama triplo negativo de acordo com a classificação do TNM. Foram formados grupos com tamanho tumoral de > 2 a ≤ 5 cm (T2) e > 5 cm (T3) (n=9), e grupo com tumores que invadiam a parede torácica ou pele (T4, n=20). Quanto ao *status* linfonodal, os grupos foram divididos em N0 - sem metástases ganglionar regional (n=7), N1- metástase em linfonodos axilares móveis (n=16) e N2 - metástase em linfonodos axilares fixos (n=6). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). *Mann-Whitney* (gráficos 17 A e C) e *Kruskall-Wallis* (gráficos 17 B e D). Foi considerado significativo $p < 0,05$. NS: não significativo.



5.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS SOLUVEIS DE s4-1BB E sTIM-3 ENTRE OS GRUPOS DE PACIENTES DE ACORDO COM O TIPO DE REPOSTA A QT NEO

Nas análises do s4-1BB de acordo com a resposta a QT neo e aos controles, observamos níveis mais elevados de s4-1BB nas pacientes com RC com relação as pacientes com RP e aos controles com valor estatístico ($p < 0,0004$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Como também, os níveis de sTIM-3 foram mais elevados nas pacientes com RC e RP com relação aos controles ($p < 0,0001$ e $p < 0,0003$, respectivamente) (Figura 17).



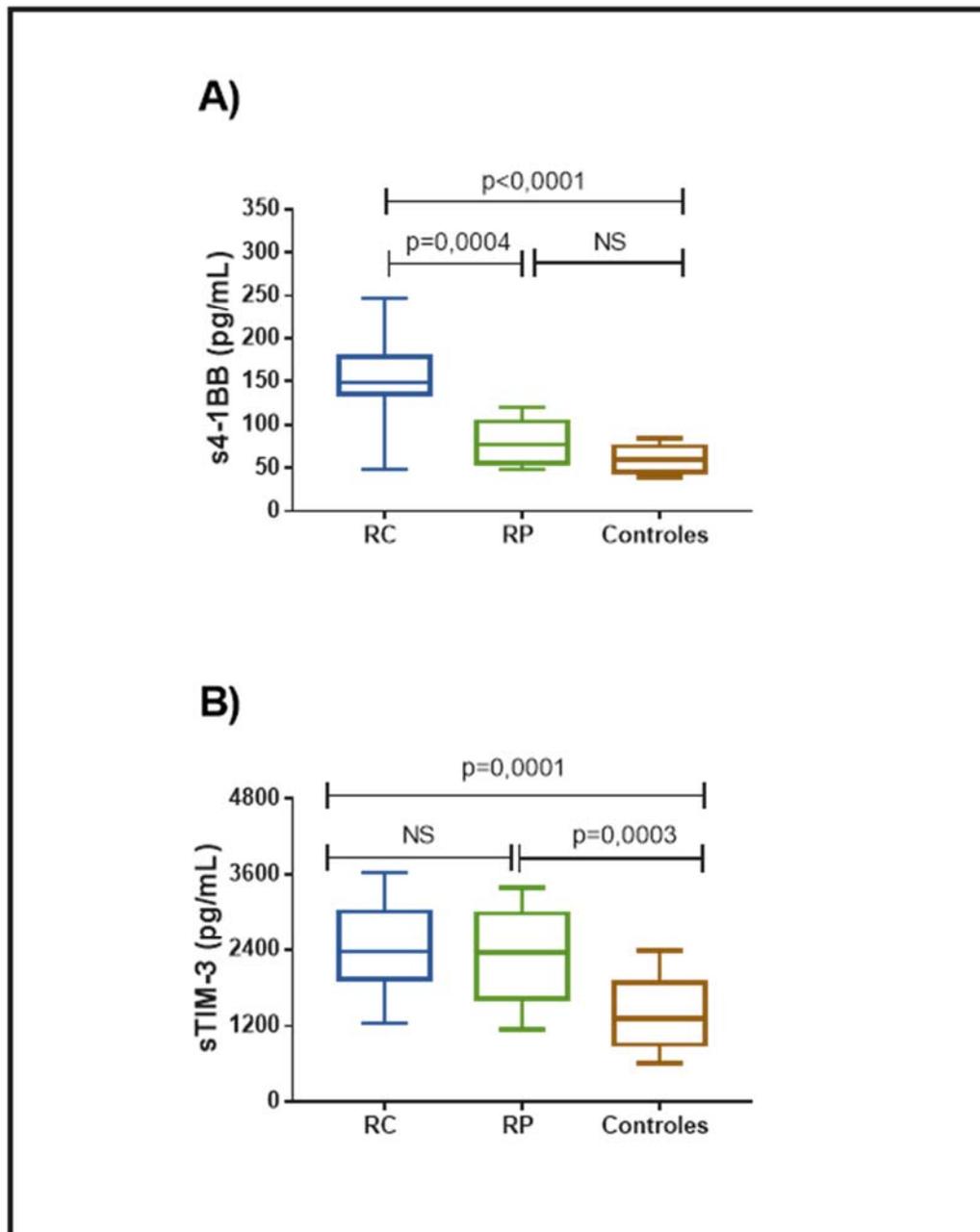


Figura 17 - Níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB (pg/mL) no sangue de pacientes com câncer de mama triplo negativo de acordo como tipo de resposta a QT neo. Foram formados 3 grupos de pacientes, um grupo que obteve reposta patológica completa (RC, n=14), resposta parcial (RP, n=15) e o grupo controle. Foi realizada a análise no sangue coletado antes de qualquer tratamento. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75). Foi realizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Foi considerado significativo $p<0,05$. NS: não significativo.



5.6 CURVAS DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA DE ACORDO COM OS NÍVEIS SOLÚVEIS DE s4-1BB e sTIM-3

A sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada em meses, a partir da data do tratamento cirúrgico (dia da cirurgia) até a data da constatação da recorrência, seja local ou à distância. Na análise da SLD, utilizamos como ponto de corte o valor da mediana ($<$ ou \geq percentil 50) dos níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB obtidos na coleta 30 dias após o tratamento neoadjuvante, e antes do procedimento cirúrgico.

s4-1BB

Não houve diferença significativa nos valores percentuais de sobrevida livre de doença em 24 meses entre os grupos com níveis de s4-1BB ≥ 122 (87,5%) e < 122 pg/mL (81,25%; $p=0,49$; Figura 18A).

sTIM-3

A sobrevida livre de doença em 24 meses foi de 93,33% nas pacientes do grupo com sTIM-3 < 2874 pg/mL e de 60% no grupo de pacientes com níveis de sTIM-3 ≥ 2874 pg/mL ($p=0,03$). (Figura 18B)



