

**A.C.CAMARGO CANCER CENTER
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE**

**Identificação dos mecanismos imunorreguladores
associados à resposta à terapia neoadjuvante em
pacientes com câncer de mama triplo negativo**

Ananda Domingues Lopes

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Co-orientador: Dra. Amanda de Braga Figueiredo

São Paulo

2025

Lopes, Ananda .

Identificação dos mecanismos imunorreguladores associados à resposta à terapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama triplo negativo. / Ananda Lopes. São Paulo, 2025.

129f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Kenneth John Gollob.

1. Neoplasia de mama, 2. Resposta Imune, 3. Microambiente Neoplásico

CDU 616

Nome: Ananda Domingues Lopes

Título: Identificação dos mecanismos imunorreguladores associados à resposta à terapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

Aprovado em: 29/08/2025

Banca Examinadora

Orientador: Kenneth John Gollob

Instituição: Fundação Antonio Prudente

Membro da banca: Martin Hernan Bonamino

Instituição: A.C. Camargo Cancer Center

Membro da banca: Cristina Beatriz Cazabuena Bonorinho

Instituição: Universidade Federal de Ciências da saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Membro da banca: José Alexandre Marzagão Barbuto

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo (USP)

Membro da banca: Helano Carioca Freitas

Instituição: A.C. Camargo Cancer Center

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, através de auxílio à Pesquisa - [01/05/2023 – 29/08/2025] [2022/15384-8].

*“A ciência é o grande antídoto contra o veneno do
entusiasmo e da superstição.”*
Adam Smith

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pacientes que participaram deste estudo, e a todos aqueles que, com generosidade, contribuem para a construção da ciência. Dedico também a minha família, marido e amigos, que caminharam ao meu lado com amor, paciência e apoio nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sabedoria, saúde e pelas conquistas que vieram durante essa jornada. Obrigada por me dar perseverança nos momentos em que tudo parecia difícil demais para continuar.

À CAPES e à FAPESP, pelo apoio financeiro e pela confiança no desenvolvimento desse projeto.

Ao meu orientador, Dr. Kenneth John Gollob, minha profunda gratidão. Sua sabedoria, generosidade e dedicação foram essenciais em cada etapa deste trabalho. Obrigada por ter sido não apenas um orientador, mas um verdadeiro mentor, e por todas as oportunidades, aprendizados e pela confiança que sempre depositou em mim.

À Amanda, meu sincero agradecimento por todo o conhecimento compartilhado, pelo suporte científico constante e pelas inúmeras vezes em que me ajudou a repensar caminhos, encontrar soluções e seguir em frente com mais segurança e clareza.

Ao meu marido, companheiro desde o início dessa jornada, que abraçou meu sonho como se fosse dele. Obrigada por ser meu maior incentivador, por cada palavra de apoio, por me ajudar nos estudos e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha família, meu pai, minha mãe, meu irmão, minha avó, minhas tias, tios e às minhas primas-irmãs Heloisa e Luiza, por celebrarem cada conquista, apoiarem minhas escolhas e acreditarem em mim, sempre.

Aos parceiros de laboratório que se tornaram parceiros para a vida, Nayane e Guilherme. Obrigada pela parceira não apenas em experimentos e discussões científicas, mas por todas as risadas, ensinamento e apoio. Vocês foram parte essencial dessa trajetória.

Aos colegas do laboratório Gabriela, Stéphanie, Samara, Camila, Victória, Reysla, Raísa, João, Juliana, Kátia, Clara, Gustavo, Kalyne, Júlia e Flávio, eu agradeço por cada troca, colaboração e aprendizado compartilhado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se realizasse, o meu muito obrigada.

RESUMO

Lopes AD. **Identificação de mecanismos imunorreguladores associados à resposta à terapia neoadjuvante em pacientes com câncer de mama triplo negativo.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025.

INTRODUÇÃO: O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é um subtipo agressivo que não expressa receptores hormonais nem HER2, tornando-o insensível a terapias alvos. A quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia continua sendo o tratamento padrão, mas uma proporção substancial de pacientes não alcança a resposta patológica completa (pCR), o que está associado a piores prognósticos.

OBJETIVO: Definir as assinaturas imunes e metabólicas de respondedores e não-respondedores à quimioterapia neoadjuvante em CMTN, integrando análises sistêmicas e intratumorais com modelos pré-clínicos e validação transcriptômica.

MATERIAL E MÉTODOS: Foram avaliados 85 pacientes com CMTN submetidas à quimioterapia neoadjuvante baseada em carboplatina e taxanos, sendo 49 com pCR e 36 classificadas como não respondedores. Amostras de sangue periférico foram analisadas antes e após o tratamento para subpopulações de células imunes e mediadores solúveis por citometria de fluxo multiparamétrica e ensaios multiplex. Linfócitos infiltrantes no tumor (TILs) foram quantificados em biópsias pré-tratamento e correlacionados com parâmetros imunológicos sistêmicos. Modelos murinos de CMTN e conjuntos públicos de dados transcriptômicos de célula única foram utilizados para investigar e validar mecanismos imuno-metabólicos e sua associação com os resultados terapêuticos. **RESULTADO:** Respondedores apresentaram um perfil de ativação imune, com células T CD4+ e T CD8+ ativadas (CD69+, PD1+), equilíbrio de citocinas pró-inflamatórias e maior potencial citotóxico (Granzima B). Não respondedores exibiram inflamação desregulada, com níveis elevados de IL-10, maior frequência de células T reguladoras (Treg), aumento de checkpoints inibitórios e evidências de disfunção metabólica. Dados públicos confirmaram esses perfis imuno-metabólicos, destacando vias de exaustão imune induzida por hipóxia e supressão da função efetora das células T. Dados murinos demonstraram ainda que hipóxia e alterações no metabolismo mitocondrial prejudicam a capacidade efetora dessas células. **CONCLUSÃO:** A resistência terapêutica no CMTN está associada a uma coordenação insuficiente das respostas imunes sistêmicas e intratumorais, impulsionadas por reprogramação imuno-metabólica. A combinação de quimioterapia

com modulação imune pode melhorar os resultados do tratamento neste desafiador subtipo de câncer de mama. **PALAVRAS-CHAVE:** 1. Neoplasias da Mama. 2. Resposta Imune. 3. Microambiente Neoplásico. 5. Resposta ao tratamento. 6. Perfis de expressão Gênica.

ABSTRACT

Lopes AD. **[Identification of immunoregulatory mechanisms associated with the response to neoadjuvant therapy in triple negative breast cancer]**. [Tese]. São Paulo; Fundação Antonio Prudente;2025.

INTRODUCTION: Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive subtype lacking hormone receptors and HER2 expression, making it unresponsive to targeted therapies. Neoadjuvant chemotherapy remains the standard treatment, but a substantial proportion of patients fail to achieve pathological complete response (pCR), which is associated with worse prognoses. This study aimed to characterize systemic, and tumor immune profiles linked to treatment outcomes and to identify immunometabolic mechanisms underlying therapy resistance in TNBC.**OBJECTIVE:** To define the immune and metabolic signatures of responders and non-responder to neoadjuvant chemotherapy in TNBC, integrating systemic and intratumoral analyses with preclinical models and transcriptomic validation. **METHODS:** Eighty-five TNBC patients undergoing carboplatin and taxane based neoadjuvant chemotherapy were evaluated, with 49 achieving pCR and 36 classified as non-responders. Peripheral blood samples were analyzed before and after treatment for immune cell subpopulations and soluble mediators using multiparameters flow-cytometry and multiplex assays. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) were quantified in pre-treatment biopsies and correlated with systemic immune parameters. Murine TNBC models and public single-cell transcriptomic datasets were used to investigate and validate immune-metabolic mechanisms and their association with therapeutic outcomes. **RESULTS:** Responders exhibited an immune activation profile, with activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells (CD69⁺, PD1⁺), a balanced pro-inflammatory cytokine milieu, and enhanced cytotoxic potential (Granzyme B). Non-responders displayed dysregulated inflammation, with elevated IL-10 levels, higher frequencies of regulatory T cells (Tregs), increased inhibitory checkpoints, and evidence of metabolic dysfunction. Public datasets confirmed these immuno-metabolic profiles, highlighting hypoxia-induced immune impairment and suppression of T-cell effector function. Murine data further demonstrated that hypoxia and mitochondrial metabolic alterations compromise the effector capacity of these cells.. **CONCLUSION:** Therapeutic resistance in TNBC is associated with insufficient systemic and intratumoral immune coordination driven by immunometabolic reprogramming. Combining chemotherapy with

immune modulation may improve treatment outcomes in this challenging breast cancer subtype. **KEY WORDS:** 1. Breast neoplasms. 2. Immune response. 3. Tumor microenvironment. 4. Treatment outcome. 5. Gene expression profiling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das fases da imunoedição tumoral: eliminação, equilíbrio e escape.	5
Figura 2. Delineamento experimental do estudo.....	11
Figura 3. Número de pacientes recrutadas, incluídas e avaliadas nos tempos 1 e 2.	14
Figura 4. Análise citometria de sangue fresco.	17
Figura 5. Análise de PBMC.	19
Figura 6. Estratégia de gating para avaliação de painel de exaustão.....	24
Figura 7. Estratégia de gating para avaliação dos painéis de citocinas e fatores de transcrição.	25
Figura 8. Representação esquemática das principais vias metabólicas mitocondriais e seus respectivos inibidores utilizados na análise funcional com tecnologia Seahorse.	28
Figura 9. Mecanismo de ação da metformina sobre vias metabólicas mitocondriais	29
Figura 10. Projeção PCA da estrutura global das células de PBMC com base nos genes mais variáveis.	31
Figura 11. Projeção UMAP das células do PBMC com base nos perfis de expressão gênica.	33
Figura 12. Avaliação da presença de doublets nas amostras celulares de PBMC....	33
Figura 13. Anotação automatizada das subpopulações imunes em PBMC por CellTypist	34
Figura 14. Projeção PCA da estrutura global das células do tecido tumoral com base nos genes mais variáveis.....	36
Figura 15. Projeção UMAP das células do tecido tumoral com base nos perfis de expressão gênica.	38
Figura 16. Avaliação da presença de doublets nas amostras celulares em tecido tumoral.	38
Figura 17. Avaliação de células imunes em sangue fresco no tempo 1.....	41
Figura 18. Avaliação de células imunes no sangue fresco no tempo 1.....	41
Figura 19. Matriz de correlação entre células circulantes e fatores solúveis.....	44
Figura 20. População de células T CD4+ e TCD8+ em estímulo policlonal e antígeno específico.....	45
Figura 21. População de células imunes após estímulo policlonal.	46

Figura 22. Avaliação não supervisionada por UMAP das subpopulações de CD4+ e CD8+.....	47
Figura 23. Fatores solúveis pré-tratamento e correlações em respondedor e não respondedor.....	50
Figura 24. Matriz de correlação entre PBMC e fatores solúveis.	52
Figura 25. Nível de TILs em pacientes CMTN antes do tratamento	53
Figura 26. Correlação entre infiltrados tumorais e fatores de interesse.....	55
Figura 27 . Presença de necrose e associação com níveis de infiltrado tumoral.	56
Figura 28. Perfil solúvel pós-tratamento.....	58
Figura 29. Perfil celular pós-tratamento.....	59
Figura 30. Matriz de correlação entre células circulantes e fatores solúveis pós-tratamento.....	61
Figura 31. Revisão da análise imunometabólico em tumores murinos.	63
Figura 32. Caracterização metabólica de AT3 e E0771.....	65
Figura 33. Caracterização metabólica de AT3 e E0771.....	65
Figura 34. Avaliação do crescimento tumoral.....	66
Figura 35. Avaliação de TILs em tumores murinos.	67
Figura 36. Avaliação de TILs em tumores murinos	68
Figura 37. População de células Treg em TILs dos tumores murinos.	69
Figura 38. Avaliação da atuação dos inibidores nas linhagens tumorais em cultura.	70
Figura 39. Ensaio metabólico com metformina.	71
Figura 40. Avaliação de hipóxia em TILs.....	72
Figura 41. Tratamento com anti-PD1 e metformina.	73
Figura 42. Avaliação de sobrevida global.	74
Figura 43. Revisão da análise imunometabólico em tumores murinos.	75
Figura 44. Populações celulares identificadas no PBMC de pacientes com CMTN..	77
Figura 45. Frequência das células imunes identificadas nos grupos de pacientes. ...	78
Figura 46. Análise dos genes up-regulados e down-regulados em pacientes CMTN respondedores vs não respondedores na coorte de validação.	79
Figura 47. Análise de super-representação (do inglês Over-representation analyses - ORA) das vias em GO: Biological Process (2025).....	83
Figura 48. Análise de super-representação (do inglês Over-representation analyses - ORA) das vias em MSigDB: Hallmark (2020).	83

Figura 49. Análise dos genes up-regulados e down-regulados linfócitos T CD4+ em PBMC de pacientes CMTN respondedores vs não respondedores na coorte de validação.....	84
Figura 50. Análise exploratória da expressão gênica em células T CD8+ circulantes de pacientes com CMTN.....	85
Figura 51. Populações celulares identificadas no tecido tumoral de pacientes com CMTN.....	88
Figura 52. Análise de PCA de amostras tumorais de acordo com a resposta à terapia.	90
Figura 53. Panorama dos achados no presente estudo em pacientes respondedores.	91
Figura 54. Panorama dos achados no presente estudo em pacientes não respondedores.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painéis de anticorpo para caracterização do perfil imune celular em sangue fresco.	15
Tabela 2. Painéis de anticorpos para caracterização do perfil imune celular em PBMC.	16
Tabela 3 Painéis de anticorpos para avaliação de TILs e dLN	23
Tabela 4 Características Clínico-Patológicas de pacientes CMTN.	40
Tabela 5. Número de células identificadas por população de células imunes.	77
Tabela 6. Número de células identificadas por população de células imunes no TME.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno (do inglês antigen presenting cells)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BLBC	Câncer de mama do subtipo basal-like (do inglês basal-like breast cancer)
BRCA	Gene do cancer de mama (do inglês breast cancer gene)
BTG1	Gene 1 de Translocação em Células B (do inglês B-cell Translocation Gene 1)
CCR5	Receptor de quimiocina 5
Céls	Células
cm	Centímetro
CMTN	Cancer de mama triplo negativo
CO2	Dióxido de carbono
COX6A1	Subunidade 6A1 da Citocromo C Oxidase (do inglês Cytochrome C Oxidase Subunit 6A1)
CPT1	Carnitina palmitoiltransferase
CXCL12	Ligante de quimiocina 12
CXCR3	Receptor de quimiocina 3
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
CXCR4	Receptor de quimiocina 4
CXCR6	Receptor de quimiocina 6
DC2	Células dendríticas convencionais (do inglês conventional dendritic cells type 2)
DDIT4	Transcrito 4 Induzido por Dano ao DNA (do inglês DNA Damage-Inducible Transcript 4)
DEG	Genes diferencialmente expressos (do inglês Differentially Expressed Genes)
dLN	Linfonodo drenante (do inglês draining lymph node)
DMEM	Do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN	Células duplo negativas
DN NKT	Células NKT duplo negativas

DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)
ECAR	Taxa de acidificação extracelular (do inglês Extracellular Acidification Rate)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediaminetetraacetic acid)
FBS	Soro fetal bovino (do inglês Fetal Bovine Serum)
FCCP	Carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenil-hidrazona (do inglês Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine.)
FOXP3	do inglês Forkhead box P3
GCSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês granulocyte colony stimulating factor)
GEO	do inglês Gene Expression Omnibus
GLS1	Glutaminase
GZB	Granzima B (do inglês Granzyme B)
H&E	Hematoxilina e eosina
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (do inglês Human Epidermal growth factor Receptor 2)
HIF1α	Fator de indução de hipóxia (do inglês hypoxia inducible fator 1)
HLA-DRA	Complexo Principal de Histocompatibilidade, subunidade DR alfa (do inglês Major Histocompatibility Complex, DR Alpha)
HMGB1	Proteína de Grupo de Alta Mobilidade (do inglês High Mobility Group Box 1).
ICB	Inibidores de checkpoint imunológico (do inglês immune checkpoint bloqueador)
ICD	morte celular imunogênica (do inglês immunogenic cell death – ICD)
IFN-γ	Interferon gama (do inglês interferon gamma)
IgG	Imunoglobulina G
IGHG1	Imunoglobulina Cadeia Pesada Constante Gama 1 (do inglês Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 1)
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10