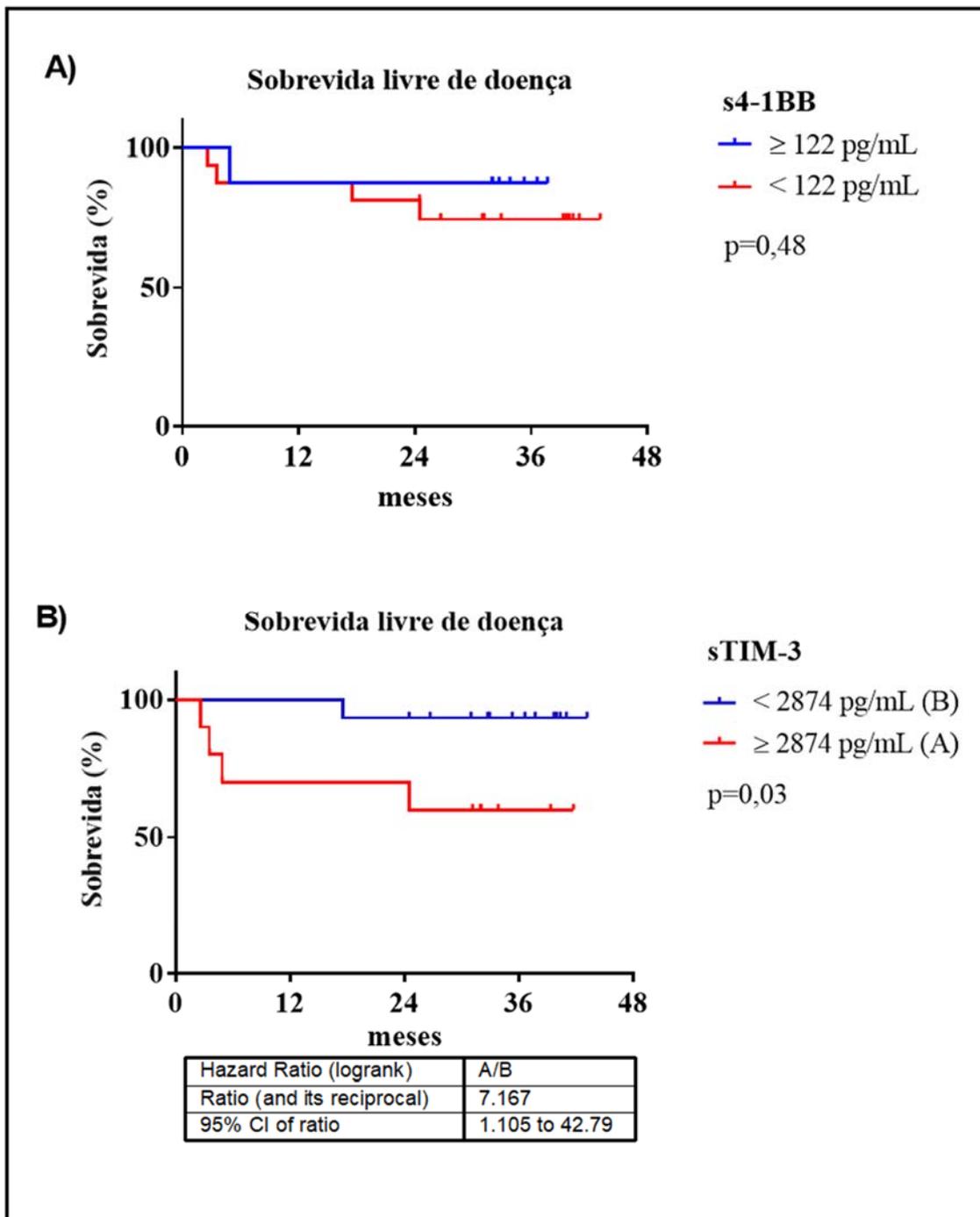
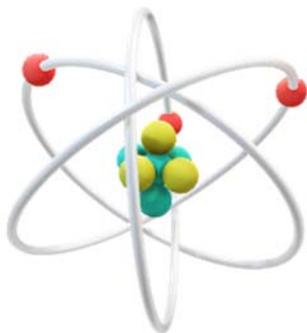


Figura 18 - Análise da sobrevida livre de doença, como ponto de corte o valor da mediana ($<$ ou \geq percentil 50) dos níveis solúveis de s4-1BB e sTIM-3. A coleta de sangue para realização dessas análises foi realizada 30 dias após o tratamento neoadjuvante completo, e antes do procedimento cirúrgico. Log-rank test. Foi considerado significativo $p < 0,05$.





DISCUSSÃO



6 DISCUSSÃO

Os estudos envolvendo análises de mediadores da resposta imune tem sido realizados com o propósito de descobrir potenciais biomarcadores de prognóstico e novos tratamentos em alguns tipos de tumores malignos. Um biomarcador refere-se a um parâmetro biológico quantificável que é medido e avaliado como um indicador de respostas biológicas, patogênicas ou normais, e farmacológicas a uma intervenção terapêutica, conforme definido pela *National Institutes of Health* (FDA-NIH Biomarker Working Group 2016).

O problema é que alguns dos biomarcadores já em uso na prática clínica, como carcinoma antígeno embrionário (CEA), carcinoma antígeno -125 (CA-125) e o antígeno prostático específico (PSA) também podem ser encontrados em baixas concentrações nos indivíduos sem câncer. Da mesma forma, nos pacientes com câncer avançado, níveis baixos desses biomarcadores podem ser detectados o que reflete uma sensibilidade e especificidade muito variada (RUIBAL MORELL 1992; MAZZUCHELLI et al. 2000; SIKARIS 2011).

Nesse sentido, quando se trata de pesquisa translacional, existem poucos dados na literatura sobre biomarcadores de resposta a QT neo no câncer de mama. Alguns estudos descrevem alguns biomarcadores de prognóstico no câncer de mama, mas sem associar diretamente à resposta QT neo. No entanto, o tipo de resposta ao tratamento neoadjuvante no CM localmente avançado ainda configura um dos fatores importantes para determinar prognóstico principalmente no CM triplo negativo e HER-2 (DENT et al. 2007). Recentemente, surgiram novos estudos que evidenciaram que os TILs (do



inglês, *tumor-infiltrating lymphocytes*) presente no câncer de mama antes do tratamento pode prever a resposta à quimioterapia e melhorar o prognóstico (STANTON e DISIS 2016).

Nesse estudo, foi realizada a análise de alguns mediadores envolvidos na ativação, e inibição da resposta imune em 29 mulheres com CMTN localmente avançado e submetidas à quimioterapia neoadjuvante. No que se refere a idade, a mediana foi de 45 anos, 75,8% possuíam carcinoma invasivo tipo não especial de alto grau, dados compatíveis com a literatura para o subtipo triplo negativo (DENT et al. 2007). A nossa taxa de RC foi um pouco mais elevada (48,28%) quando comparada com a metanálise publicada em 2018. Nesse estudo foram incluídas 2109 pacientes com CMTN com uma taxa de RC de 37% (POGGIO et al. 2018). Porém, o percentual de resposta a QT neo obtido no nosso estudo foi semelhante ao encontrado por GIACCHETTI et al. 2014. Nesse estudo, as pacientes foram tratadas com dose densa para tratamento neoadjuvante e obtiveram uma taxa de 48% de RC (GIACCHETTI et al. 2014).

Após um seguimento de 24 meses, 6 pacientes (20%) desenvolveram recorrência, sendo 5 à distância sendo uma delas associado a recidiva loco-regional e uma apenas com recidiva loco-regional. Quanto às metástases à distância, 4 progrediram para SNC e uma outra paciente para fígado e pulmão corroborando aos dados da literatura em que os CMTN têm predileção por metástases viscerais e baixa frequência de metástases ósseas (BARTMANN et al. 2017).

As taxas de mortalidade nos pacientes com câncer de mama que progridem para doença metastática ainda são altas com uma sobrevida média de 26% em 5 anos nos EUA e 5% já apresentam metástase ao diagnóstico (Cancer Net 2020). Os tumores



triplo negativos e os HER-2 positivos apresentam um pior prognóstico com maior risco de metastatização. Em estudo publicado em 2017 no Brasil, avaliando pacientes com perfil imunistoquímico de CMTN, mostrou como principais sítios de metástases o pulmão (30,8%), osso (12,8%), sistema nervoso central (SNC) (12,8%) e o fígado (7,7%) (MARTINS et al. 2017). Dados publicados no St. Gallen 2011, mostram a preferência do CMTN por metástases viscerais (68,7 %), enquanto nos tumores luminais apenas 48,3% apresentavam acometimento visceral. Os sítios mais frequentes nos tumores TN foram o pulmão (50,4%), osso (38,9%), fígado (35,1%) e SNC (21%) (BARTMANN et al. 2017).

Realizamos em nosso estudo a avaliação dos níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α e dos mediadores s4-1BB e sTIM-3 no sangue periférico de mulheres com CMTN antes e após tratamento neoadjuvante. As primeiras análises foram realizadas comparando os níveis séricos desses mediadores de acordo com o tumor primário e *status* linfonodal. Analisamos também, os grupos de pacientes que obtiveram RC, RP e controles saudáveis no intuito de identificar biomarcadores de resposta à QT neo.

Na análise realizada nesse estudo com relação às concentrações séricas da IL-6, constatamos níveis mais elevados de IL-6 em pacientes com tumores que invadem a parede torácica ou pele (T4) e nas pacientes com acometimento linfonodal N2 quando comparado as pacientes com T2-T3 e com as pacientes N0 e N1. Observamos também, elevados níveis de IL-6 nas pacientes com RP em comparação com controles e pacientes com RC. Isso nos mostra que níveis elevados de IL-6 estavam presentes antes do tratamento nas pacientes com tumores mais avançados, e pode estar associado à menor resposta ao QT neo, ou seja, a um pior prognóstico. Esse achado corrobora

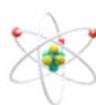


aos dados publicados por CHO YA et al. (2013), que mostraram que pacientes com câncer de mama que não expressam HER-2, e em estágio III da doença apresentaram níveis mais elevados de IL-6 e um pior prognóstico (CHO YA et al. 2013).

Outros autores também demonstraram que os níveis de IL-6 e VEGF estariam aumentados em pacientes com câncer de mama quando comparados aos controles. Encontraram também concentrações mais elevadas nas pacientes com estadiamento mais avançado, metastáticas e com doença linfonodal, sugerindo que a IL-6 possa ser uma possível ferramenta de prognóstico (RAGHUNATHACHAR SAHANA et al. 2017), corroborando aos dados do nosso estudo. Com relação a dosagem sérica de IL-8, também observou-se níveis elevados no grupo com mais comprometimento linfonodal (N2), porém, não houve associação com o tipo de reposta e as características do tumor primário. A IL-8 é uma quimiocina que tem um papel de promoção tumoral autócrina e/ou parácrina sendo um potencial biomarcador preditivo e/ou prognóstico no câncer (TODOROVIĆ-RAKOVIĆ e MILOVANOVIĆ 2013).

A IL-8 também tem propriedades em causar maior permeabilização vascular, recrutamento de células supressoras derivadas da medula e maior capacidade de invasão (ALFARO et al. 2016). Níveis séricos elevados de IL-8 foram descritos em pacientes com câncer de mama em estágio avançado e com acometimento axilar (MA et al. 2017). Em nosso estudo, observamos que níveis mais elevados de IL-8 foram encontrados nas pacientes com câncer (RC e RP) com relação aos controles. E assim, os níveis mais elevados da IL-8 poderiam estar relacionados a um pior prognóstico

A citocina IL-8 está presente nos processos inflamatórios agudos e crônicos, sendo responsável pela migração de neutrófilos. A produção de IL-8 pelas células tumorais promove a progressão do tumor através de vias de sinalização autócrinas,



sendo um fator promotor de angiogênese e invasão celular. Além disso, IL-8 induz uma infiltração quimiotática de neutrófilos no microambiente tumoral e a liberação de fatores de crescimento para os TAMs (WAUGH e WILSON 2008).

A IL-1 β também tem sido avaliada como mediador na progressão e metastatização no câncer de mama. Estudo em modelo animal demonstrou que a ativação da IL-1 β induz a produção de MMP- 9 com aumento da invasão tumoral (MON et al. 2017). Em nosso estudo, os níveis de IL-1 β foram mais elevados em pacientes com RP, e não houve diferenças significativas nas análises dessa citocina com relação as características do tumor primário e *status* axilar, o que sugere que a IL-1 β pode ter potencial como bom indicador para predizer resposta a QT neo no CMTN.

Em discordância com os nossos resultados, WU et al. em 2018 mostraram níveis elevados de IL-1 β em tumores T4 e com maior acometimento linfonodal, assim como em tumores com invasão de pele e parede torácica, sugerindo ser um bom alvo para bloqueio. Outro trabalho, também mostrou uma associação entre níveis elevados de IL-1 β , no microambiente de tumores de mama receptores de estrógeno positivo, e a resistência a terapia endócrina (JIMÉNEZ-GARDUÑO et al. 2017).

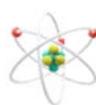
A IL-10 é uma citocina cujo papel como fator prognóstico no câncer de mama ainda não está muito claro. Estudo publicado em 2017 na população chinesa mostrou aumento na concentração de IL-10 nas pacientes com tumor de mama avançado com relação aos controles e uma redução nas concentrações de IL-10 nas pacientes que tiveram uma boa resposta ao tratamento (WANG e YANG 2017). Porém, o papel da IL-10 no câncer é controverso, ela pode ter funções pró e antitumoral, dificultando a interpretação do seu papel no câncer de mama (HAMIDULLAH, CHANGKIJA e KONWAR 2012). Em nosso estudo, observamos níveis elevados de IL-10 nas



pacientes com tumores mais avançados e com acometimento linfonodal N2. O mesmo foi observado nas análises entre RC e RP, mostrando que antes do tratamento, as pacientes que apresentam níveis elevados de IL-10 tiveram um pior prognóstico, pois obtiveram uma resposta patológica parcial à QT neo. Na fase crônica da resposta inflamatória, ocorre uma maior diferenciação de macrófago tipo M2 que são responsáveis por aumento de produção de IL-10, sendo uma citocina de imunossupressão da resposta imune, favorecendo a progressão da doença. Macrófagos M2 secretam IL-10, prostaglandina E2 e arginase interferindo na ativação e função das células T. Os macrófagos associados às células tumorais podem promover o crescimento tumoral pela alteração do microambiente tecidual e supressão da resposta das células T (LASKIN 2009).

Existem duas populações de macrófagos (M1 e M2), sendo a diferenciação de macrófagos para uma ou outra depende da fase da resposta inflamatória, da quantidade e tipo de antígenos e, principalmente do *background* do indivíduo. A população M1 tem funções antitumorais, e sua ativação parece acontecer pela apresentação de antígenos tumorais por essas células no contexto de moléculas MHC classe II para os linfócitos T efetores, o que leva a liberação de IFN γ , e com isso mais ativação e diferenciação de macrófagos M1 (LASKIN 2009). O mecanismo de destruição das células tumorais é realizado pela liberação de enzimas lisossômicas, de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico por células fagocíticas M1 (LASKIN 2009).