IL-12p40	Interleucina 12 subunidade 40
IL-13	Interleucina 13
IL1ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL6	Interleucina 6
IL6ST	Transdutor de Sinal da Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISG15	Gene 15 estimulado por interferon (do inglês Interferon-Stimulated Gene 15)
JAK	Janus Kinase
LAMTOR2	Adaptador endossômico/lisossomal ativador de MAPK e mTOR 2 (Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK and MTOR Activator 2)
LAMTOR4	Adaptador endossômico/lisossomal ativador de MAPK e mTOR 4 (Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK and MTOR Activator 4)
LGALS1	Galectina 1
Log	Logaritmo
MAIT	Células T invariantes derivadas da mucosa (do inglês <i>Mucosal-associated invariant</i>)
MCSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês Macrophage Colony-Stimulating Factor)
MDSC	células supressoras de origem mieloide (do inglês Myeloid-derived suppressor cells)
METABRIC	do inglês Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium
MFI	Intensidade média de fluorescência (do inglês Media Fluorescence Intensity)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês Major Histocompatibility)
min	Minuto
mL	Mililitro
μM	Micromolar
Mm²	Milímetros quadrados
Mm³	Milímetros cúbicos
MPC	Transportador mitocondrial de piruvato (do inglês Mitochondrial Pyruvate Carrier)

mPH	Milésimos de unidade de pH
mTORC1	Complexo 1 do Alvo Mecanicista da Rapamicina (do inglês mechanistic Target of Rapamycin Complex 1)
N	Número
NDUFA1	Subunidade A1 da NADH ubiquinona oxidoreductase (do inglês NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A1)
NF-κB	Fator nuclear kappa B das células B ativadas (do inglês Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)
NFKBIZ	Inibidor Zeta do Fator Nuclear Kappa B nas Células B (do inglês <i>Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells Inhibitor Zeta</i>)
NK	Assassinas naturais (do inglês natural killer)
NKT	Célula T assassina natural (do inglês <i>natural killer</i>)
nM	Nano molar
OCR	Taxa de consumo de oxigênio (do inglês Oxygen Consumption Rate)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORA	Análise de sobre-representação (do inglês Over-Representation Analysis)
OS	Sobrevida global (do inglês <i>overall survival</i>)
OXPHOS	Fosforilação oxidativa (do inglês Oxidative Phosphorylation)
Padj	Valor de p ajustado
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês Peripheral blood mononuclear cells)
PBS	do inglês Phosphate-Buffered Saline
PCA	Análise de componentes principais (do inglês Principal Component Analysis)
pCR	Resposta patológica completa (do inglês pathological complete response)
pDC	Células dendríticas plasmocitóides (do inglês Plasmacytoid Dendritic Cell)
PFA	Paraformaldeído
PGE₂	Prostaglandina E2
PIK3R1	Subunidade reguladora 1 da Fosfoinositídeo 3-Cinase (do inglês Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1)
PMA	Phorbol- 12-Miristato 13-Acetato

PSMB10	Subunidade beta 10 do proteassoma (Proteasome Subunit Beta 10)
PSMB9	Subunidade beta 9 do proteassoma (do inglês Proteasome Subunit Beta 9)
PSME2	Subunidade ativadora do proteassoma 2 (do inglês <i>Proteasome Activator Subunit 2</i>)
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RCB	Carga residual tumoral (do inglês Residual Cancer Burden)
RECIST	Crêterios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (do inglês Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)
RNA	�cido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>).
RNAm	�cido Ribonucleico mensageiro (do inglês messenger <i>Ribonucleic Acid</i>).
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA em célula única (do ingl�s single cell RNA sequencing)
SEM	Erro padrão de média (do ingl�s Standard Error of the Mean)
SESN1	Sestrina1
SRC	Capacidade Respiratória de Reserva (do ingl�s Spare Respiratory Capacity)
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição (do ingl�s Signal Transducer and Activator of Transcription 3)
STAT4	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 4 (do ingl�s Signal Transducer and Activator of Transcription 4)
T-bet	T-box expresso em células T (do inglês T-box expressed in T cells)
TCF-1	Fator de célula T1 (do inglês T Cell Factor 1)
TCGA	do inglês The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCM	Célula T memória central (do inglês central memory)
TCR��	Receptor de célula T alfa-beta. (do inglês T cell receptor alpha-beta)
TCR��	Receptor de célula T gama-delta. (do inglês T cell receptor gamma delta)
TEM	Célula T memória efetora (do inglês effector memory)
TGFBR2	Receptor II do Fator de Crescimento Transformante Beta (do inglês Transforming Growth Factor Beta Receptor II)
Th2	célula T auxiliadora do tipo 2 (do inglês T helper 2)

TILs	Linfócitos infiltrantes no tumor (do inglês tumor infiltrating lymphocytes)
TIM-3	Imunoglobulina e domínio mucina da célula T, contendo-3 (do inglês T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3)
TME	Microambiente tumoral (do inglês, tumor microenvironment)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês tumor necrosis fator alpha)
TNF-β	Fator de necrose tumoral beta (do inglês Tumor Necrosis Factor beta)
TNFAIP3	Proteína 3 Induzida por TNF- α (do inglês Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3)
TNFSF10	Membro 10 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral (Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 10)
TOX	do inglês <i>Thymocyte selection-associated high mobility group box</i>
Treg	Células T reguladoras
TRM	Célula T memória residente (do inglês resident memory)
TXNIP	Proteína Interatora da Tiorredoxina (do inglês Thioredoxin Interacting Protein)
UMAP	do inglês Uniform Manifold Approximation and Projection
UQCR10	Subunidade X da Ubiquinol-Citocromo C Redutase (Complexo III) (do inglês Ubiquinol-Cytochrome C Reductase, Complex III Subunit X)
UV	Ultravioleta
μg	Micrograma
μM	Micromolar

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
Sumário	xxii
1. Introdução	1
1.1. Câncer de mama triplo negativo	2
1.2. Sistema Imunológico e câncer	4
1.3. Perfil metabólico e sua relação com a resposta imunológica	7
2. Objetivos	9
2.1. Objetivos específicos	9
3. Materiais e Métodos	11
3.1. Delineamento do estudo	11
3.2. Avaliação de pacientes CMTN antes e após o tratamento	12
3.2.1. Recrutamento de pacientes	12
3.2.2. Resposta ao tratamento	14
3.2.3. Coleta e processamento de amostras.	14
3.2.4. Avaliação do perfil imune celular por citometria de fluxo multiparamétrica	14
3.2.5. Análise de dados de citometria de fluxo multiparamétrica	16
3.2.6. Avaliação do perfil imune solúvel	19
3.2.7. Caracterização Morfológica do Tecido Tumoral na biópsia inicial	19
3.3. Avaliação do TME em modelos murinos de CMTN.	20
3.3.1. Modelo animal	20
3.3.2. Linhagem Tumoral	21
3.3.3. Avaliação do perfil imune celular por citometria de fluxo multiparamétrica	21
3.3.4. Análise de dados – citometria de fluxo multiparamétrica	23
3.3.5. Avaliação metabólica	26
3.3.6. Avaliação funcional de vias metabólicas com inibidores mitocondriais.	27
3.3.7. Avaliação de hipóxia por pimonidazol	29
3.4. Análise de dados públicos de transcriptoma.	29

3.4.1.	Análise dos dados públicos de PBMC.....	29
3.4.2.	Análise de dados públicos de tecido tumoral de CMTN.....	35
4.	Resultados e Discussão	39
4.1.	Análise em pacientes com CMTN.....	39
4.1.1.	Caracterização clínico patológica dos pacientes.....	39
4.1.2.	Caracterização imunológica sistêmica pré-tratamento.....	40
4.1.3.	Relações entre o infiltrado linfocitário tumoral e a resposta imune periférica ...	53
4.1.4.	Caracterização imunológica sistêmica pós-tratamento	57
4.2.	Avaliação imunometabólica dos tumores murinos.....	64
4.2.1.	Caracterização das linhagens tumorais.....	64
4.2.2.	Avaliação do infiltrado imunológico nos tumores murinos.....	66
4.2.3.	Caracterização das vias bioenergéticas associadas ao perfil tumoral mais agressivo. 69	
4.3.	Análise dos dados públicos de transcriptoma de pacientes com CMTN	76
4.3.1.	Análise dos dados transcriptômicos de PBMC.....	76
4.3.2.	Análise do microambiente tumoral em tecido de pacientes com CMTN.....	87
5.	Conclusão	93
6.	Referências	94

1. Introdução

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação celular acelerada devido a falhas no controle desse crescimento(1). É responsável por aproximadamente 8 milhões de óbitos por ano em todo o mundo, sendo a segunda maior causa de morte em toda a população. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, o câncer de mama é o mais prevalente na população feminina com a estimativa de mais de 72 mil novos casos entre os anos de 2022 e 2025. Mundialmente, afeta cerca de 2 milhões de mulheres por ano, sendo responsável por 15% das mortes relacionadas ao câncer segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).

O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa. Existem subtipos com características distintas que levam a diferenças nos padrões de resposta às múltiplas terapias existentes e nos desfechos clínicos (2). Essa classificação se baseia no perfil de expressão gênica e no fenótipo dos tumores. Baseada na expressão de marcadores por imuno-histoquímica (receptores de estrógeno, progesterona, HER2 e Ki67) e na análise genômica de amplificação do gene HER2, a classificação proposta pelo Conselho Internacional de Especialistas de Saint Gallen é a mais utilizada na prática clínica(3). Dessa forma, os tumores de mama são definidos pelos critérios clínico patológicos em Luminal A, Luminal B (HER2 negativo ou positivo), hiperexpressores de HER2 e câncer de mama triplo negativo (CMTN).

Em relação à classificação intrínseca, Perou e colaboradores (2000 e 2011) avaliaram as características moleculares dos tumores mamários e subdividiram em tumores do tipo luminal A/B, superexpressores do gene HER2 e tipo basal (4,5). Os subtipos definidos clinicopatologicamente são considerados similares, mas não idênticos aos subtipos intrínsecos.

Os tumores luminais A, os mais recorrentes entre os subtipos de câncer de mama, são caracterizados pela expressão de ambos os receptores e pela ausência do proto-oncogene receptor do fator de crescimento epidérmico humano HER2. Possuem baixa proliferação celular devido ao baixo nível de Ki-67. Esse subtipo possui um melhor prognóstico e, devido à expressão de receptores hormonais, têm boa resposta aos tratamentos hormonais(6).

Com a expressão dos receptores hormonais também presente, os tumores luminais B são semelhantes ao subtipo anteriormente descrito, com a presença ou

ausência do gene HER2. Sua taxa de proliferação é mais elevada dado o alto nível de Ki-67 e apresentam um desfecho pior quando comparado ao luminal A (7).

Em relação aos tumores HER2 positivos, a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona ocorrem em até 40% dos casos e possuem um comportamento mais agressivo (8). Contudo, a terapia com trastuzumabe (anticorpo monoclonal anti-HER2) proporcionou um aumento das taxas de sobrevida (9).

1.1. Câncer de mama triplo negativo

Descrito pela primeira vez por James D. Brenton e colaboradores (9), o CMTN representa cerca de 15 a 25% dos tumores de mama, sendo a prevalência maior em mulheres afro-americanas menores de 40 anos(10). Sua denominação é devido a ausência de receptores de progesterona e estrogênio nas células tumorais e a não superexpressão do gene HER2 (11).

A maioria dos CMTN (80%) se assemelham às células basais e mioepiteliais, devido à expressão gênica das citoqueratinas 5, 14 e 17 e do EGFR, sendo, portanto, considerados tumores “basal-like” (BLBC) (12). Entretanto, não é adequado considerar esse subtipo como sinônimo de tumor basal, uma vez que as características genéticas que divergem entre eles mostram que aproximadamente 30% desse grupo não são tumores do tipo basal(11).

Dentre os fatores de risco relacionados à ocorrência de CMTN podemos citar a mutação do gene BRCA, o status pré-menopausa, obesidade, afrodescendência e a alta paridade (13,14). É considerado um tumor de alto grau com mal prognóstico devido a sua rápida progressão e altas taxas de recorrência precoce, além do fenótipo metastático com predileção para órgãos viscerais como o cérebro e o pulmão (8).

A ausência de expressão de receptores hormonais e do gene HER2 caracteriza esse subtipo tumoral como inelegível às terapias endócrinas e às terapias-alvo anti-HER2, consolidando a quimioterapia neoadjuvante como a principal estratégia terapêutica (11). Constituído por quimioterápicos como antraciclinas, ciclofosfâmidas, paclitaxel e carboplatinas, a seguir são descritos os principais mecanismos de ação de cada uma dessas classes de quimioterápicos utilizados no tratamento do CMTN.

As antraciclinas, como a doxorrubicina, são fármacos amplamente utilizados no tratamento do CMTN e atuam por múltiplos mecanismos citotóxicos. Sua principal ação consiste na ligação ao DNA e inibição da enzima topoisomerase II, essencial para o desenvolvimento e religação do DNA durante a divisão celular. Com isso, há

acúmulo de quebras de dupla hélice, levando à estabilidade genômica e morte da célula tumoral. Além disso, essas drogas geram radicais livres que causam estresse oxidativo e contribuem para o dano celular(15).

Os taxanos, como o paclitaxel, atuam interferindo na dinâmica do citoesqueleto celular. Eles estabilizam os microtúbulos, estruturas fundamentais para a separação dos cromossomos, impedindo assim a divisão celular. Essa ação é particularmente eficaz em células com alta taxa de multiplicação, como ocorre em tumores triplo-negativos. A interrupção prolongada da divisão celular pode também ativar mecanismos internos que levam à apoptose, o tipo de morte celular mais frequentemente induzido por essa classe de quimioterápicos(16).

Já as platinas, como a carboplatina, atuam diretamente sobre o DNA das células tumorais. Elas promovem a formação de ligações químicas entre as fitas do DNA, o que gera distorções estruturais que impedem a replicação e a transcrição do material genético. Diante da incapacidade de reparar esses danos, a célula ativa mecanismos de alarme que culminam na sua morte(17).

A taxa de pacientes que atingem a resposta patológica completa (pCR) após a quimioterapia neoadjuvante aproxima-se de 40 a 60%(18). Contudo, muitas pacientes que não respondem ao tratamento evoluem com metástases e piora do prognóstico clínico (19). Isso acontece, em parte, porque alguns tumores desenvolvem mecanismos de resistência que limitam a eficácia dos quimioterápicos. Entre eles, destacam-se a eliminação acelerada das drogas pelas células tumorais, alterações nos alvos das medicações e maior capacidade de reparar os danos ao DNA. Esses processos reduzem a sensibilidade ao tratamento e comprometem as chances de controle da doença(20).

Nos últimos anos, os bloqueadores de checkpoint imunológico (ICB, do inglês *immune checkpoint blockade*), consolidaram-se como um dos pilares do tratamento do CMTN, especialmente devido aos ganhos significativos em sobrevida e resposta tumoral observados em grandes ensaios clínicos. A administração desses anticorpos monoclonais, como pembrolizumabe (anti-PD1) e atezolizumabe (anti-PD-L1), permite a reativação do sistema imune e o desencadeamento de uma resposta antitumoral robusta, atuando tanto localmente no microambiente tumoral (TME, do inglês *tumor microenvironment*) quanto em nível sistêmico.

Ensaios como Keynote-355, Keynote-522 e IMpassion130 estabeleceram a eficácia da combinação de ICB com quimioterapia em diferentes fases da doença,

contribuindo para que o pembrolizumabe se tornasse a primeira imunoterapia aprovada para CMTN em contextos iniciais e metastáticos(21–23).

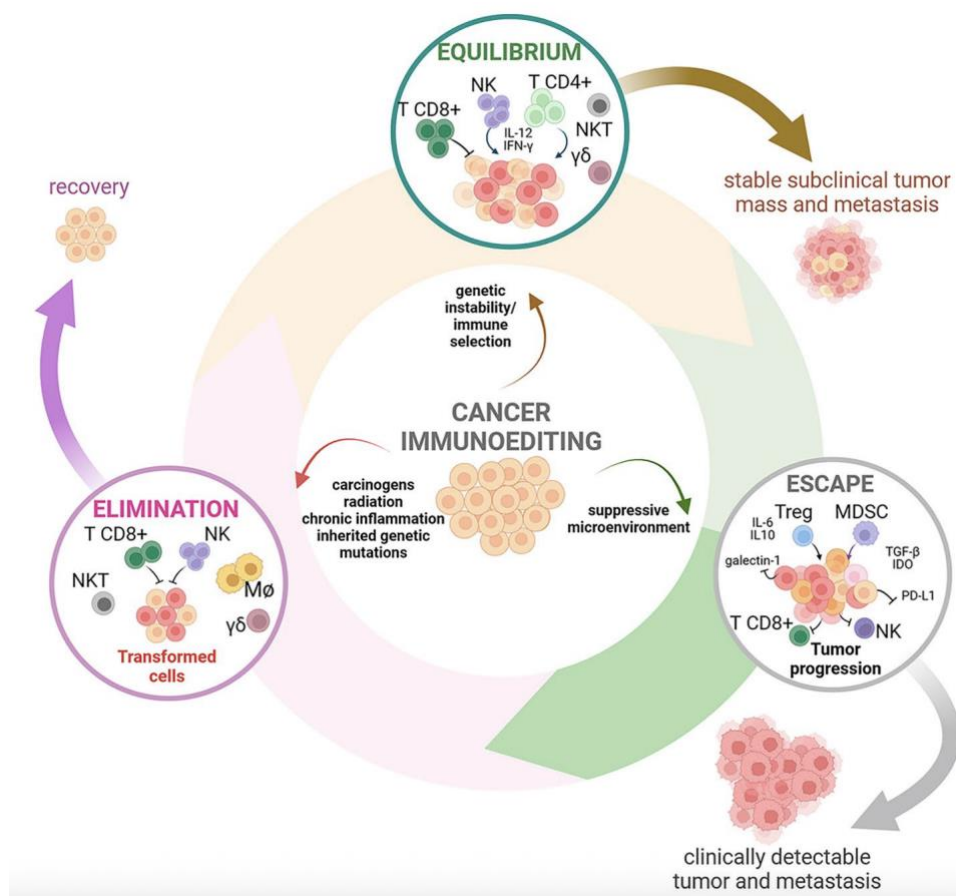
Contudo, é importante ressaltar, que apesar dessas conquistas clínicas e da aprovação regulatória, o acesso à imunoterapia ainda é limitado em muitos países, incluindo o Brasil, principalmente devido ao seu alto custo. Dessa forma, enquanto apenas uma parcela das populações se beneficia dessas novas abordagens, a quimioterapia isolada continua sendo o tratamento padrão para a maioria das pacientes na prática clínica (24,25). Nesse contexto, a possibilidade de identificar quais paciente se beneficiariam do tratamento quimioterápico ou da imunoterapia, por meio da compreensão dos mecanismos de resistência terapêutica, possibilitará a adoção de estratégias mais assertivas e a ampliação do acesso e da efetividade dos tratamentos disponíveis.