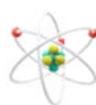
O TNF- α é outra citocina que vem sendo estudada no microambiente tumoral e estudo publicado em 2017, demonstrou que um *feedback* importante entre o TNF- α e a oncoproteína *Hepatitis B virus X-interacting protein* (HBXIP) induzia o crescimento das células tumorais de mama em cultura celular (CAI et al. 2017). MA



et al. em 2017 relataram que mulheres com CM estágio III apresentavam níveis elevados de TNF- α com relação aos controles saudáveis, como também níveis de TNF α mais elevados nas pacientes com metástases comparado ao grupo sem metástases (MA et al. 2017). Os dados desses autores corroboram o que foi observado no nosso estudo, pois as pacientes com níveis elevados TNF- α apresentavam maior acometimento axilar (N2), como também o grupo de pacientes que não responderam bem ao tratamento neoadjuvante, isto é, aquelas com resposta patológica parcial.

As análises de citocinas IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10 e TNF- α no CMTN localmente avançada neste estudo mostraram que os níveis encontrados foram coerentes com uma doença crônica e em estágio avançado. Como essas citocinas podem apresentar alterações em qualquer processo inflamatório, independentemente do tipo antigênico e por serem mediadores produzidos na resposta imune inata e não terem especificidade, não podemos afirmar com convicção que essas citocinas são potenciais biomarcadores de prognóstico no CMTN, apesar de termos resultados bem interessantes no que diz respeito a predição de resposta a QT neo, pois o grupo de pacientes com RP apresentou níveis elevados dessas citocinas antes do início da QT neo. Diante disso, resolvemos estudar mediadores mais específicos da resposta imune celular antitumoral por serem potenciais alvos terapêuticos, com 4-1BB e TIM-3. Esses mediadores apresentam funções diferentes, um está envolvido na ativação da resposta imune e outro, na supressão, respectivamente.

Em 2002, MARTINET et al. demonstraram em modelo animal que o uso de um agonista, uma proteína com propriedade de se ligar ao receptor 4-1BB na superfície celular e promover ativação de linfócitos T, levou à regressão e/ou estabilização de metástases hepáticas. Em nosso estudo, observamos níveis solúveis elevados de 4-1BB



nas pacientes com RC quando comparado aos níveis obtidos nos grupos com RP e controle. As moléculas de 4-1BB solúvel são produzidas por *splincing* alternativo durante as interações dos receptores 4-1BB presentes na superfície de linfócitos T ativados com o seus ligantes (4-1BBL) expressos na membrana de células dendríticas e macrófagos. Isso significa que quanto maior for o número de interações celulares via 4-1BB/4-1BBL, maior a liberação de 4-1BB na sua forma solúvel. Uma forma de promover a regulação da resposta imune, ao mesmo tempo que ocorre a ativação intensa dos linfócitos T, é visto quando a forma livre do s4-1BB ocupa a fenda do ligante de 4-1BB (4-1BBL) nas células dendríticas, impedindo a exacerbação da resposta inflamatória, com produção de elevados níveis de mediadores inespecíficos que podem ter ação anti ou pró-tumoral, a depender do microambiente tumoral e background do indivíduo (HARAO et al. 2017).

Por sua vez, esses autores demonstraram *in vitro* que o uso de anticorpo agonista do 4-1BB em cultura de células do infiltrado do tumor triplo negativo promoveu um aumento de proliferação e diferenciação de linfócitos TCD8+ citotóxicos, e sugerem que a imunoterapia com anticorpos agonistas do 4-1BB no CMTN possa ser uma nova abordagem terapêutica para esse subtipo de CM (HARAO et al. 2017).

Num estudo de fase 1, utilizando anticorpo agonista do 4-1BB em pacientes com câncer avançado, foi observado aumento quantitativo e funcional de células T e NK, com inibição do crescimento tumoral, além disso houve boa tolerabilidade à droga e doença estável em 22% dos pacientes (SEGAL et al. 2014).

Neste estudo, os níveis elevados de s4-1BB no grupo de CMTN que obtiveram resposta patológica completa foi associado ao fato de não sido evidenciado diferenças



significativas dos seus níveis entre os grupos T2-T3 vs T4, e status linfonodal N0, N1 e N2 e as dosagens foram realizadas no sangue das pacientes antes da realização da QT neo. Porém, quando avaliamos sTIM-3, observamos níveis mais elevados em ambos os grupos com RC e RP com relação aos controles, e independe do tipo de resposta a QT neo. Níveis elevados de TIM-3 são esperados em processos inflamatórios crônicos, onde a exposição contínua aos antígenos pode levar a “exaustão” de linfócitos T com aumento de expressão de TIM-3, logo que a ativação da resposta imune induz a expressão de mecanismos de imunossupressão (FREEMAN et al. 2010).

Os dados obtidos das dosagens dos níveis solúveis de s4-1BB e sTIM-3 nas pacientes CMTN antes da QT neo nos faz hipotetizar que somente o s4-1BB possa ser um possível biomarcador preditivo de resposta a QT neo e um bom alvo terapêutico para CMTN, corroborando o estudo de HARAO et al. (2017). Para isso, faz-se necessário outros tipos de análises, como verificar a expressão de 4-1BB na membrana de linfócitos T no sangue e tecido tumoral, além da validação do método de análise utilizado para dosagem de s4-1BB quanto a sua especificidade e sensibilidade, com também na sua replicabilidade num grupo maior de pacientes.

No entanto, as análises da sobrevida livre de doença das pacientes com CMTN, utilizando como ponto de corte a mediana dos níveis de s4-1BB e sTIM-3 dosados no sangue coletado após a quimioterapia neoadjuvante e antes do procedimento cirúrgico, mostraram que o grupo de pacientes com níveis solúveis sTIM-3 igual ou acima a 2876 pg/mL apresentaram maior risco de recidiva da doença no seguimento de 24 meses. Não foi observada diferença estatística na SLD entre os grupos que obtiveram níveis de s4-1BB abaixo ou acima da mediana. Isso sugere que a expressão da forma livre no



plasma de TIM-3 possa ser um bom indicador de risco de recidiva loco-regional e metástases a distância no CMTN. GE et al. (2017) mostraram níveis séricos elevados do sTIM-3 em osteossarcoma maiores, em estágio mais avançado e metastático, enquanto níveis reduzidos de sTIM-3 foram encontrados no sangue de pacientes com tumores benignos, e nos indivíduos controle. Vários estudos têm demonstrado a relação da expressão de sTIM-3 com pior prognóstico, e que o bloqueio com anticorpo monoclonal da via TIM-3/galectina 9 restabelece a atividade de células T antitumoral (SAKUIISHI et al. 2010; GAO et al. 2012; YANG et al. 2012).

Há poucos estudos na literatura, avaliando biomarcadores do SI no sangue periférico que possam prever resposta a QT neo, temos alguns trabalhos que avaliam os mediadores com fator prognóstico e como exemplo temos a avaliação do TIL no estroma tumoral. A análise do infiltrado linfocitário tumoral como fator preditivo de resposta a QT foi descrito em meta-análise que englobou 6 estudos, onde foi demonstrado que infiltrado de linfócitos > 60% no estroma foi associado a melhor sobrevida livre de doença (DENKET et al. 2017). Esse outro estudo também demonstrou que alto níveis de TIL pré QT neo em pacientes com câncer de mama HER-2 estariam relacionados a resposta patológica completa e que o TILs pós QT neo na doença residual seria um novo marcador de prognóstico e de estratificação de risco para sobrevida a longo prazo (HWANG et al. 2019).

A limitação deste estudo foi o pequeno tamanho da amostra, e por se tratar de estudo exploratório, também não foi realizado cálculo amostral. Apesar disso, foi possível identificar que algumas das pacientes têm um *background* de resposta melhor e isso pode ser observado pelo perfil de produção de mediadores inflamatórios antes da QT neo, estando associado a um melhor desfecho clínico.



Em relação aos dados obtidos das análises de sTIM-3 e o s4-1BB, observa-se um potencial dessas proteínas como novas abordagens de tratamento no CMTN, de forma isolada ou combinada. As pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com RC apresentam um melhor prognóstico, com sobrevida livre de recorrência superior a 90% em 10 anos (KUERER et al. 1998). Com o surgimento de novas drogas e terapias alvo associadas, houve um aumento nas taxas de RC em torno de 60% ou mais no CMTN e HER-2 que se submeteram a QT neo, sendo um fator preditivo de SLD e sobrevida global (SG) (CORTAZAR et al 2014). Cerca de 94 % das pacientes com CMTN submetidos a QT neo com RC tiveram SLD em 5 anos, e 86% em 10 anos (SYMMANS et al. 2017).

Devido à complexidade da resposta imune, heterogeneidade do tumor e a diversidade no repertório linfocitário das pacientes, é improvável que um único biomarcador seja suficiente para prever bons resultados clínicos em resposta ao espectro de opções de imunoterapias. A principal vantagem de estudar proteínas livres secretadas pelos componentes do sistema imune no sangue é a facilidade da coleta de material biológico, ou seja método pouco invasivo, além de ser possível avaliar essas proteínas em vários momentos da doença.

Apesar dos resultados promissores que obtivemos neste estudo, ainda são necessárias várias etapas para afirmar que as moléculas s4-1BB e sTIM-3 são forte candidatos a biomarcadores, pois é necessário demonstrar sua validação, para poderem ser usados nas decisões de tratamento na prática clínica. A descoberta e avaliação de biomarcadores usando tecnologias de ponta em diferentes estudos clínicos é uma etapa fundamental para maximizar a geração de dados. Os esforços colaborativos para aumentar número de amostras estudadas combinados a realização de ensaios clínicos

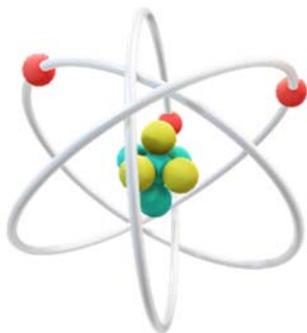


fortalecerão os resultados encontrados neste estudo, como também a importância dessas moléculas como biomarcadores no CMTN.

Apesar de termos resultados importantes com as análises das citocinas, a nossa interpretação é que elas não devem ser rotuladas como biomarcadores de prognóstico com base no nosso estudo por serem mediadores inespecíficos, talvez uma melhor correlação possa ser feita com relação a níveis mais elevados das citocinas e a resposta parcial a QT neo. Já nas análises do 4-1BB e do TIM-3 observamos que parecem ser potenciais alvos terapêuticos no CMTN localmente avançado por estarem associados ao desfecho clínico da doença. A molécula s4-1BB se mostrou ser bom indicador preditivo de resposta a QT neo, enquanto elevação a de sTIM-3 mostrou estar associada ao risco de recidiva loco-regional e metástases à distância. Então, foi possível encontrar níveis detectáveis de checkpoint da resposta imune no sangue de mulheres com CM avançado, e com fator facilitador teríamos a fato da coleta ser um procedimento menos invasivo e fácil de realizar em diferentes estádios da doença.

A maior agressividade e o pior prognóstico dos CMTN aumentam a necessidade de buscar alternativas no tratamento, já que na maioria das vezes, a única opção terapêutica é quimioterapia padrão, diferentemente dos tumores receptores hormonais positivos que tem como alternativa de tratamento a hormonioterapia ou dos tumores HER-2 que também têm terapias alvo. Então, o melhor entendimento do funcionamento do sistema imune no câncer pode nos ajudar a identificar novas terapias com um desfecho clínico favorável na maioria dos pacientes, sobretudo naqueles que tem doença avançada.





CONCLUSÕES

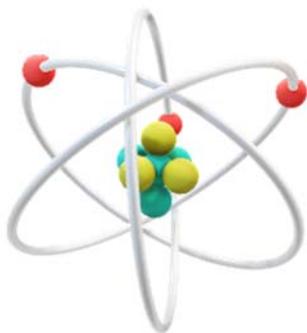


7 CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo foi possível concluir:

- Os níveis séricos dos mediadores inflamatórios solúveis sTIM-3, s4-1BB, e de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e IL-10) foram detectados de forma satisfatória no sangue periférico das pacientes com CMTN por ELISA e CBA, sendo compatível com uma doença crônica e em estágio avançado;
- Observamos níveis mais elevados de IL-6 e de IL10 no grupo de pacientes T4 com relação ao grupo T2-T3. Níveis séricos mais elevados de IL-6, IL8, IL10 e TNF- α no grupo de pacientes com *status* linfonodal N2 em relação a N0 e N1. Não houve diferença nas concentrações de IL-1 β , sTIM-3, s4-1BB com relação classificação do T e do *status* linfonodal;
- Os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α foram elevados no grupo de pacientes com RP quando comparado aos grupos RC e controles. Com relação aos níveis de IL-8 e sTIM-3, os grupos de pacientes RC e RP apresentaram níveis elevados quando comparados aos controles. Níveis mais elevados de s4-1BB também foram encontrados nas pacientes com RC em relação as pacientes com RP e aos controles;
- Não houve diferença significativa nos valores percentuais de sobrevida livre de doença em 24 meses entre os grupos de pacientes com níveis de s4-1BB abaixo ou acima da mediana. Porém, a sobrevida livre de doença em 24 meses foi maior no grupo das pacientes com sTIM-3 abaixo da mediana e menor no grupo acima da mediana.





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Aziz AK, Saadeldin MK, D'Amico P, et al. Preclinical models of breast cancer: Two-way shuttles for immune checkpoint inhibitors from and to patient bedside. **Eur J Cancer** 2019; 122:22-41.

Alfaro C, Teijeira A, Oñate C, et al. Tumor-produced interleukin-8 attracts human myeloid-derived suppressor cells and elicits extrusion of neutrophil extracellular traps (NETs). **Clin Cancer Res** 2016; 22:3924-36.

Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. **AJCC cancer staging manual**. 8th ed. New York: Springer; 2017. Breast; p.589-630.

Anderson AC. Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape. **Cancer Immunol Res** 2014; 2:393-8.

Angelo LS, Kurzrock R. Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2825-30.

Ankathatti Munegowda M, Deng Y, Mulligan SJ, Xiang J. Th17 and Th17-stimulated CD8⁺ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. **Cancer Immunol Immunother** 2011; 60:1473-84.

Apte RN, Dotan S, Elkabets M, et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer Metastasis Rev** 2006; 25:387-408.

Arai Y, Saito H, Ikeguchi M. Upregulation of TIM-3 and PD-1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with dysfunction of cell-mediated immunity after colorectal cancer operation. **Yonago Acta Med** 2012; 55:1-9.