1.2. Sistema Imunológico e câncer

A imunoedição é um processo consolidado que descreve a interação entre o sistema imunológico e o tumor, dividido em três fases: eliminação, equilíbrio e escape (26). Na fase de eliminação, o sistema imunológico reconhece e destrói células tumorais iniciais, principalmente por meio da ativação de linfócitos TCD4+, TCD8+ e outras células citotóxicas (27). Contudo, a eliminação é freada e um equilíbrio é mantido entre o crescimento do tumor e a resposta anti-tumoral.

Durante a fase de equilíbrio ocorre uma dormência tumoral caracterizada por um balanço entre a defesa antitumoral e um ambiente imunossuprimido. Nesse estágio, observa-se maior presença de linfócitos TCD8+, células NK e outras células citotóxicas, contrastando com menor atividade de células reguladoras, como linfócitos T reguladores (Treg) e células supressoras de origem mieloide (MDSC)(28).

Diferentes mecanismos levam as células tumorais a crescerem e driblarem o sistema imunológico, levando à terceira fase da imunoedição, o escape. Nesta fase, o tumor supera o sistema imunológico ao expressar moléculas antiapoptóticas, garantindo sua sobrevivência, e ao reduzir a apresentação de antígenos tumorais por meio de menor expressão de MHC-I e moléculas coestimuladoras, o que impede a ativação efetiva da resposta antitumoral (29) (Figura 1).



Fonte: Adaptado de Zingoni et al., Molecular Cancer (2024)

Figura 1. Representação esquemática das fases da imunoeedição tumoral: eliminação, equilíbrio e escape.

Células do sistema imunológico, como linfócitos T, macrófagos e células NK, produzem proteínas sinalizadoras, incluindo citocinas e quimiocinas, que exercem papel central na modulação da resposta imune. Essas moléculas regulam processos como recrutamento celular, proliferação, diferenciação, indução de apoptose e remodelamento do microambiente tumoral (30). Entretanto, o próprio tumor é capaz de manipular esse sistema a seu favor por meio da expressão de citocinas imunossupressoras, como IL-10, e de fatores de crescimento como VEGF. Esses mediadores contribuem para o recrutamento de células com fenótipo regulador, incluindo monócitos, células T reguladoras (Tregs), células mieloderivadas supressoras (do inglês *Myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs) e macrófagos do tipo M2, criando um TME tolerogênico que compromete a atividade de células efetoras e facilita o escape imunológico (31).

Além disso, os quimioterápicos tradicionalmente empregados no CMTN exercem impacto relevante sobre a resposta imunológica. Antraciclinas e platinas, por exemplo,

induzem morte celular imunogênica (ICD), caracterizada pela exposição de calreticulina e liberação de ATP e HMGB1, que favorecem a ativação de células dendríticas e a ativação de linfócitos T citotóxicos(32,33). Taxanos promovem maturação de células dendríticas e aumentam a infiltração de células T CD8+, enquanto ciclofosfamidas podem reduzir Tregs e células mieloides supressoras (MDSCs)(34). Esses efeitos demonstram que a quimioterapia não atua apenas como agente citotóxico, mas também como modulador da imunidade antitumoral.(35,36)

A composição e o estado funcional do sistema imunológico periférico também são componentes fundamentais para o sucesso de uma resposta antitumoral eficaz. Um sistema imune periférico equilibrado, capaz de ativar vias inflamatórias citotóxicas de forma coordenada, contribui para a manutenção da resposta imune e controle tumoral em conjunto com o microambiente tumoral. Alterações nesse equilíbrio influenciam o direcionamento funcional da resposta, podendo favorecer tanto perfis efetores como reguladores(37).

Em contextos de ativação crônica e persistente, a resposta imune periférica pode assumir um perfil inflamatório disfuncional. Esse estado é sustentado por citocinas imunossupressoras, pela expressão de receptores inibidores e pelo aumento da atividade de células imunorreguladoras, como Tregs e MDSCs. Essas características contribuem para a formação de um fenótipo imune tolerogênico ou exausto, com redução da capacidade citotóxica e perda de controle sobre o crescimento tumoral (38,39). Sob a perspectiva do modelo de imunoedição, esse cenário pode ser compreendido como uma manifestação da fase de equilíbrio imunológico, na qual o sistema permanece ativo, mas incapaz de conter a progressão tumoral, favorecendo a transição para o escape tumoral(37).

Embora o câncer de mama, em geral, não seja classificado como um tumor altamente imunogênico, os subtipos HER2+ e triplo negativo apresentam maior frequência de células imunes infiltradas no TME quando comparados aos tumores luminais (40,41). No CMTN, níveis elevados de linfócitos infiltrantes no tumor (TILs), particularmente linfócitos T CD8+, têm sido consistentemente associados a melhores desfechos clínicos, como maiores taxas de pCR à quimioterapia, maior sobrevida livre de doença e sobrevida global (42,43).

No entanto, evidências crescentes sugerem que a eficácia da resposta antitumoral não depende exclusivamente do infiltrado de TME, mas também da coordenação funcional entre a imunidade local e o sistema imunológico periférico

(44,45). O sangue periférico representa um compartimento imunológico acessível e dinâmico, cuja composição e estado funcional podem refletir aspectos importantes da regulação imunológica no contexto tumoral. Nesse sentido, a integração entre os perfis imunes do TME e da periferia, tem se mostrado uma abordagem relevante para o entendimento das interações entre o tumor e o sistema imunológico(46,47).

No câncer de mama, estudos têm demonstrado associações entre perfil celular periférico, associações com infiltrado linfocitário e desfechos clínicos, sugerindo que o perfil imunológico sistêmico carrega possível valor prognóstico e preditivo. Contudo, a maioria dessas abordagens baseia em quantificações celulares amplas e não contempla a caracterização dos fenótipos funcionais dessas células, como marcadores de ativação, memória, receptores inibidores ou características metabólicas(48–50). A ausência dessa caracterização limita a distinção entre perfis efetores e estados de ativação crônica disfuncional, como aqueles associados à inflamação persistente e ao escape imunológico.

Dessa forma, embora o perfil imune periférico em CMTN venha sendo explorado em diferentes estudos, sua análise ainda carece de profundidade para permitir uma compreensão mais abrangente dos mecanismos envolvidos na resposta imune antitumoral.

1.3. Perfil metabólico e sua relação com a resposta imunológica

Além das alterações imunológicas observadas nos compartimentos periféricos e tumoral, aspectos metabólicos do TME também exercem influência determinante sobre a funcionalidade das células imunes. Entre esses fatores, a hipóxia tumoral desponta como um dos principais moduladores negativos da resposta antitumoral. Sua presença afeta não apenas o metabolismo das células tumorais, mas também reprograma o compartimento de células do sistema imune, favorecendo um ambiente imunossupressor e resistente ao tratamento. (51) .

A hipóxia não é apenas uma consequência do crescimento tumoral, mas desempenha um papel ativo no comportamento celular. A redução dos níveis de oxigênio desencadeia respostas coordenadas principalmente pelo fator induzido pela hipóxia 1a (HIF-1a), o que regula a expressão de genes envolvidos na angiogênese, reprogramação metabólica, evasão da resposta imune e resistência a tratamento. Os tumores de mama triplo negativo apresentam níveis mais elevados de hipóxia e maior atividade do gene HIF1a em comparação a outros subtipos mamários (52,53).

Diversos estudos demonstram que a hipóxia contribui significativamente para a evasão tumoral, suprimindo a infiltração de células T citotóxicas, diminuindo a presença de macrófagos M1 e aumentando a presença de células imunossupressoras como macrófagos M2 e células T reguladoras (51,54,55). Essa reprogramação imunológica influenciada pela hipóxia pode implicar diretamente na eficácia terapêutica, contribuindo para um fenótipo tumoral mais agressivo(56,57).

Estudos realizados por Delgoffe et al. revelaram que, em condições de hipóxia e estimulação antigênica crônica, os linfócitos T intratumorais sofrem estresse metabólico que resulta em exaustão celular. Essa disfunção está associada à redução da função mitocondrial, comprometendo a capacidade metabólica dos linfócitos T e sua resposta a sinais de ativação, o que diminui significativamente sua atividade antitumoral(58,59).

A interação entre hipóxia e resposta imune tem sido amplamente explorada no contexto do CMTN, especialmente no TME. Estudos recentes identificaram assinaturas gênicas combinando marcadores de hipóxia e imunidade que se associam à infiltração celular, evasão imune e desfechos clínicos nesse subtipo tumoral. Essas análises, conduzidas a partir de grandes bases de dados como TCGA, METABRIC e GEO, permitiram o desenvolvimento de modelos prognósticos robustos e índices compostos de risco baseados no status hipóxico e imune, capazes de estratificar pacientes em grupos com perfis biológicos e clínicos distintos (60–63)

Ampliar o entendimento da interação entre hipóxia e imunidade para além do TME representa um passo essencial para integrar os efeitos metabólicos locais às alterações imunológicas sistêmicas observadas em pacientes com CMTN. Investigar como a hipóxia e suas vias associadas influenciam o perfil imunológico sistêmico pode contribuir para um panorama mais abrangente da resposta imune no CMTN, conectando eventos locais e sistêmicos com implicações terapêuticas importantes.

2. Objetivos

Caracterizar o perfil imunológico e metabólico sistêmico de pacientes com CMTN antes e após o tratamento neoadjuvante, buscando compreender como essas características se relacionam com o microambiente tumoral e com a resposta terapêutica. A partir dessa abordagem integrativa, pretendemos elucidar mecanismos associados à resposta efetiva ou à falha terapêutica, contribuindo para entendimento da heterogeneidade imunológica no CMTN.

2.1. Objetivos específicos

1) Avaliar o perfil imunológico sistêmico de pacientes com CMTN antes do tratamento.

Este objetivo visou caracterizar o perfil imunológico sistêmico de pacientes com CMTN antes do início do tratamento neoadjuvante, comparando os grupos de respondedores e não respondedores. A análise foi conduzida por meio da fenotipagem das células imunes circulantes e pela quantificação de citocinas e quimiocinas solúveis no plasma, permitindo identificar padrões inflamatórios associados ao desfecho terapêutico.

2) Correlacionar o perfil imunológico sistêmico com os níveis de TILs e a resposta terapêutica

Este objetivo buscou integrar os dados do sistema imune periférico com a avaliação histopatológica do microambiente tumoral, por meio da análise dos níveis de TILs em biópsias pré-tratamento. A proposta foi investigar se perfis imunológicos sistêmicos específicos se associam ao grau de infiltração tumoral e consequentemente à resposta à quimioterapia.

3) Compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta ou falha terapêutica.

A partir da caracterização do fenótipo imune circulante e da análise de citocinas solúveis, este objetivo teve como foco explorar os mecanismos imunológicos que contribuem para uma resposta eficaz ou para a falha terapêutica em pacientes com CMTN.

4) Avaliar o perfil imunometabólico em modelos murinos de CMTN.

Com o intuito de aprofundar a compreensão dos mecanismos observados em humanos, este objetivo envolveu a caracterização do TME em modelos murinos de

CMTN. A análise se baseou na identificação de marcadores associados à hipóxia, vias metabólicas e padrões de evasão imunológica, relacionando esses achados com características de agressividade tumoral.

5) Explorar dados transcriptômicos públicos para validar e expandir os resultados encontrados.

Neste objetivo, foi avaliado um dataset de dados públicos contendo transcriptomas de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs – do inglês *Peripheral Blood Mononuclear cells*) de pacientes com CMTN, com o intuito de validar os achados do presente estudo. Foram conduzidas análises de genes diferencialmente expressos (DEGs) e enriquecimento funcional (Gene Ontology), buscando identificar assinaturas imunológicas e metabólicas associadas à resposta terapêutica, reforçando a relevância dos mecanismos apontados nas análises anteriores.

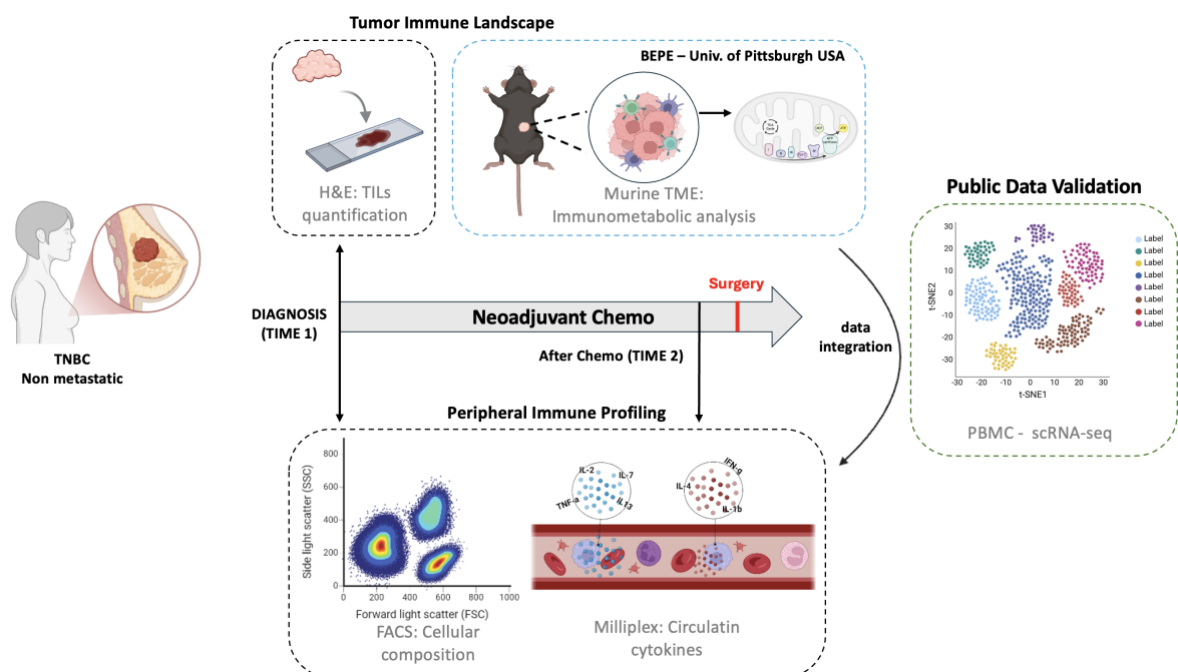
3. Materiais e Métodos

3.1. Delineamento do estudo

Em nosso estudo nós avaliamos o perfil imunológico de pacientes com CMTN por meio da caracterização do sistema imune periférico, incluindo análises do perfil celular e de fatores solúveis. Esses parâmetros foram avaliados antes e após a quimioterapia neoadjuvante, com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na resposta anti-tumoral.

Paralelamente, avaliamos o infiltrado linfocitário em biópsias tumorais obtidas no momento do diagnóstico e correlacionamos esses achados com o perfil imunológico sistêmico. Para aprofundar a compreensão dos mecanismos imunomoduladores no TME em CMTN, conduzimos experimentos em modelos murinos em colaboração com o laboratório do Dr. Greg Delgoffe, na Universidade de Pittsburgh (Estados Unidos, EUA), com foco em aspectos metabólicos e funcionais da resposta imune local.

Por fim, realizamos análises exploratórias de dados públicos de transcriptoma unicelular (scRNA-seq) de sangue periférico e tecido tumoral, com o intuito de validar e integrar nossos achados em diferentes contextos clínicos e experimentais (Figura 2).



Fonte: Autoria própria.