Bartmann C, Wischnewsky M, Stüber T, et al. Pattern of metastatic spread and subcategories of breast cancer. **Arch Gynecol Obstet** 2017; 295:211-23.

Bhattacharjee HK, Bansal VK, Nepal B, Srivastava S, Dinda AK, Misra MC. Is interleukin 10 (IL10) expression in breast cancer a marker of poor prognosis? **Indian J Surg Oncol** 2016; 7:320-5.

Bobrie A, Krumeich S, Reyal F, et al. Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. **Cancer Res** 2012; 72:4920-30.

Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. **Ann Oncol** 2012; 23 Suppl 6:vi7-12.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cell Signal** 2012; 24:1297-305.

Cai X, Cao C, Li J, et al. Inflammatory factor TNF- α promotes the growth of breast cancer via the positive feedback loop of TNFR1/NF- κ B (and/or p38) /p-STAT3/HBXIP/TNFR1. **Oncotarget** 2017; 8:58338-52.

Cancer Net. **Breast cancer: statistics**. Approved by the Cancer.Net Editorial Board, 01/2020. Available from: <URL:<https://bit.ly/2y8tJSk>>. [2020 jan 12]

Castillo-García M, Chevalier M, Garayoa J, Rodriguez-Ruiz A, García-Pinto D, Valverde J. Automated breast density computation in digital mammography and digital breast tomosynthesis: influence on mean glandular dose and BIRADS density categorization. **Acad Radiol** 2017; 24:802-810.



Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **J Exp Med** 1996; 184:747-52.

Chang HR, Glaspy J, Allison MA, et al. Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel and carboplatin-based neoadjuvant treatment. **Cancer** 2010 116:4227-37.

Chaudhary LN, Wilkinson KH, Kong A. Triple-negative breast cancer: who should receive neoadjuvant chemotherapy? **Surg Oncol Clin N Am** 2018; 27:141-53.

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity** 2013; 39:1-10.

Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nat Rev Immunol** 2013; 13:227-42.

Cho JH, Park JM, Park HS, Park S, Kim SI, Park BW. Oncologic safety of breast-conserving surgery compared to mastectomy in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. **J Surg Oncol** 2013; 108:531-6.

Cho YA, Sung MK, Yeon JY, Ro J, Kim J. Prognostic role of interleukin-6, interleukin-8, and leptin levels according to breast cancer subtype. **Cancer Res Treat** 2013; 45:210-9.

Colditz GA, Bohlke K. Priorities for the primary prevention of breast cancer: review. **CA Cancer J Clin** 2014; 64:186-94.

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.



Darcy PK, Neeson P, Yong CS, Kershaw MH. Manipulating immune cells for adoptive immunotherapy of cancer. **Curr Opin Immunol** 2014; 27:46-52.

DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discov** 2011; 1:54-67.

Denket 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 KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4429-34.

Dimberg J, Hugander A, Wagsater D. Expression of CD137 and CD137 ligand in colorectal cancer patients. **Oncol Rep** 2006; 15:1197-200.

Dominguez C, McCampbell KK, David JM, Palena C. Neutralization of IL-8 decreases tumor PMN-MDSCs and reduces mesenchymalization of claudin-low triple-negative breast cancer. **JCI Insight** 2017; 2:e94296.

Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. **Physiol Rev** 2019; 99:115-60.

Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:11-22.

Erdman SE, Sohn JJ, Rao VP, et al. CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. **Cancer Res** 2005; 65:3998-4004.



Esserman LJ, Berry DA, DeMichele A, et al. Pathologic complete response predicts recurrence-free survival more effectively by cancer subset: results from the I-SPY 1 TRIAL--CALGB 150007/150012, ACRIN 6657. **J Clin Oncol** 2012; 30:3242-9.

Evans DG, Howell A. Breast cancer risk-assessment models. **Breast Cancer Res** 2007; 9:213.

FDA-NIH Biomarker Working Group. **BEST (Biomarkers, Endpoints, and other Tools) Resource**. Bethesda: National Institutes of Health (US); 2016. Available from: <URL:<https://bit.ly/39X48ZK>>. [2020 jan 12]

Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. **J Exp Med** 2010; 207:2175-86.

Franciszkiwicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadière C, Mami-Chouaib F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. **Cancer Res** 2012; 72:6325-32.

Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. **Immunol Rev** 2010; 235:172-89.

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

Gao X, Zhu Y, Li G, et al. TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. **PLoS One** 2012;7:e30676.

Gallois A, Bhardwaj N. Dendritic cell-targeted approaches to modulate immune dysfunction in the tumor microenvironment. **Front Immunol** 2013; 4:436.



Ge W, Li J, Fan W, Xu D, Sun S. Tim-3 as a diagnostic and prognostic biomarker of osteosarcoma. **Tumour Biol** 2017; 39:1010428317715643.

Geng Y, Chandrasekaran S, Hsu JW, Gidwani M, Hughes AD, King MR. Phenotypic switch in blood: effects of pro-inflammatory cytokines on breast cancer cell aggregation and adhesion. **PLoS One** 2013; 8:e54959.

Gerrard TL, Cohen DJ, Kaplan AM. Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. **J Natl Cancer Inst** 1981; 66:483-8.

Giacchetti S, Porcher R, Lehmann-Che J, et al. Long-term survival of advanced triple-negative breast cancers with a dose-intense cyclophosphamide/ anthracycline neoadjuvant regimen. **Br J Cancer** 2014; 110:1413-9.

Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes Dev** 2000; 14:1693-711.

Golden-Mason L, Waasdorp Hurtado CE, Cheng L, Rosen HR. Hepatitis C viral infection is associated with activated cytolytic natural killer cells expressing high levels of T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3. **Clin Immunol** 2015; 158:114-25.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol** 2013; 24:2206-23.

Goldszmid RS, Dzutsev A, Trinchieri G. Host immune response to infection and cancer: unexpected commonalities. **Cell Host Microbe** 2014; 15:295-305.

Grivnickov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 2010; 140:883-99.



Halama N, Braun M, Kahlert C, et al. Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. **Clin Cancer Res** 2011; 17:678-89.

Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 133:11-21.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell** 2012; 21:309-22.

Harao M, Forget MA, Roszik J, et al. 4-1BB-enhanced expansion of CD8+ TIL from triple-negative breast cancer unveils mutation-specific CD8+ T cells. **Cancer Immunol Res** 2017; 5:439-45.

Heon EK, Wulan H, Macdonald LP, et al. IL-15 induces strong but short-lived tumor-infiltrating CD8 T cell responses through the regulation of Tim-3 in breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2015; 464:360-6.

Holen I, Lefley DV, Francis SE, et al. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. **Oncotarget** 2016; 7:75571-84.

Hoos A. Development of immuno-oncology drugs - from CTLA4 to PD1 to the next generations. **Nat Rev Drug Discov** 2016; 15:235-47.

Hwang HW, Jung H, Hyeon J, et al. A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2019; 173:255-66.



Jiménez-Garduño AM, Mendoza-Rodríguez MG, Urrutia-Cabrera D, et al. IL-1 β induced methylation of the estrogen receptor ER α gene correlates with EMT and chemoresistance in breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2017; 490:780-5.

Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. **Nat Rev Clin Oncol** 2016; 13:273-90.

Kim JD, Kim CH, Kwon BS. Regulation of mouse 4-1BB expression: multiple promoter usages and a splice variant. **Mol Cell** 2011; 31:141-9.

Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. **Nat Rev Immunol** 2015; 15:73-86.

Koyama S, Akbay EA, Li YY, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. **Nat Commun** 2016; 7:10501.

Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **JAMA** 2017; 317:2402-16.

Kuerer HM, Newman LA, Buzdar AU, et al. Pathologic tumor response in the breast following neoadjuvant chemotherapy predicts axillary lymph node status. **Cancer J Sci Am** 1998; 4:230-6.

Kursunel MA, Esendagli G. A Co-Inhibitory Alliance in Myeloid Leukemia:TIM-3/galectin-9 complex as a new target for checkpoint blockade therapy. **EBioMedicine** 2017; 23:6-7.



Labiano S, Palazón A, Bolaños E, et al. Hypoxia-induced soluble CD137 in malignant cells blocks CD137L-costimulation as an immune escape mechanism. **Oncoimmunology** 2015; 5:e1062967.

Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **J Immunol Res** 2014; 2014:149185.

Laskin DL. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. **Chem Res Toxicol** 2009; 22:1376-85.

Levin R, Grinstein S, Schlam D. Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1851:805-23.

Li X, Lu P, Li B, et al. Interleukin 2 and interleukin 10 function synergistically to promote CD8⁺T cell cytotoxicity, which is suppressed by regulatory T cells in breast cancer. **Int J Biochem Cell Biol** 2017; 87:1-7.

Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. **Semin Immunol** 2009; 21:265-72.

Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, Wu CJ, Ji YH, Xu J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. **Adv Clin Exp Med** 2017; 26:421-6.

Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. **Nat Rev Drug Discov** 2015; 14:561-84.

Makkouk A, Chester C, Kohrt HE. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. **Eur J Cancer** 2016; 54:112-9.

Markman JL, Shiao SL. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. **J Gastrointest Oncol** 2015; 6:208-23.



Martinet O, Divino CM, Zang Y, et al. T cell activation with systemic agonistic antibody versus local 4-1BB ligand gene delivery combined with interleukin-12 eradicate liver metastases of breast cancer. **Gene Ther** 2002; 9:786-92.

Martínez-Reza I, Díaz L, García-Becerra R. Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. **J Biomed Sci** 2017; 24:90.

Martins LC, Rezende RMD, Cordeiro JABL, et al. Padrão de metástases no câncer de mama triplo negativo. **Rev Bras Mastol** 2017; 27:8-14.

Matsuzaki J, Gnjatich S, Mhaweche-Fauceglia P, et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:7875-80.

Mazzucchelli R, Colanzi P, Pomante R, Muzzonigro G, Montironi R. Prostate tissue and serum markers. **Adv Clin Path.** 2000 Jul;4(3):111-20.

McIntire RH, Morales PJ, Petroff MG, Colonna M, Hunt JS. Recombinant HLA-G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF-beta1. **J Leukoc Biol** 2004; 76:1220-8.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. **N Engl J Med** 2000; 343:338-44.

Melero I, Gaudernack G, Gerritsen W, et al. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. **Nat Rev Clin Oncol** 2014; 11:509-24.

Mieog JS, van der Hage JA, van de Velde CJ. Neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer. **Br J Surg** 2007; 94:1189-200.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro; INCA: 2019.



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.

Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. **Cytokine Growth Factor Rev** 2004; 15:61-76.

Mon NN, Senga T, Ito S. Interleukin-1 β activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells. **Oncol Lett** 2017; 13:955-60.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** 2002; 23:549-55.

Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. **Nat Rev Clin Oncol** 2017; 14:399-416.

Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. **Front Immunol** 2013; 4:129.

Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity** 2014; 41:49-61.

Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. **Future Oncol** 2012; 8:713-22.

Pardoll D. T cells take aim at cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:15840-2.



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

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

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell** 2010; 141:39-51.

Qian BZ, Zhang H, Li J, et al. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. **J Exp Med** 2015; 212:1433-48.

Rabinovich A, Medina L, Piura B, et al. Regulation of ovarian carcinoma SKOV-3 cell proliferation and secretion of MMPs by autocrine IL-6. **Anticancer Res** 2007; 27:267-72.

Raghunathachar Sahana K, Akila P, Prashant V, Sharath Chandra B, Nataraj Suma M. Quantitation of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in different stages of breast cancer. **Rep Biochem Mol Biol** 2017; 6:33-9.

Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. **J Clin Oncol** 2008; 26:778-85.

Reddy SM, Barcenas CH, Sinha AK, et al. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. **Br J Cancer** 2018; 118:17-23.



Ren F, Tang R, Zhang X, et al. Overexpression of MMP family members functions as prognostic biomarker for breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2015; 10:e013554.

Ruibal Morell A. CEA serum levels in non-neoplastic disease. **Int J Biol Markers** 1992; 7:160-6.

Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. **Nat Immunol** 2003; 4:1102-10.

Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. **Nat Immunol** 2003; 4:1093-101.

Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. **J Exp Med** 2010; 207:2187-94.

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.

Schmied S, Gostick E, Price DA, Abken H, Assenmacher M, Richter A. Analysis of the functional WT1-specific T-cell repertoire in healthy donors reveals a discrepancy between CD4(+) and CD8(+) memory formation. **Immunology** 2015; 145:558-69.

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



Segal NH, Gopal AK, Bhatia S, et al. A phase 1 study of PF-05082566 (anti-4-1BB) in patients with advanced cancer. **J Clin Oncol** 2014; 32(Suppl. 15):3007. Presented at the 2014 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology May 30 - June 03, 2014; Chicago, Illinois].

Shao Z, Sun F, Koh DR, Schwarz H. Characterisation of soluble murine CD137 and its association with systemic lupus. **Mol Immunol** 2008; 45:3990-9.

Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. **Science** 2015; 348:56-61.

Shin DS, Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? **Curr Opin Immunol** 2015; 33:23-35.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. **CA Cancer J Clin** 2020; 70:7-30.

Sikaris KA. CA125--a test with a change of heart. **Heart Lung Circ** 2011; 20:634-40.

Stankov A, Bargallo-Rocha JE, Silvio AÑ, Ramirez MT, Stankova-Ninova K, Meneses-Garcia A. Prognostic factors and recurrence in breast cancer: experience at the national cancer institute of Mexico. **ISRN Oncol** 2012; 2012:825258.

Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **J Immunother Cancer** 2016; 4:59.

Sun Q, Burton RL, Lucas KG. Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. **Blood** 2002; 99:3302-9.

Suzuki S, Ishida T, Yoshikawa K, Ueda R. Current status of immunotherapy. **Jpn J Clin Oncol** 2016; 46:191-203.



Symmans WF, Wei C, Gould R, et al. Long-term prognostic risk after neoadjuvant chemotherapy associated with residual cancer burden and breast cancer subtype. **J Clin Oncol** 2017; 35:1049-60.

Todorović-Raković N, Milovanović J. Interleukin-8 in breast cancer progression. **J Interferon Cytokine Res** 2013; 33:563-70.

Untch M, von Minckwitz G. Neoadjuvant treatment of breast cancer. **Breast Care** (Basel) 2011; 6:417.

Vinay DS, Cha K, Kwon BS. Dual immunoregulatory pathways of 4-1BB signaling. **J Mol Med** (Berl) 2006; 84:726-36.

Walker RA, Hanby A, Pinder SE, Thomas J, Ellis IO. Current issues in diagnostic breast pathology. **J Clin Pathol** 2012; 65:771-85.

Wang H, Yang X. Association between serum cytokines and progression of breast cancer in Chinese population. **Medicine** (Baltimore) 2017; 96:e8840.

Ward-Kavanagh LK, Lin WW, Šedý JR, Ware CF. The TNF receptor superfamily in co-stimulating and co-inhibitory responses. **Immunity** 2016; 44:1005-19.

Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:6735-41.

[WHO] World Health Organization. **Breast tumours**. 5th ed. Lyon: IARC; 2019. (WHO Classification of Tumours Editorial Board)

Wong RM, Cameron RB. Immune checkpoint blockade and adaptive immune resistance in cancer. In: Metodiev K, editor. **Immunotherapy. myths, reality, ideas**. Bulgaria: Medical University of Varna; 2017.



Wu TC, Xu K, Martinek J, et al. IL1 Receptor antagonist controls transcriptional signature of inflammation in patients with metastatic breast Cancer. **Cancer Res** 2018; 78:5243-58.

Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. **J Clin Invest** 2012; 122:1271-82.

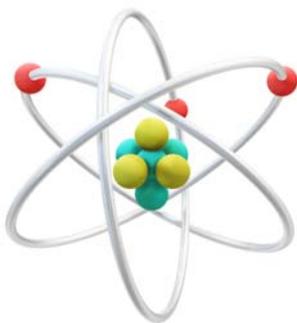
Youk JH, Kim EK, Kim MJ, et al. Missed breast cancers at US-guided core needle biopsy: how to reduce them. **Radiographics** 2007; 27:79-94.

Zamai L, Ponti C, Mirandola P, et al. NK cells and cancer. **J Immunol** 2007; 178:4011-6.

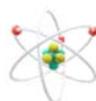
Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **Int J Biol Sci** 2011; 7:651-8.

Zhou Q, Munger ME, Veenstra RG, et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8⁺ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. **Blood** 2011; 117:4501-10.





APÊNDICES E ANEXOS



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

Uso de antibióticos ou drogas imunossupressores nos últimos 30 dias antes da coleta de sangue		
Está gestante ou lactante		
Tem neoplasia prévia, exceto pele não melanoma		
História clínica de imunodeficiências e doenças imunes		
História clínica de infecções HTLV e HIV		
História de febre e/ou outros sintomas de processo infeccioso agudo nos últimos 30 dias antes da coleta de sangue		

CONCLUSÃO: **SIM** √ **NÃO** X

Elegível		
Não elegível		

SE ELEGÍVEL, CONCORDA EM PARTICIPAR?

Sim	√	
Não	X	



Apêndice 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

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**

Gostaríamos de convidá-la a participar de nossa pesquisa.

- 1 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 imunoistoquímica 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.
- 2 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.
- 3 Os testes laboratoriais serão realizados no sangue onde estudaremos a sua imunidade e marcadores no sangue, ou no material de biópsia.
- 4 Com relação ao material de biópsia, este será processado para obter o diagnóstico ou a confirmação do mesmo além de realizar outros testes imuno-histoquímicas 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.
- 5 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
- 6 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
- 7 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.
- 8 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 Pesquisado HCP na Avenida



Cruz Cabugá 1597, Santo Amaro, Recife – PE (Telefone: 81 32178000). Horário: segunda a sexta, das 8h as 12h e das 14h as 16h.

- 9 Não serão divulgados os nomes dos pacientes ou doentes.
- 10 Os pacientes poderão ser informados dos resultados obtidos nos testes laboratoriais.
- 11 Os pacientes não terão nenhum custo pessoal durante a realização do trabalho, incluindo exames e consultas. Não haverá compensação financeira para os pacientes.
- 12 Em caso de dano físico, diretamente causado pela coleta de sangue, o participante tem direito a tratamento médico no Hospital do Câncer de Pernambuco.
- 13 CONSENTIMENTO
- 14 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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

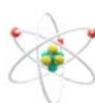
Recife, _____ de _____ 20____

(Pesquisadores responsáveis)

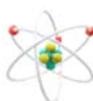


Apêndice 3 - Formulário Clínico

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	Regular	Patologias mamárias prévias Sim Não Se sim, Quais: _____
		Irregular	
Idade da Menopausa Anos	Quanto tempo	1 – 5 anos	
		6 – 10 anos Mais de 10 anos	
Apresenta histórico familiar de câncer Sim Não		Tipo de Câncer _____	Grau de parentesco _____
Dados Patológicos			
Biópsia			
Data: _____ / _____ / _____			
Tipo Histológico			
Carcinoma microinvasivo Carcinoma ductal invasivo Carcinoma invasivo do tipo não especial Carcinoma tubular Carcinoma cribriforme Carcinoma mucinoso Carcinoma lobular misto Carcinoma com características medulares (carcinoma medular, medular 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	
Imunoistoquímica			Data: _____ / _____ / _____
Receptor de Progesterona Positivo Negativo Porcentagem: _____ %	Receptor de Estrógeno Positivo Negativo Porcentagem: _____ %	HER2 +1 +2 +3	FISH Positivo Negativo
Tamanho do Tumor			
Tx T0 Tis CDIS	Paget T1 ≤ 2 cm T1 - micro-invasão	T1a > 0,1 e ≤ 0,5 cm T1b > 0,5 e ≤ 1 cm T1c > 1 e ≤ 2 cm T2 > 2 e ≤ 5 cm	T3 > 5 cm T4a - Extensão da parede do tórax T4b - edema, ulcerações ou nódulo satélite T4c - a + c T4d - inflamatório



Linfonodos Regionais		Metástase a Distância		Estadiamento	
Nx N0	N1	N2a	Mx M0 M1	IA	IIIA
		N2b		IB	IIIB
		N3a		IIA	IIIC
		N3b		IIB	IV
		N3c			
Quimioterapia					
Neoadjuvante		Sim	Não	Início: / /	Término: / /
Esquema					
AC x 4 + T (dose densa)					
Evolução					
Resposta Patológica Completa: SIM ou NÃO					
Resposta Patológica Parcial: SIM ou NÃO					
Ausência de resposta: SIM ou NÃO					
Recorrência local: SIM ou NÃO					
Recorrência à Distância: SIM ou NÃO					



Anexo 1 – Sistema TNM de classificação de tumores malignos utilizado no estadiamento das participantes desta tese (8ª EDIÇÃO) AJCC/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 (Paget's) Doença de Paget sem carcinoma invasivo e/ou in situ.

T1 – Tumor ≤ 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 ≤ 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 acometendo o músculo peitoral e sem acometer parede torácica;
- T4b – Edema ou ulceração da pele ou nódulos satélites confinados à mama (inclui pele de laranja) sem critérios para carcinoma inflamatório
- 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 móveis

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
	T2	N0	M0
ESTADIO IIB	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 dos Comitês de Ética do Hospital de Câncer de Pernambuco e do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (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 tripla 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 tripla 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

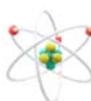
UF: PE

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

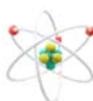
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RECIFE, 11 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)



INSTITUTO DE MEDICINA
INTEGRAL PROFESSOR
FERNANDO FIGUEIRA -



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@imip.org.br



INSTITUTO DE MEDICINA
INTEGRAL PROFESSOR
FERNANDO FIGUEIRA -



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)