Figura 2. Delineamento experimental do estudo.

3.2. Avaliação de pacientes CMTN antes e após o tratamento

3.2.1. Recrutamento de pacientes

Este projeto está afiliado ao projeto departamental intitulado “Aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão do Carcinoma Ductal de mama: Investigação da progressão do Carcinoma Ductal in situ e do papel da mutação em BRCA1 no tumor triplo negativo”, sob responsabilidade da Dra. Dirce Maria Carraro.

Pacientes incluídas no estudo foram diagnosticadas com CMTN e encaminhadas para tratamento com quimioterapia neoadjuvante no A.C. Camargo Cancer Center. A participação no projeto foi autorizada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apresentado pelas enfermeiras colaboradoras do projeto, Iara Monique Messias, Carla Curi e Silvana Soares dos Santos.

Como critérios de inclusão no estudo, tivemos:

- Pacientes com diagnóstico histopatológico confirmado para carcinoma mamário invasivo;
- Pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico neoadjuvante com carboplatinas e taxanos, sem histórico prévio de quimioterapia ou imunoterapia;
- Pacientes submetidas à cirurgia no A.C. Camargo Cancer Center, com coleta de amostras de tecido e sangue periférico previamente ao tratamento, sendo posteriormente armazenadas no Biobanco institucional.

Foram excluídas do estudo:

- Pacientes com histórico de doenças ou tratamentos imunossupressores;
- Pacientes com diagnóstico de tumor primário não classificado como triplo negativo;
- Pacientes com presença de metástases detectadas no momento da primeira coleta.

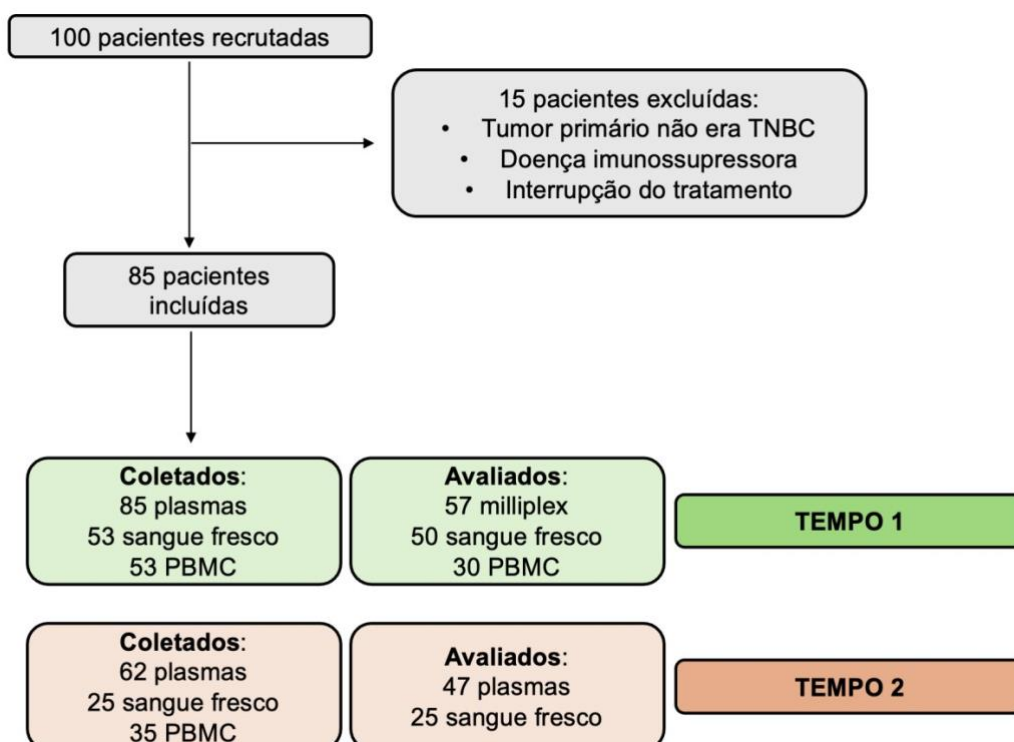
Foram recrutadas 100 pacientes diagnosticadas com CMTN, entretanto 15 pacientes foram excluídas por atenderem aos critérios de exclusão, como: portadores de doença autoimune, reavaliação anatomopatológica constatou câncer de mama não triplo negativo e interrupção do tratamento. Dessa forma, o nosso estudo contou com a inclusão de 85 pacientes (Figura 3).

No tempo 1, os pacientes ADAMANT 01 ao ADAMANT 25 foram incluídas como coorte de descoberta e tiveram suas amostras de plasma analisadas por meio da

plataforma Bioplex, no projeto de Mestrado intitulado “Determinação do perfil imunológico de pacientes com câncer de mama triplo negativo pré-tratamento neoadjuvante e associação com resposta patológica completa”. Já a coorte de validação foi composta pelas pacientes ADAMANT25 a ADAMANT 100, cujas 57 amostras de plasma foram analisadas pela plataforma Milliplex. Adicionalmente, alíquotas de sangue fresco foram coletadas por 53 pacientes desta coorte para avaliação fenotípica por citometria de fluxo.

A avaliação por citometria de fluxo de sangue fresco contou com 50 amostras avaliadas (3 pacientes não possuíam células suficientes para avaliação estatística e foram excluídos das análises). Para avaliação do PBMC citometria de fluxo, contamos com a avaliação pareada de resposta de 30 pacientes.

No tempo 2, coletamos o plasma de 62 pacientes (pCR = 38 e não pCR= 24), 25 amostras de sangue fresco (pCR = 14 e não pCR = 11) e separamos 35 amostras de PBMC (pCR = 22 e não pCR= 13). A avaliação do Milliplex nesse tempo foi realizada em 47 amostras de plasma (pCR = 31 e não pCR= 16), nos quais priorizamos as amostras que foram caracterizadas no tempo 1 pelo Milliplex e tiveram a avaliação celular. A caracterização do perfil celular em sangue fresco foi realizada em 25 pacientes (pCR = 13 e não pCR= 12). A coleta de amostra de pacientes nesse tempo foi interrompida, devido a pandemia, e apenas a coleta de plasma foi realizada pelo Biobanco.



Fonte: Autoria própria.

Figura 3. Número de pacientes recrutadas, incluídas e avaliadas nos tempos 1 e 2.

3.2.2. Resposta ao tratamento

A avaliação da resposta ao tratamento foi conduzida no momento da mastectomia, após a conclusão do regime de quimioterapia neoadjuvante. A análise histopatológica da peça cirúrgica foi realizada por patologistas, com base no índice de carga residual tumoral (Residual Cancer Burden – RCB). Pacientes com RCB = 0 foram classificados como apresentando Resposta Patológica Completa (do inglês *pathological complete response* - pCR), enquanto aqueles com RCB > 1 foram considerados não respondedores (não-pCR), indicando presença de doença residual significativa.

A pCR é um marcador prognóstico validado em estudos clínicos e translacionais, sendo associada a uma redução significativa no risco de recorrência sistêmica, sobretudo em subtipos agressivos como o CMTN. Dessa forma, ambos os parâmetros são reconhecidos como ferramentas robustas para avaliar a eficácia terapêutica e orientar decisões clínicas no cenário do câncer de mama localmente avançado(18,64,65).

3.2.3. Coleta e processamento de amostras.

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo EDTA 4mL antes do início do tratamento (Tempo “1”) e antes da realização da cirurgia, após a administração dos quimioterápicos (Tempo “2”). Sempre que possível, uma alíquota do sangue fresco foi imediatamente separada para análise do perfil celular por citometria de fluxo. O sangue foi então centrifugado a 400g e o plasma foi removido e congelado imediatamente a -80°C. O volume restante foi retornado ao original com PBS e foi realizada a purificação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por gradiente de Ficoll. Essas células foram congeladas a -80°C, seguida por armazenamento por longo prazo em nitrogênio líquido para posterior análise.

3.2.4. Avaliação do perfil imune celular por citometria de fluxo multiparamétrica

O perfil de células imunes de pacientes foi caracterizado por citometria de fluxo multiparamétrica (BD FACSymphony A5, BD Bioscience), que permite a análise de até

30 parâmetros simultaneamente. Foram avaliadas subpopulações de linfócitos T (CD4+, CD8+, duplo negativos, NKT), seu estado de ativação (moléculas co-estimuladoras e inibidoras e moléculas de adesão), função efetora (citocinas, moléculas líticas, e status da memória (naive, efetor, TCM, TEM e TRM).

A avaliação do sangue fresco de pacientes foi realizada a partir da incubação com os anticorpos de interesse (Tabela 1) por 15 minutos, à temperatura ambiente, seguido por lise de hemácias (FACS Lyse Solution, BD Biosciences). Após a lise, as amostras foram fixadas em PBS / 2% formaldeído e armazenadas a 4°C até o momento da aquisição ao citômetro de fluxo, pelo menor tempo possível e inferior a 48 horas. Esta análise nos permitiu uma caracterização preliminar do perfil imune celular de pacientes incluídas no estudo.

Tabela 1. Painéis de anticorpo para caracterização do perfil imune celular em sangue fresco.

Painel 1		Painel 2	
Linfócitos T / Células NK / Células NKT		Linfócitos B / Plasmócitos / Monócitos / DC	
Marcador	Fluorocromo	Marcador	Fluorocromo
CD3	PerCP-Cy5.5	CD14	FITC
CD56	APC	CD16	APC-Cy7
CD4	BV605	CD11c	PerCP-Cy5.5
CD8	BV650	CD11b	BV650
CD69	APC-R700	CD19	PE
CD107a	AAF488	CD38	PE-Cy7
PD-1	BV421	HLA-DR	APC
CTLA-4	PE	PD-L1	BV421
		PD-L2	APC-R700

Fonte: Autoria própria.

Também foram avaliadas PBMCs congeladas de pacientes para uma caracterização mais completa do perfil imune celular circulante no tempo 1. Neste ensaio, um subgrupo de pacientes já com avaliação de resposta foi selecionado e as amostras foram pareadas na mesma quantidade de pacientes respondedoras e não respondedoras em cada ensaio, na intenção de evitar qualquer viés de processamento. Após o descongelamento dessas células, a viabilidade foi confirmada por exclusão de azul de Trypan. Aproximadamente $2,5 \times 10^6$ céls/mL foram incubadas *overnight* na presença de (1) anti-CD3 + anti-CD28 ou na presença do (2) mix dos peptídeos Mamaglobina-A, Survivin e Muccina1 + anti-CD28. Todos os estímulos

foram na concentração de 1µg/mL. Os anticorpos utilizados estão representados na Tabela 02.

Para a avaliação de marcadores intracelulares, as células foram inicialmente fixadas e permeabilizadas (Transcription Factor Buffer Set, BD Bioscience). Todos os controles necessários de células com marcações individuais, bem como células não marcadas, foram incluídos.

Tabela 2. Painéis de anticorpos para caracterização do perfil imune celular em PBMC.

Painel Core		Painel Marcadores Intracelular		Painel Marcadores Exaustão	
Linfócitos T e subpopulações					
Marcador	Fluorocromo	Marcador	Fluorocromo	Marcador	Fluorocromo
Live/dead	BUV496	FOXP3	FITC	CD152 CTLA4)	PE
CD45	BB790	Ki-67	PE-Cy7	CD223 (LAG3)	BUV615
CD3	BUV661	Granzima B	BV510	CD366 (TIM-3)	BV421
CD4	BV750	TNFα	BUV395		
CD8	BUV805	IFNγ	BV605		
TCRγδ	APC-R700	IL10	BV711		
CD45RO	APC-H7				
CD197 (CCR7)	BV650				
CD25	BUV563				
CD161	PE-Cy5				
CD56	APC				
CD279 (PD-1)	BUV737				
CD95	PE-CF594				

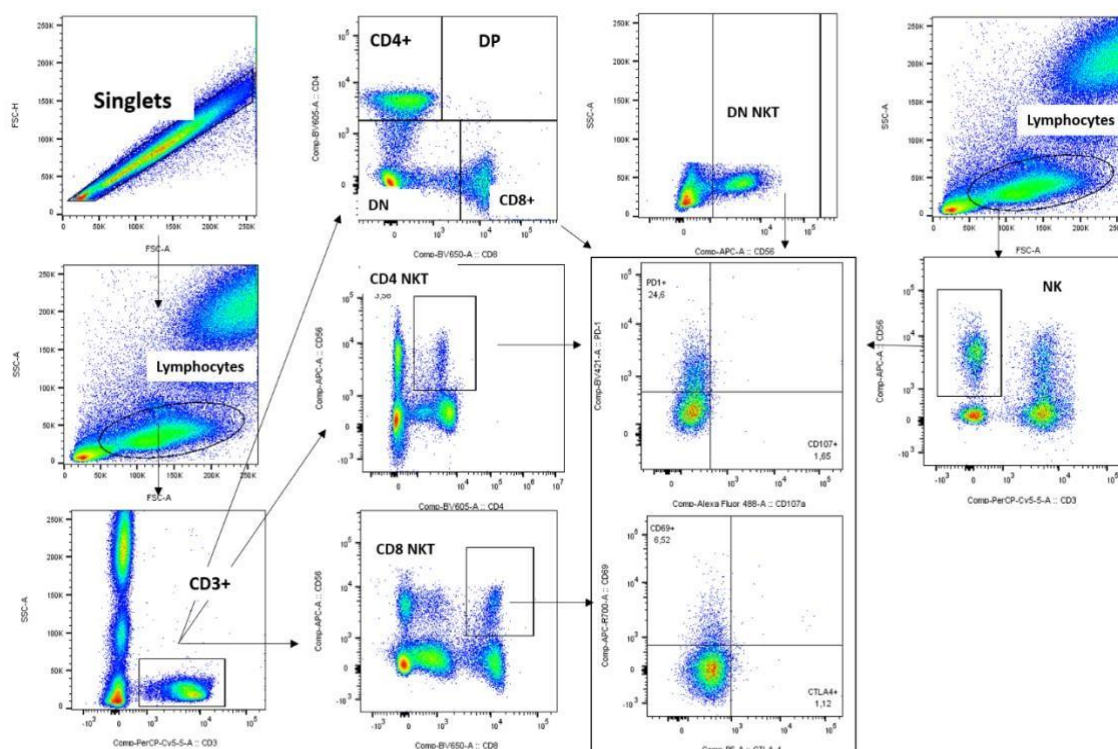
Fonte: Autoria própria.

3.2.5. Análise de dados de citometria de fluxo multiparamétrica

Para a identificação de populações imunes circulantes em pacientes, por meio da análise de sangue fresco (Figura 4) ou de PBMCs (Figura 5), utilizamos o software *FlowJo* (BD Biosciences). Esse recurso foi empregado para avaliação das frequências das populações de interesse pela análise supervisionada dos dados. Também foi utilizado para a quantificação da expressão de moléculas características das principais populações imunes, fatores de transcrição e citocinas. Adicionalmente, foi realizada análise não supervisionada dos dados, utilizando algoritmos de redução de dimensionalidade, como *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP), e ferramentas de agrupamento (clustering), com o objetivo de explorar padrões

emergentes de expressão e identificar subpopulações celulares não previamente definidas.

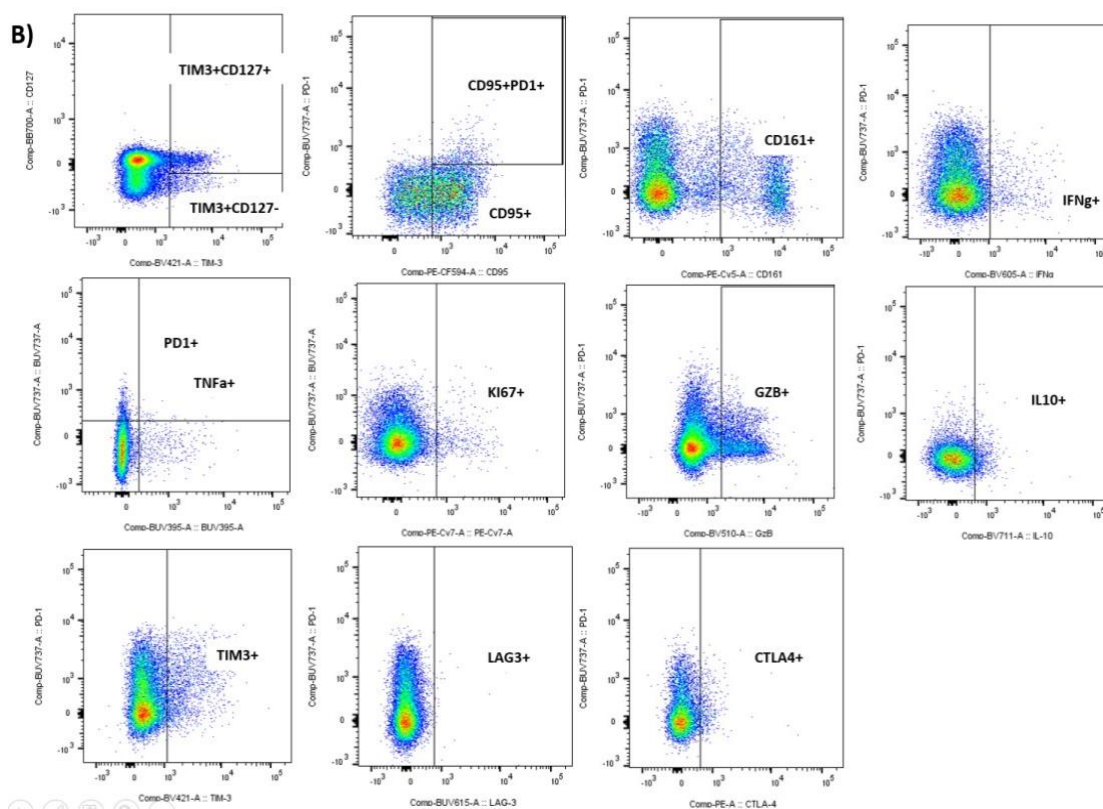
Após a identificação de subpopulações distintas entre os grupos de pacientes, nós realizamos as análises estatísticas apropriadas. A caracterização das populações representadas na Figura 4, foi conduzida sem a identificação prévia da resposta terapêutica dos pacientes, ou seja, de forma às cegas. As amostras de PBMC foram selecionadas de forma pareada.



Fonte: Autoria própria.

Figura 4. Análise citometria de sangue fresco.

Legenda: Para a avaliação das subpopulações linfoides e a expressão das moléculas PD1, CTLA4, CD69 e CD107a, realizamos a marcação de células do sangue fresco e criamos uma estratégia de gates como representado nos *dotplots*. Inicialmente excluimos os *doublets* e seguimos com a avaliação de células CD3+, onde fizemos o *backgating* para selecionarmos os linfócitos. Em seguida, determinamos as populações de interesse e os devidos marcadores para os perfis de exaustão e ativação.



Comp-BV421-A :: TM-3

Fonte: Autoria própria.

Figura 5. Análise de PBMC.

Legenda: Para a avaliação das populações linfoides bem como seus perfis de ativação e exaustão, realizamos a marcação de PBMC descongelados e analisamos através do software *FlowJo* como representado nos *dotplots*. Inicialmente, excluimos os *doublets* e consideramos apenas leucócitos viáveis (Live/Dead-CD45+). Em seguida, determinamos as subpopulações de interesse, bem como os marcadores de ativação e exaustão, citocinas e fatores de transcrição, (A) Estratégia de gate para as populações linfoides e de NK. (B) Estratégia de gates para os marcadores de exaustão e ativação.

3.2.6. Avaliação do perfil imune solúvel.

A identificação e quantificação dos mediadores imunes presentes no plasma de pacientes foi realizada utilizando o sistema de suspensão Milliplex (Merck), que permite a verificação de múltiplos analitos simultaneamente através de um conjunto de beads específicas para cada analito de interesse. Após a interação entre bead conjugada ao anticorpo de captura e o analito específico, a quantificação foi feita através de um anticorpo de detecção conjugado com um marcador fluorescente. A leitura foi realizada na máquina Magpix com o auxílio do software da plataforma Exponent. A quantidade de cada analito é detectado em pg/mL e por intensidade média de fluorescência (MFI) e o cálculo é realizado com base em uma curva padrão. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, utilizando o kit “Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel” da Merck, que permite quantificar as seguintes citocinas/ quimiocinas: EGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17a , P-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , TNF- β , VEGF e Eotaxin.

3.2.7. Caracterização Morfológica do Tecido Tumoral na biópsia inicial

As análises do infiltrado linfocitário tumoral (do inglês, *tumor-infiltrating lymphocytes* – TILs) foram realizadas com o auxílio de patologistas especializados, colaboradores do estudo, do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. As biópsias avaliadas são anteriores ao início do tratamento. Nestas amostras tumorais, a porcentagem de TILs foi determinada nas seguintes regiões: a região do estroma tumoral (onde os linfócitos encontram-se distribuídos entre as células tumorais, sem contato direto com elas) e a região intratumoral (onde os linfócitos estão em contato direto com células tumorais). A soma dos percentuais dessas duas regiões corresponde ao valor dos TILs totais. Esta avaliação ocorreu a

partir da análise morfométrica em cortes de 4µm corados com hematoxilina e eosina (H&E). Foram consideradas e contadas todas as células mononucleadas (linfócitos e plasmócitos) localizadas até as margens tumorais das regiões mencionadas, não sendo considerados os TILs de regiões necróticas, em torno de carcinoma *in situ*, ou fora da borda do tumor invasivo. A determinação dos níveis de TILs foi realizada como um parâmetro contínuo e representada em porcentagem, indicando um grau de infiltrado em cada região avaliada.

As amostras codificadas em ADAMANT1 a ADAMANT54 contaram com a avaliação histopatológica completa, com quantificação da porcentagem de TILs estromais e intratumorais, o que possibilitou também o cálculo de TILs totais. Para os casos entre ADAMANT82 e ADAMANT100, a porcentagem de TILs estromais foi registrada diretamente nos laudos histopatológicos da biópsia, permitindo a extração retrospectiva desses dados a partir do prontuário ou sistema de registro da instituição.

Na intenção de avaliarmos a presença de hipóxia no microambiente tumoral de pacientes com CMTN anterior ao tratamento, optamos por utilizar a informação de necrose registrada nos laudos anatomopatológicos da biópsia diagnóstica como um marcador morfológico indireto. A necrose tumoral é frequentemente associada a regiões de pouca vascularização e, portanto, desbalanço metabólico, refletindo a presença de hipóxia local(66,67). Dessa forma, optamos pela análise da presença ou ausência de necrose no material tumoral para investigar, mesmo que indiretamente, aspectos do microambiente tumoral que poderiam se associar à resposta terapêutica.

3.3. Avaliação do TME em modelos murinos de CMTN.

No laboratório de imunometabolismo do câncer, Delgoffe Lab, na Universidade de Pittsburgh, nós seguimos com as seguintes metodologias para avaliação do microambiente tumoral utilizando linhagens de CMTN murino.

3.3.1. Modelo animal

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram adquiridos dos laboratórios Jackson e Charles River (EUA). Toda a manipulação com camundongos foi realizada em conformidade com o Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade de Pittsburgh. Os camundongos foram mantidos em condições livre de

patógenos específicos antes de serem manuseados. Foram utilizados camundongos fêmeas com idade entre seis e oito semanas.

3.3.2. Linhagem Tumoral

A linhagem celular E0771, derivada de tumores mamários espontâneos em camundongos C57BL/6J, apresenta alta aderência do tumor (próxima a 100%) e é muito semelhante ao tumor de mama humano. Caracterizado pelo seu tipo basal, também não apresenta receptores hormonais e superexpressão do gene HER2, assim como os tumores mamários triplo negativo(68). Quando implantada no tecido adiposo mamário, fornece um modelo abrangente para o estudo do microambiente tumoral. A linhagem celular AT-3, derivada de células tumorais mamárias primárias de camundongos transgênicos MMTVPyMT, também semelhante aos tumores CMTN, não expressa receptores de progesterona e estrógeno, além de não expressão do gene HER2(69).

A linhagem AT-3 foi inicialmente derivada de uma célula tumoral primária de mama de um camundongo transgênico MTAG, que expressava o vírus Polyoma sob o controle do promotor MMTV-LTR. Esta linhagem celular foi adquirida da Millipore Sigma. A linhagem celular de carcinoma mamário E0771 de camundongo C57/BL6 foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC). Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM completo, suplementado com 10% de FBS, 1mM de piruvato de sódio, 2mM de L-glutamina, 5mM de tampão HEPES, 100U de penicilina, 100ug de estreptomicina, 500ug/ml de gentamicina e 5nM de 2-mercaptoetanol.

Os camundongos C57BL/6 foram inicialmente inoculados por via subcutânea com $2,5 \times 10^5$ células em meio sem soro. O crescimento tumoral foi monitorado três vezes por semana utilizando um paquímetro digital. Para inoculação ortotópica no tecido adiposo mamário, foram injetadas 1×10^5 células para o modelo E0771 e 5×10^5 células para o modelo AT3. A diferença na quantidade de células injetadas foi justificada pelas distintas taxas de crescimento tumoral observadas entre os dois modelos. Quando os tumores atingiram 15mm em qualquer direção, os camundongos portadores dos tumores foram eutanasiados.

3.3.3. Avaliação do perfil imune celular por citometria de fluxo multiparamétrica

Para análise por FACS de linfócitos infiltrados em tumores (TILs) e linfonodos drenantes do tumor (dLN), os camundongos portadores de tumores foram

eutanasiados e os tumores foram coletados. Para dissecação tumoral, primeiramente os tumores receberam repetidas injeções com agulha 20G, da solução contendo collagenase tipo UI (2mg/mL), dispase (2U/mL) e DNase I (10U/mL) (Sigma) em RPMI tamponado, sendo incubados por 20 minutos a 37°C. Em seguida, os tumores foram dissociados mecanicamente utilizando o êmbolo de uma seringa e filtrados através de filtros de 70µm (Fisher brands). Os linfonodos drenantes também foram dissociados mecanicamente da mesma forma.

As suspensões celulares foram submetidas à lise de eritrócitos antes da marcação de superfície com anticorpos para análise por citometria de fluxo. Para as marcações extracelulares, as amostras foram incubadas em gelo por 20 minutos com um mix de anticorpos. No painel denominado “Exaustão”, avaliamos os marcadores de linfócitos T CD4+ e CD8+ em TILs e dLNs, bem como suas subpopulações (células naive, efectoras e de memória central), utilizando os anticorpos CD62L e CD44. Também foram avaliados os marcadores de exaustão PD-1, TIM-3 e CD39. A atividade mitocondrial foi examinada por Mitotracker. Os fatores de transcrição TCF-1, Tbet, FOXP3 e TOX foram analisados em células TCD4+ e CD8+ no painel denominado “fatores de transcrição”. Além disso, foi avaliada a expressão do marcador de proliferação Ki-67 e do receptor de interleucina-2, CD25. No painel denominado “Citocinas”, analisamos a expressão de Granzima B, IL-2, TNF-α e IFN-γ em linfócitos T CD4+ e CD8+. A viabilidade celular foi avaliada em todos os painéis utilizando o marcador Zombie NIR.

Para o ensaio de produção de citocinas, as suspensões celulares derivadas de tumor e dLN foram estimuladas em meio completo R10 com Golgi-Plug (BD Biosciences), anti-CD3 imobilizado (3µg/mL) e anti-CD28 (2µg/mL) por 5 horas a 37°C. Também foram utilizadas estimulações com Phorbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) (50 ng/mL) e Ionomicina (1µg/mL) em presença de Golgi-Plug, por 5 horas a 37°C.

Os painéis de anticorpos utilizados nos ensaios *in vivo* estão representados na Tabela 3. Para os painéis utilizados à análise de citocinas e fatores de transcrição, foram realizados fixação e permeabilização utilizando Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), conforme o protocolo do fabricante. No painel de exaustão, as células foram adquiridas vivas.

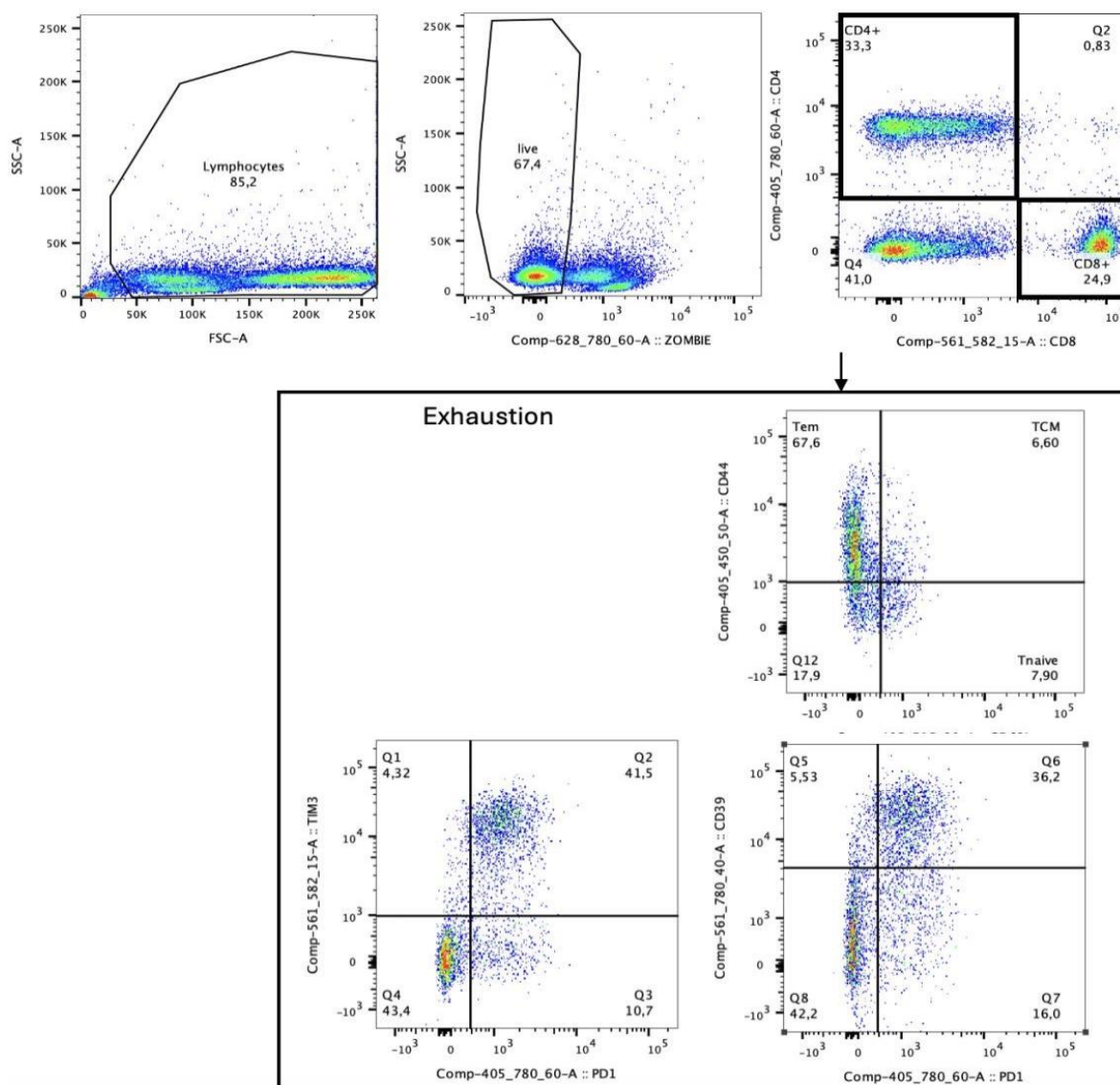
Tabela 3 Painéis de anticorpos para avaliação de TILs e dLN

Painel com marcadores de exaustão		Painel com marcadores dos fatores de transcrição		Painel com marcadores de citocinas	
Marcador	Fluorocromo	Marcador	Fluorocromo	Marcador	Fluorocromo
CD8	FITC	TCF7/TCF1	FITC	Granzyma B	FITC
CD4	PerCP-Cy5.5	Ki-67	PE	CD8	PE
TIM3	PE	Tbet	PE-594	IL2	PE-Cy7
CD39	PE-Cy7	CD8	PE-Cy7	TNFα	BV421
CD44	BV421	FoxP3	Pac Blue	CD4	BV786
CD62L	BV510	CD25	BV 510	IFNγ	AxF647
PD-1	BV786	CD4	BV786	Zombie NIR	APC-Cy7
Mitotracker DR	AxF647	TOX	AxF647		
Zombie NIR	APC-Cy7	Zombie NIR	APC-Cy 7		

Fonte: Autoria própria.

3.3.4. Análise de dados – citometria de fluxo multiparamétrica

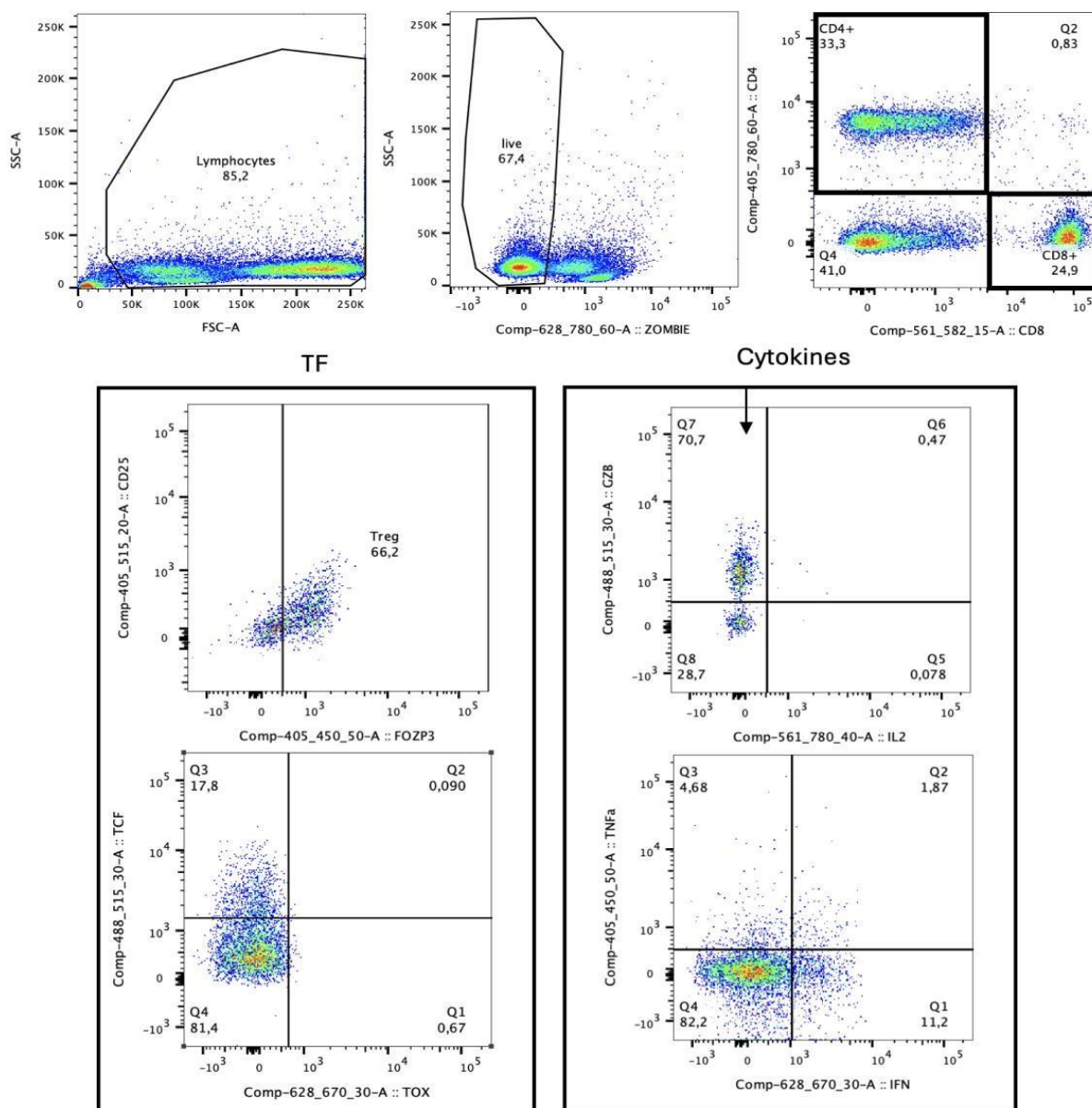
As células dos ensaios *in vivo* foram adquiridas ao citômetro de fluxo LSR Fortessa™ e foram analisadas utilizando o software BDFACSDiva. As análises subsequentes foram realizadas no software FlowJo 10.10. A estratégia de seleção utilizada em cada painel para avaliação dos TILs e dLN está ilustrada nas Figura 6 e Figura 7



Fonte: Autoria própria.

Figura 6. Estratégia de gating para avaliação de painel de exaustão.

Legenda: O gate inicial em um gráfico bidimensional de Side Scatter-Area (SSC-A) versus Forward Scatter-Area (FSC-A) para selecionar linfócitos com base no tamanho e granulosidade. Em seguida, as células viáveis foram selecionadas com base na viabilidade. Nas células viáveis, foram selecionados os linfócitos T CD4+ e CD8+. Os marcadores de exaustão das células T foram avaliados dentro das populações CD4+ e CD8+ e PD1 foi plotado com TIM3 e CD39. CD44 e CD62L também foram avaliados dentro das populações de CD4+ e CD8+.



Fonte: Autoria própria.

Figura 7. Estratégia de gating para avaliação dos painéis de citocinas e fatores de transcrição.

Legenda: O gate inicial em um gráfico bidimensional de Side Scatter-Area (SSC-A) versus Forward Scatter- Area (FSC-A) para selecionar linfócitos com base no tamanho e granulosidade. Em seguida, as células viáveis foram selecionadas com base na viabilidade. Nas células viáveis, foram selecionados os linfócitos T CD4+ e CD8+. Nos fatores de transcrição, os Tregs foram selecionados como FOXP3+ e CD25+/- na população CD4+. Os marcadores TCF e TOX foram selecionados nas populações CD4+ e CD8+. Para o painel de citocinas, Granzyme B (GZB) e IL2 foram selecionados nas populações CD4+ e CD8+, assim como TNFα e IFNγ.

3.3.5. Avaliação metabólica

Para avaliar a atividade metabólica das linhagens celulares AT3 e E0771, foi realizado o ensaio Seahorse XF Cell Mito Stress (Agilent Technologies). Esse ensaio mede parâmetros bioenergéticos fundamentais, incluindo a taxa de consumo de oxigênio (OCR do inglês *Oxygen Consumption Rate*), um indicador de respiração mitocondrial, e a taxa de acidificação extracelular (ECAR), um marcador de atividade glicolítica.

As células AT3 e E0771 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS, 1 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina, 5mM de tampão HEPES, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 500 µg/mL de gentamicina e 5 nM de 2mercaptoetanol, a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. Para o ensaio, foram colocadas em cultura 200.000 células por poço em microplacas Seahorse X96, otimizadas para alcançar uma confluência de 70-80%. Após a adesão das células, o meio foi substituído por Seahorse XF Base Medium suplementado com glicose (10mM), glutamina (2mM) e piruvato (1mM). As células foram encubadas em uma incubadora sem CO₂ por 1 hora antes das medições.

Durante o ensaio, OCR e ECAR foram medidos em condições basais e em resposta à injeção sequencial dos seguintes moduladores metabólicos:

- **Oligomicina (2 µM):** Inibe a síntese de ATP, determinando a respiração associada à produção de ATP.
- **FCCP (2 µM):** Desacoplador mitocondrial utilizado para avaliar a capacidade respiratória máxima.
- **Rotenona/Antimicina A (0,5 µM cada):** Inibidores dos complexos I e III da cadeia mitocondrial, respectivamente, para bloquear a respiração mitocondrial e determinar o consumo de oxigênio não mitocondrial.

A capacidade respiratória máxima foi analisada com a adição de FCCP no ensaio Seahorse. O FCCP, um desacoplador mitocondrial, simula uma alta demanda energética fisiológica ao estimular a cadeia respiratória, permitindo a avaliação da capacidade máxima de respiração mitocondrial. A Capacidade Respiratória de Reserva (SRC do inglês *Spare Respiratory Capacity*), calculada como a diferença entre a capacidade respiratória basal e máxima, reflete a flexibilidade metabólica das células e sua habilidade de se adaptar a diferentes demandas energéticas.

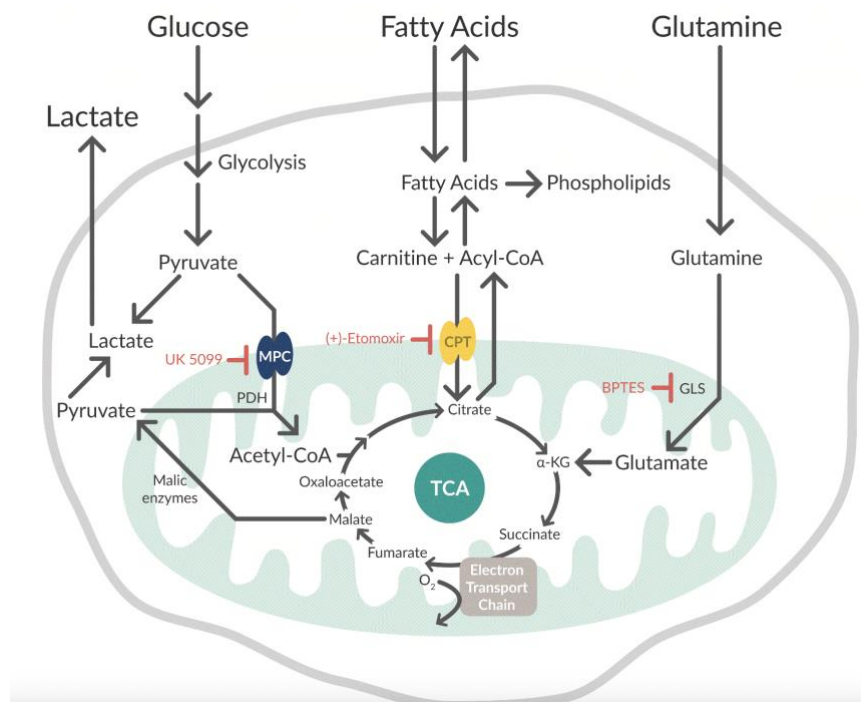
Os valores basais de OCR e ECAR foram registrados para as células AT3 e E0771, e os parâmetros metabólicos principais foram calculados utilizando o software Seahorse Wave (Agilent). Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). A significância estatística foi avaliada por meio de ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.3.6. Avaliação funcional de vias metabólicas com inibidores mitocondriais.

Com o objetivo de caracterizar o uso diferencial de vias metabólicas mitocondriais, realizamos experimentos funcionais com a tecnologia Seahorse descrita acima, utilizando as linhagens murinas E0771 e AT3. As células foram cultivadas na presença de inibidores específicos, previamente descritos na literatura, visando a inibição seletiva de vias metabólicas distintas. Foram utilizados os seguintes compostos:

- **UK5099**: um inibidor do transportador mitocondrial de piruvato (MPC), que bloqueia a entrada de piruvato na matriz mitocondrial, impedindo sua oxidação no ciclo de Krebs e comprometendo a contribuição da glicose para a fosforilação oxidativa;
- **BPTES**: um inibidor da glutaminase (GLS1), que bloqueia a conversão de glutamina em glutamato, interrompendo a geração de α -cetoglutarato e sua entrada no ciclo de Krebs;
- **Etomoxir**: inibidor da carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), impedindo o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a mitocôndria e, conseqüentemente, sua oxidação;
- **Metformina**: inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, que reduz a atividade respiratória mitocondrial e a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa.

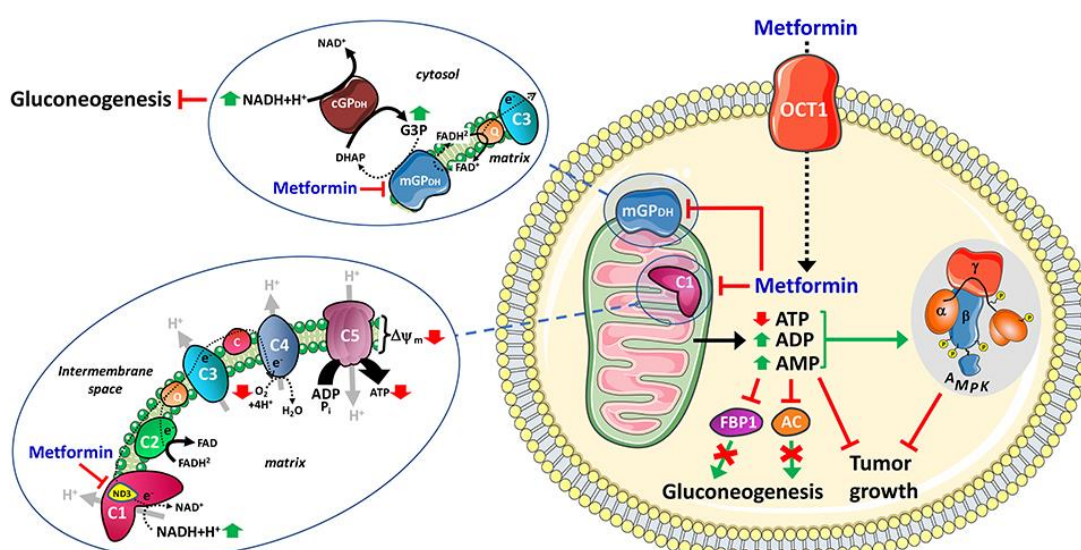
A atuação desses inibidores sobre as principais vias metabólicas mitocondriais está esquematicamente representada na Figura 8, ilustrando os pontos-alvo de cada composto na via da glicose, glutamina e ácidos graxos. A inibição direta da cadeia respiratória pela metformina está representada na Figura 9.



Fonte: Adaptado de Cayman Chemical – Manipulating Mitochondrial Fuel Pathways

Figura 8. Representação esquemática das principais vias metabólicas mitocondriais e seus respectivos inibidores utilizados na análise funcional com tecnologia Seahorse.

São mostrados os pontos de ação do UK5099 (inibidor do transporte de piruvato), Etomoxir (inibidor da oxidação de ácidos graxos via CPT1) e BPTES (inibidor da glutaminase GLS1).



Fonte: Madiraju, A. K., Erion, D. M., & Shulman, G. I. (2019). **Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Insulin Resistance.** *Frontiers in Endocrinology*, 10, 294.

Figura 9. Mecanismo de ação da metformina sobre vias metabólicas mitocondriais

3.3.7. Avaliação de hipóxia por pimonidazol

Para a detecção de hipóxia, os camundongos receberam pimonidazol (80mg/kg Hypoxyprobe) em PBS por via intravenosa 1 horas antes de serem eutanasiados. A detecção de pimonidazol foi através do anticorpo anti-pimonidazol (Hypoxyprobe) em TILs e dLNs após 10 minutos de fixação por PFA, seguida por permeabilização por 20 minutos com Cytofix/Cytoperm.

3.4. Análise de dados públicos de transcriptoma.

Para a análise transcriptômica de células do sangue periférico (PBMC) e de tumores de pacientes com CMTN, foi utilizado um dataset público disponível na plataforma Gene Expression Omnibus (GEO), sob o número de acesso GSE169246. Esse dataset foi originalmente gerado a partir de amostras coletadas antes e após o tratamento em pacientes com CMTN metastáticas e não metastáticos que receberam quimioterapia com paclitaxel, isoladamente ou em combinação com imunoterapia anti-PD-L1 (atezolizumabe)(70).

A resposta terapêutica foi avaliada com base nos critérios RECIST, sendo os pacientes classificados como respondedores (aqueles com resposta parcial ao tratamento ou resposta completa) ou não respondedores (aqueles com doença estável ou progressiva). Para a análise das amostras de PBMC, foram considerados os dados de 20 pacientes, sendo 9 respondedores e 11 não respondedores. Já para a análise do tecido tumoral, foram incluídas amostras de 15 pacientes, sendo 7 respondedores e 8 não respondedores.

3.4.1. Análise dos dados públicos de PBMC.

Com base nas informações de metadados clínicos, foram selecionadas exclusivamente as células derivadas de amostras de sangue periférico coletadas no período pré-tratamento. A partir dos dados brutos, foi realizado um subconjunto aleatório de 50.000 células para com o objetivo de garantir viabilidade computacional e uniformidade de análise. Dentre essas, 12.128 células correspondiam às amostras de PBMC elegíveis para a análise.

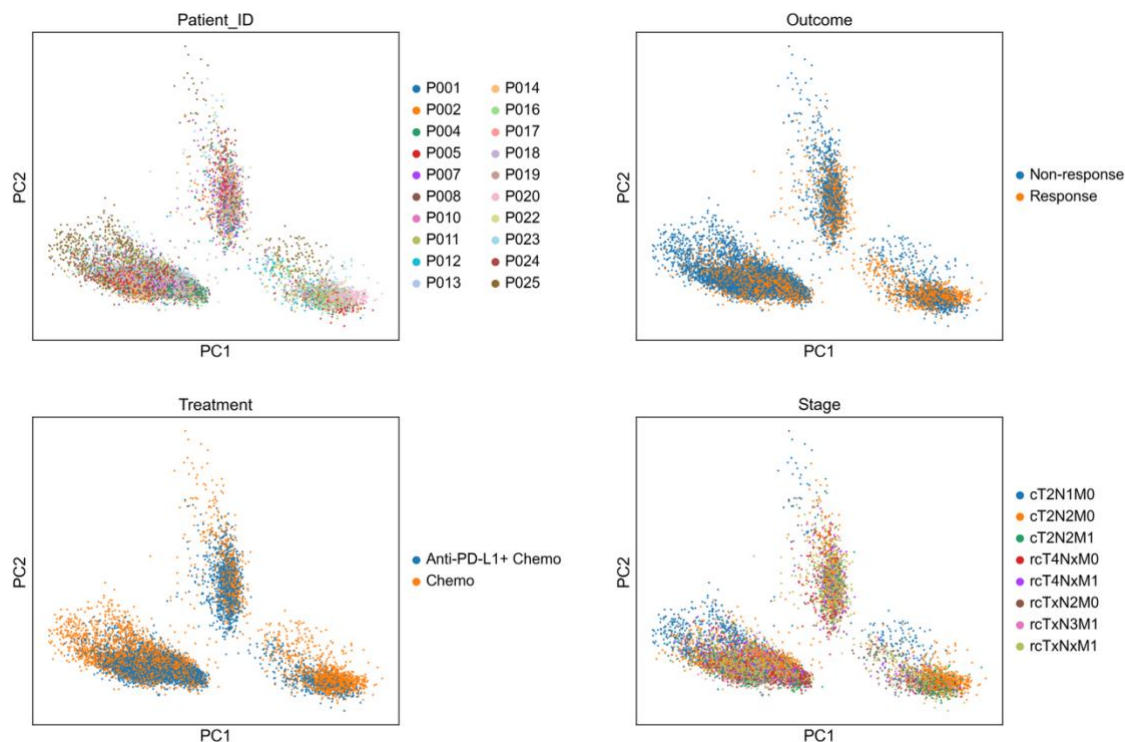
Em seguida, aplicaram-se filtros de qualidade para garantir robustez analítica, foram mantidas as células com número total de transcritos (*Count*) entre 200 e 15.000,

números de genes expressos entre 500 e 3.000, e proporção de genes mitocondriais inferior a 10%, a fim de excluir células de baixa qualidade, doublets e células em estresse ou apoptose. Além disso, genes expressos em menos de 100 células foram excluídos, visando minimizar ruídos técnicos associados a transcrições esparsas. Após a aplicação de filtros, 11.530 células de alta qualidade foram mantidas para as análises posteriores.

Embora o dataset já tivesse passado por etapas iniciais de pré-processamento no estudo original, utilizamos diretamente a matriz de expressão contendo células previamente classificadas como de alta qualidade, aplicando critérios adicionais de filtragem para garantir maior robustez analítica. Foram mantidos apenas os genes expressos em, no mínimo, 100 células, com o objetivo de eliminar ruídos provenientes de transcrições esparsas e não informativas. Além disso, células com proporção igual ou superior a 10% de genes mitocondriais foram excluídas da análise, uma vez que essa característica é indicativa de estresse ou morte celular, os quais poderiam enviesar os resultados.

Após a filtragem das células e dos genes, os dados foram submetidos à normalização utilizando a função padrão do pacote Scanpy(71). Esse procedimento garante que cada célula seja comparável em termos de profundidade de sequenciamento, reduzindo viés por diferença na captura de RNA entre as células. Em seguida, foi realizada a identificação dos genes mais variáveis (que representam aqueles genes com maior variação de expressão entre as células e, portanto, com maior potencial informativo para distinção de subpopulações celulares). Com base nessa seleção, foi aplicada uma análise de componentes principais (PCA) (72), visando a redução de dimensionalidade e a captura das principais direções de variação dos dados.

A estrutura global dos dados foi inicialmente explorada por meio de PCA, permitindo visualizar a variabilidade entre as amostras segundo o desfecho clínico (Figura 10). O número de componentes foi definido com base na proporção de variância explicada, utilizando o ponto de inflexão da curva (plateau) como critério de corte.

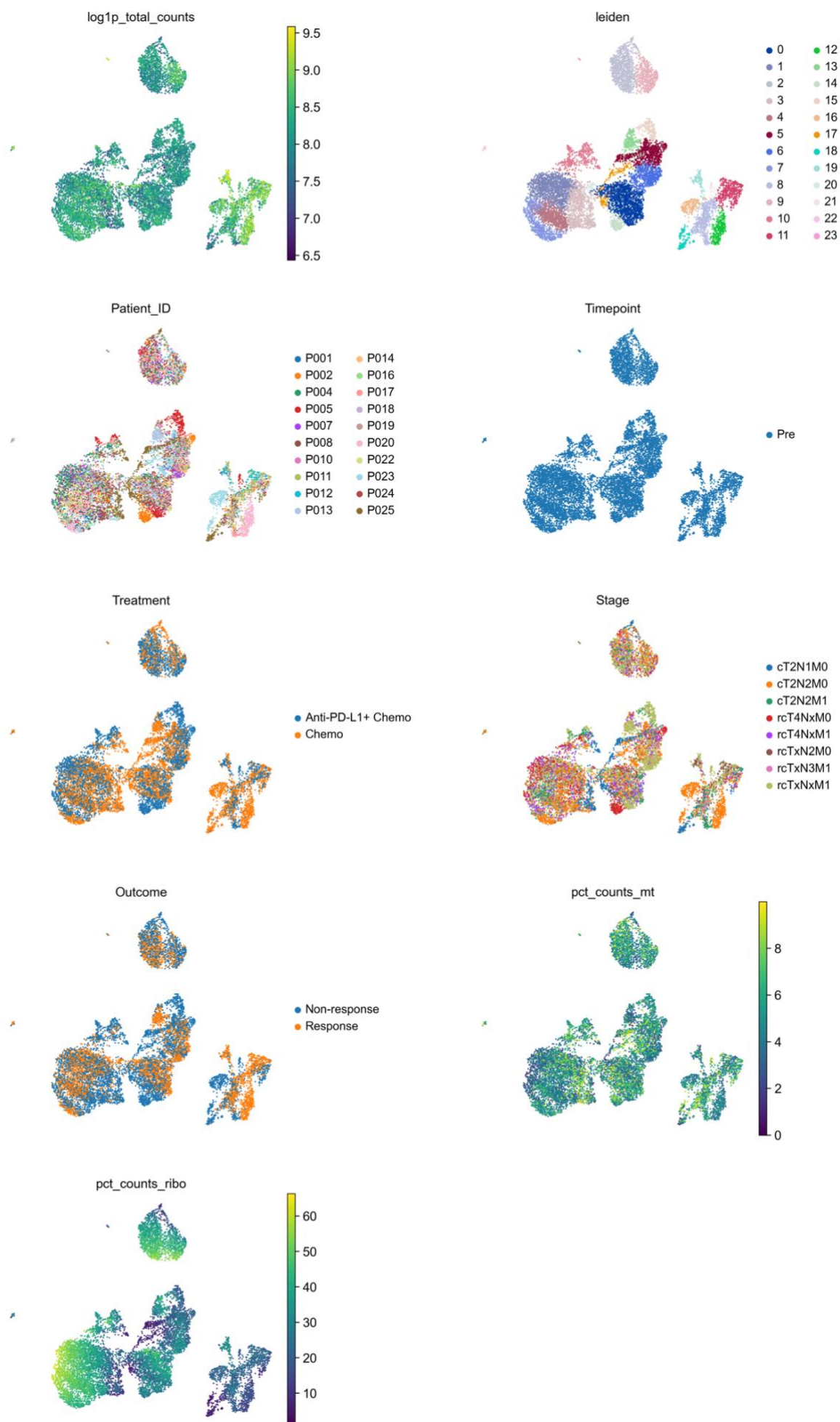


Fonte: Autoria própria.

Figura 10. Projeção PCA da estrutura global das células de PBMC com base nos genes mais variáveis.

Legenda: Cada painel mostra a mesma projeção, mas com representação de acordo com diferentes metadados: pacientes (superior esquerdo), desfecho clínico (superior direito), tipo de tratamento (inferior esquerdo) e estadiamento clínico (inferior direito).

As partir dos componentes principais ($n_pca=30$), foram calculadas a distância entre vizinhos mais próximos (do inglês - *nearest-neighbor distance*), o que permitiu a projeção dos dados no espaço bidimensional por meio do algoritmo de UMAP(73). Essa projeção permitiu a visualização da distribuição das células em função de seus perfis de expressão gênica, bem como integrar múltiplos metadados clínicos e técnicos como número tota de transcritos por célula, clusters de células (identificados por Leiden com resolução =1.0(74)), paciente de origem, estágio clínico, tipo de tratamento, momento de coleta e desfecho clínico (resposta ou não-resposta ao tratamento), além de parâmetros de qualidade como a porcentagem de genes mitocondriais e ribossomais por célula (Figura 11).

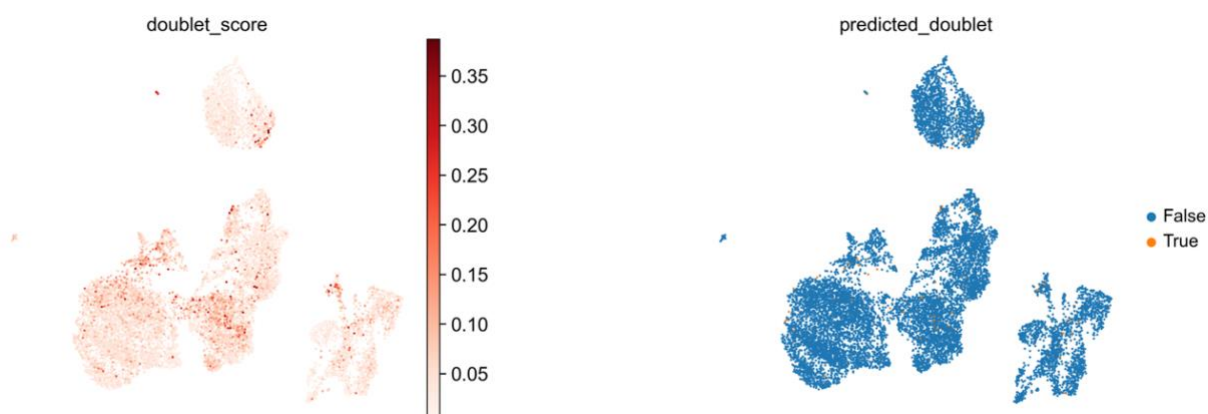


Fonte: Autoria própria.

Figura 11. Projeção UMAP das células do PBMC com base nos perfis de expressão gênica.

Legenda: Cada painel representa a mesma projeção UMAP, mas colorida segundo diferentes metadados clínicos e técnicos: número total de transcritos por célula (`log10_total_counts`), agrupamento celulares obtidos pelo algoritmo Leiden (resolução = 1.0), identificação de pacientes (Patient ID), momento de coleta (Timepoint), tipo de tratamento (Treatment), estadiamento clínico (Stage), desfecho clínico (Outcome), porcentagem de genes mitocondriais (`pct_counts_mt`) e porcentagem de genes ribossomais (`pct_counts_ribo`).

Como etapa adicional de controle de qualidade, avaliou-se a presença de doublets com base em *scores* de predição. Os resultados demonstraram uma baixa taxa de duplicação celular, sugerindo que a grande maioria das células incluídas eram de fato *single cells* (Figura 12).

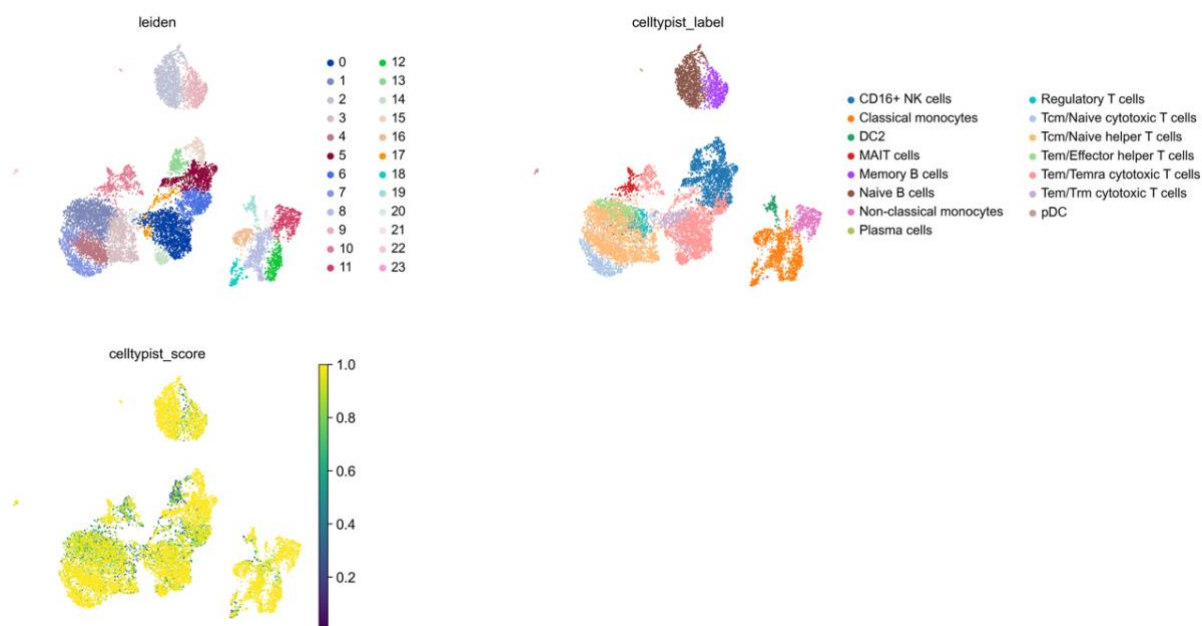


Fonte: Autoria própria.

Figura 12. Avaliação da presença de doublets nas amostras celulares de PBMC.

Legenda: Projeção UMAP das células de acordo com o score de predição de doublets (à esquerda) e com a classificação final (à direita).

A anotação automatizada das células foi realizada com a ferramenta CellTypist, a qual classificou as células em subtipos imunes com base em perfis transcriptômicos previamente treinados. A confiança das predições foi quantificada por meio de um escore específico da ferramenta, e os resultados indicaram uma separação clara entre os principais tipos celulares, como células T (e seus subtipos), células B, células NK, monócitos e células dendríticas (Figura 13).



Fonte: Autoria própria

Figura 13. Anotação automatizada das subpopulações imunes em PBMC por CellTypist

Legenda: Projeção UMAP das células após anotação automatizada realizada com a ferramenta CellTypist. À esquerda, observa-se a divisão dos clusters gerados por Leiden. À direita as células são coloridas conformes os subtipos imunes atribuídos pelo modelo treinado. Na parte inferior, o escore de confiança da predição (*celltype_score*) indica alta acurácia na maioria das atribuições.

Os agrupamentos identificados, juntamente com as informações clínicas de pacientes, foram utilizados como base para a análise de expressão diferencial entre os grupos de respondedores e não respondedores aos tratamentos avaliados no estudo utilizado. Para isso, foi aplicada a estratégia de *pseudobulking*, em que as contagens de expressão gênica de cada gene foram agregadas por paciente, simulando uma abordagem de RNA-seq convencional (bulk), que possibilita maior robustez estatística e menor influência da variabilidade célula a célula. A identificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada através do pacote *pyDESeq2* (uma implementação em Python baseada no método *DESeq2*). Foram considerados diferencialmente expressos os genes com $\log_2$ fold change > 0.5 e valor de *p* ajustado (*p*-adj) < 0.05 .

Com esses conjuntos de DEGs, foi conduzida uma análise de sobre-representação (ORA), utilizando o pacote *GSEAPy* (75). As listas de genes com expressão aumentada ou diminuída foram analisadas separadamente e ranqueadas de acordo com sua significância estatística e magnitude de alteração, utilizando a fórmula: $-\log_{10}(\text{p-valor ajustado}) \times \log_2 \text{foldchange}$. As análises foram realizadas

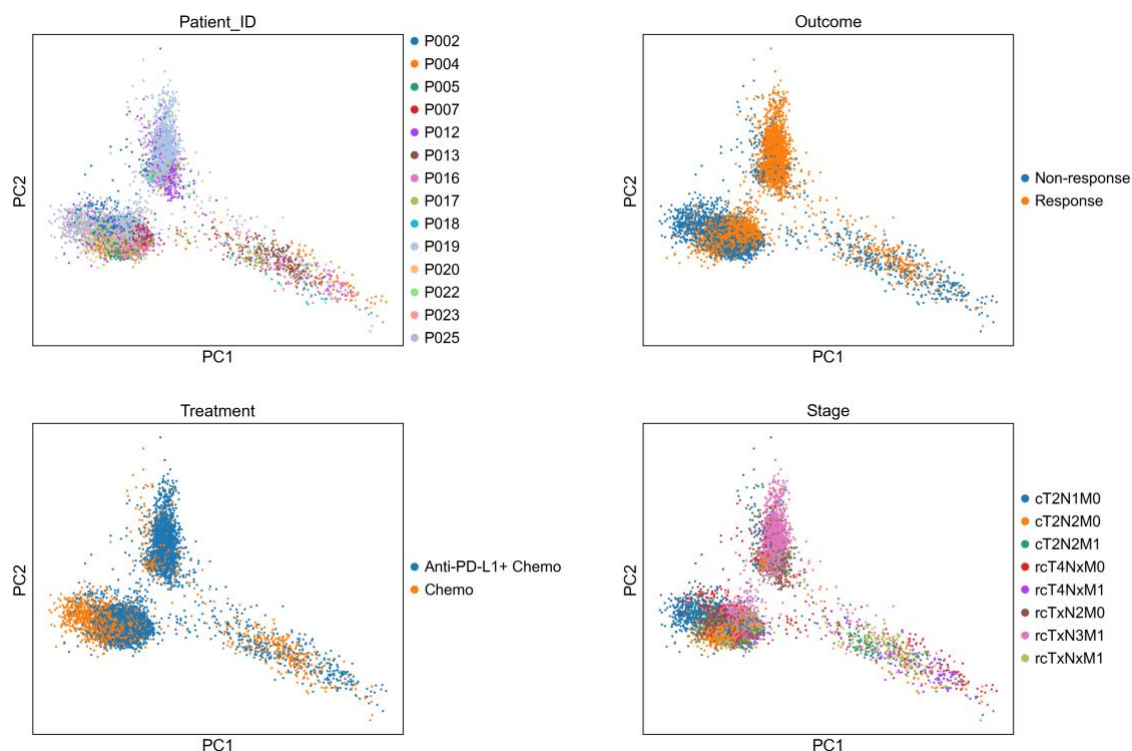
com base nas bibliotecas MSigDB Hallmarks 2020(76) e Gene Ontology: Biological Processes 2025(77) , permitindo a identificação das vias biológicas mais relevantes e a construção de representações gráficas integradas por processos moleculares associados a cada grupo clínico.

3.4.2. Análise de dados públicos de tecido tumoral de CMTN

Para as amostras de tecido tumoral, também foram consideradas apenas as células derivadas de biópsias coletadas antes do início do tratamento. A partir dos dados brutos disponibilizados, o mesmo subconjunto aleatório de 50.000 células foi utilizado para padronizar e viabilizar o processamento computacional. Deste subconjunto, 9.130 células correspondiam às amostras tumorais pré-tratamento.

Aplicaram-se então os mesmos critérios de filtragem adotados para o PBMC e foram mantidas apenas as células com número total de transcritos (*counts*) entre 200 e 15.000, número de genes expressos entre 500 e 3.000, e proporção de genes mitocondriais inferior a 10%. Além disso, genes expressos em menos de 100 células foram excluídos da matriz de expressão. Ao final da filtragem, foram mantidas 8.061 células e 10.003 genes para as análises de downstream. A normalização e seleção dos genes de maior variabilidade foram realizadas utilizando as funções padrão do pacote Scanpy(71).

A análise de PCA foi aplicada para a redução de dimensionalidade, permitindo a visualização da estrutura global dos dados e a inspeção inicial das amostras segundo variáveis clínicas, como resposta ao tratamento, estadiamento e tipo de tratamento (Figura 14).

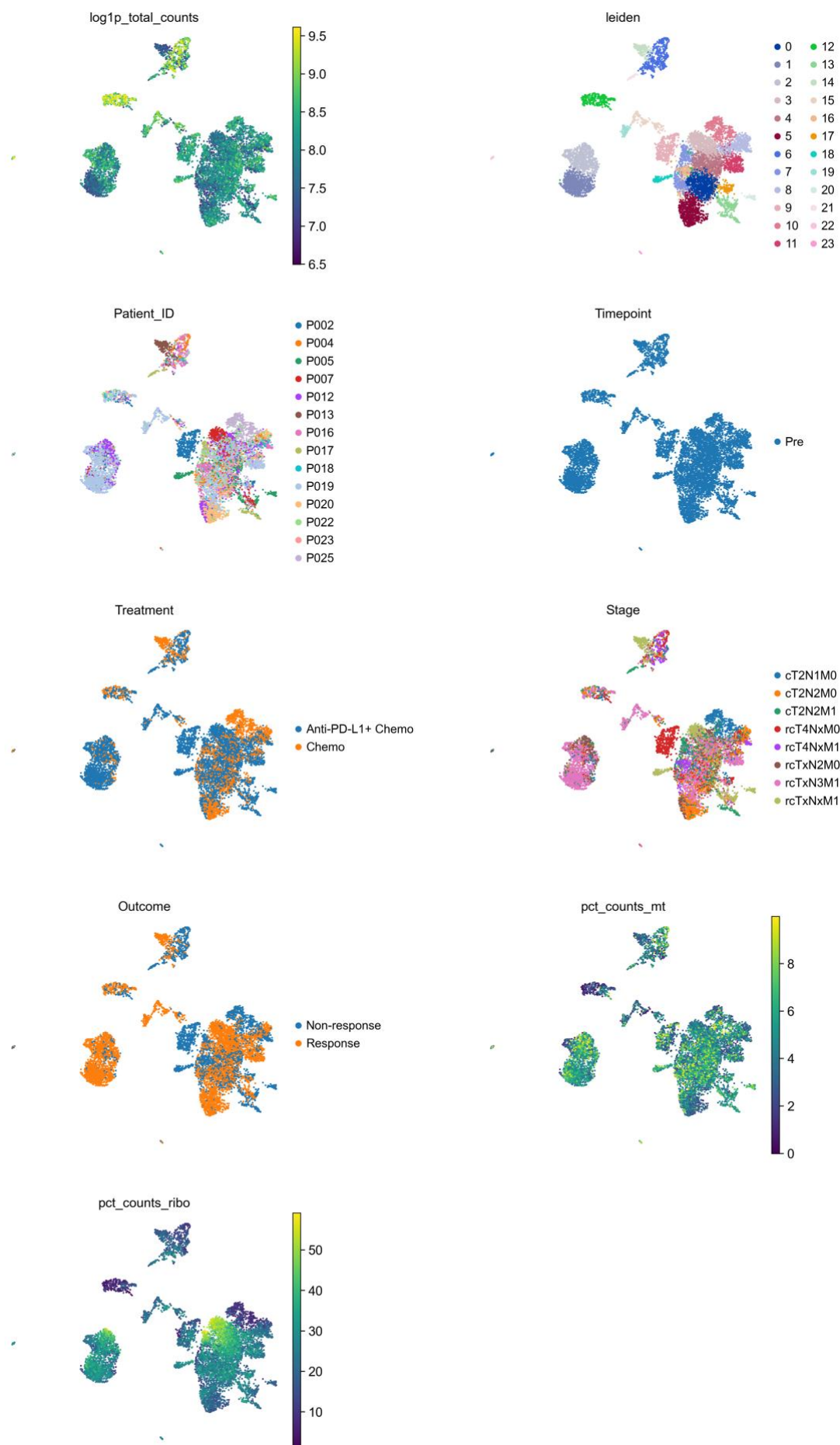


Fonte: Autoria própria

Figura 14. Projeção PCA da estrutura global das células do tecido tumoral com base nos genes mais variáveis.

Legenda: Cada painel mostra a mesma projeção, mas com representação de acordo com diferentes metadados: pacientes (superior esquerdo), desfecho clínico (superior direito), tipo de tratamento (inferior esquerdo) e estadiamento clínico (inferior direito).

Em seguida, foi realizada a projeção UMAP que possibilitou explorar a organização transcricional das células tumorais e integrar múltiplas informações clínicas e técnicas, como número total de transcritos por células, agrupamento de células por Leiden (resolução =1.0), identificação dos pacientes, momento de coleta, tipo de tratamento, estadiamento clínico e resposta clínica. Além disso, foram incorporados parâmetros de qualidade como a porcentagem de genes mitocondriais e ribossomais (Figura 15).

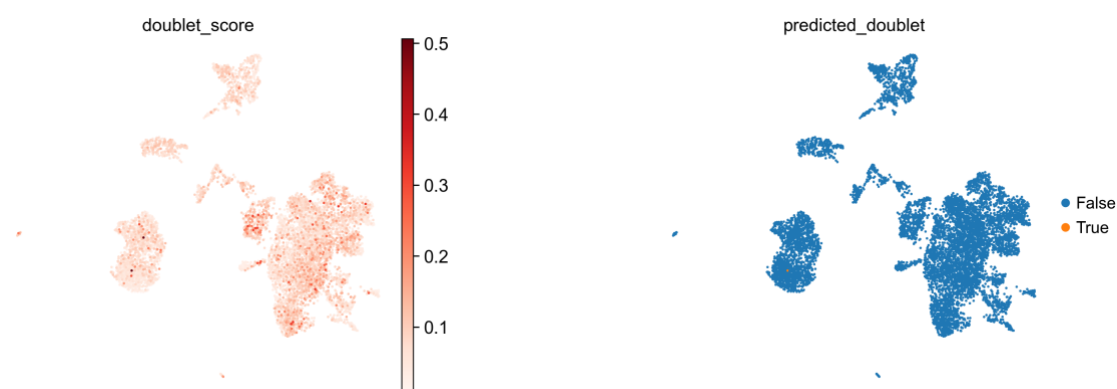


Fonte: Autoria própria

Figura 15. Projeção UMAP das células do tecido tumoral com base nos perfis de expressão gênica.

Legenda: Cada painel representa a mesma projeção UMAP, mas colorida segundo diferentes metadados clínicos e técnicos: número total de transcritos por célula (log10_total_counts), agrupamento celulares obtidos pelo algoritmo Leiden (resolução = 1.0), identificação de pacientes (Patient ID), momento de coleta (Timepoint), tipo de tratamento (Treatment), estadiamento clínico (Stage), desfecho clínico (Outcome), porcentagem de genes mitocondriais (pct_counts_mt) e porcentagem de genes ribossomais (pct_counts_ribo).

Como etapa de controle de qualidade, foi aplicada a predição de doublets, com base em score de probabilidade e classificação binária. A baixa frequência de eventos positivos reforçou a qualidade das amostras processadas (Figura 16).



Fonte: Autoria própria

Figura 16. Avaliação da presença de doublets nas amostras celulares em tecido tumoral.

Legenda: Projeção UMAP das células de acordo com o score de predição de doublets (à esquerda) e com a classificação final (à direita).

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise em pacientes com CMTN

4.1.1. Caracterização clínico patológica dos pacientes

Como mencionado, em nosso estudo foi realizada a avaliação do perfil imunológico de 85 pacientes com câncer de mama triplo negativo não metastático. Todos os pacientes recrutados foram submetidos à quimioterapia neoadjuvante seguida pela mastectomia. Após a cirurgia, a avaliação da resposta patológica foi realizada categorizando as pacientes em dois grupos: respondedores (resposta patológica completa – pCR), composto por 49 pacientes, e não respondedoras (não resposta patológica completa – não pCR), com 36 pacientes.

A mediana de idade de pacientes incluídas no estudo foi de 41 anos, sem diferença significativa entre os grupos de resposta. O tamanho tumoral mediano no momento do diagnóstico foi de 2.6 cm, sendo semelhante no grupo de respondedores (2.5 cm) e no grupo sem resposta (2.6 cm). Assim, o tamanho tumoral não demonstrou relação significativa com o desfecho patológico na coorte analisada (Tabela 4).

A mutação no gene BRCA1 foi observada em 18 pacientes da nossa coorte, enquanto a mutação do gene BRCA2 foi identificada em 2 pacientes. No entanto, a presença dessas mutações não apresentou relação significativa com a resposta ao tratamento. Em relação às características avaliadas, como estadiamento clínico global, estágio tumoral (estadiamento T) e comprometimento linfonodal (estadiamento N), não foi identificada nenhuma associação estatisticamente significativa entre esses parâmetros e o desfecho patológico, seja resposta completa ou ausência de resposta (Tabela 4).

Por outro lado, observou-se uma associação estatisticamente significativa entre o grau histológico e resposta patológica ($p=0.015$). Tumores classificados como grau histológico III (GIII) apresentaram maiores taxas de pCR em comparação aos tumores de grau II (GII), sugerindo que o grau de diferenciação tumoral pode representar uma variável associada à resposta patológica completa nesse contexto (Tabela 4).

Tumores pouco diferenciados (GIII) são geralmente caracterizados por maior índice proliferativo, alterações genômicas instáveis e maior sensibilidade à quimioterapia citotóxica, o que pode explicar as maiores taxas de resposta observadas nesse grupo. Estudos em câncer de mama identificaram que tumores de alto grau, particularmente subtipos como triplo negativo e HER2 positivo, alcançam taxas

significativamente maiores de resposta patológica completa, com ganhos prognósticos relevantes(64,78).

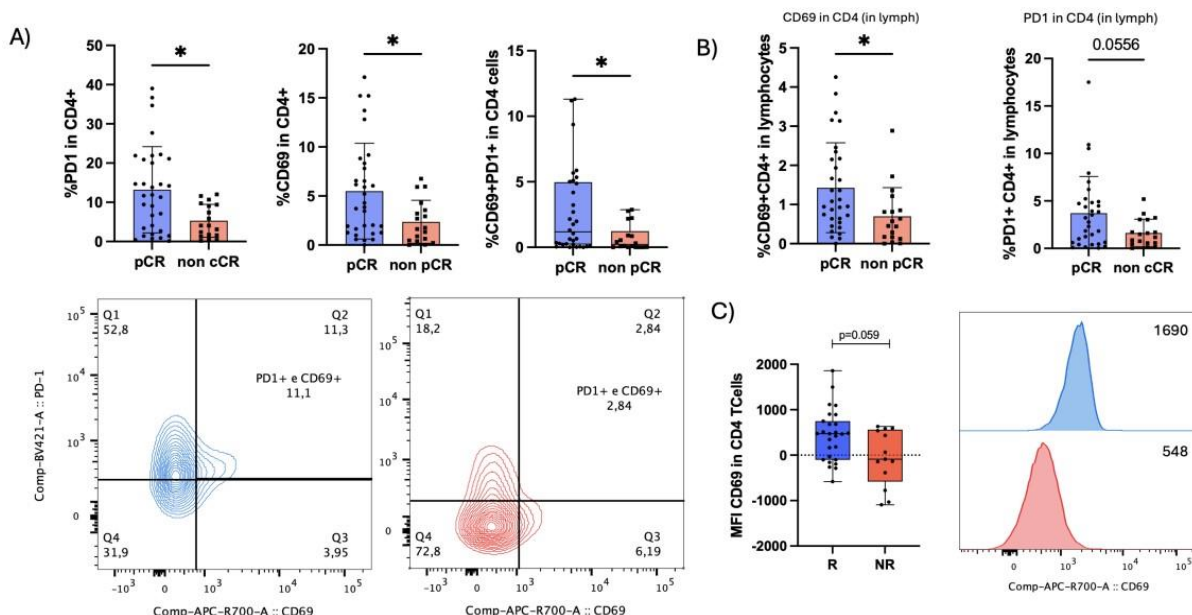
Tabela 4 Características Clínico-Patológicas de pacientes CMTN.

Características	Coorte completa (n=85)	pCR (RCB=0) (n=49)	não-pCR(RCB>0) (n=36)	valor de p
Idade ao diagnóstico, mediana	41 (25;73)	42 (25; 68)	40 (28; 73)	0.765
Tamanho tumoral (cm), mediana (min;max)	2.6 (2.1; 18)	2.5 (1; 18)	2.6 (0.6; 5.7)	0.578
Estágio clínico, n (%)				
I	7 (8.2%)	4 (8.2%)	3 (8.3%)	0.313
II	58 (68.2%)	36 (73.5%)	22 (61.1%)	
III	20 (23.5%)	9 (18.4%)	11 (30.6%)	
Estadiamento T, n (%)				
T1	13 (15.3%)	7 (14.3%)	6 (16.7%)	0.053
T2	54 (63.5%)	37 (75.5%)	17 (47.2%)	
T3	14 (16.5%)	4 (8.2%)	10 (27.8%)	
T4	4 (4.7%)	1 (2%)	3 (8.3%)	
Estadiamento N, n (%)				
N0	42 (50%)	22 (45.8%)	20 (55.6%)	0.312
N1	32 (38.1%)	19 (39.9%)	13 (36.1%)	
N2	7 (8.3%)	5 (10.4%)	2 (5.6%)	
N3	3 (3.6%)	2 (4.2%)	1 (2.8%)	
Grau histológico, n (%)				
II	24 (28.2%)	10 (20.4%)	14 (38.9%)	0.015
III	56 (65.9%)	34 (69.4%)	22 (61.1%)	
não avaliado	5 (5.9%)	5 (10.2%)	0 (0%)	
Mutação germinativa				
BRCA 1	18 (21.2%)	12 (24.5%)	6 (16.7%)	0.744
BRCA 2	2 (2.3%)	0 (0%)	2 (5.6%)	
outras	3 (3.5%)	1 (2%)	2 (5.6%)	
sem mutação	62 (72.9%)	36 (73.5%)	26 (72.2%)	

Legenda: RCB = residual cancer burden

4.1.2. Caracterização imunológica sistêmica pré-tratamento

Para caracterizarmos o perfil imune sistêmico celular, realizamos a análise comparativa das frequências presentes nos dois grupos de pacientes. No tempo 1, ou seja, antes do tratamento, notamos que o grupo de pacientes respondedores apresenta maior expressão de marcadores de ativação de resposta imune, PD1 e CD69 em linfócitos CD4+, inclusive em coexpressão ($p=0.010$, $0=0.014$ e $p=0.023$, respectivamente) (Figura 17A). Esse padrão de maior expressão também é evidente ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos, pois a porcentagem de linfócitos CD4+CD69+ e CD4+PD1+ em linfócitos é mais elevada em pacientes com pCR em comparação aos não pCR ($p=0.012$ e $p=0.055$, respectivamente) (Figura 17B). Além disso, há um aumento da intensidade média de fluorescência de CD69 em linfócitos CD4+ ($p=0.056$) (Figura 17C).

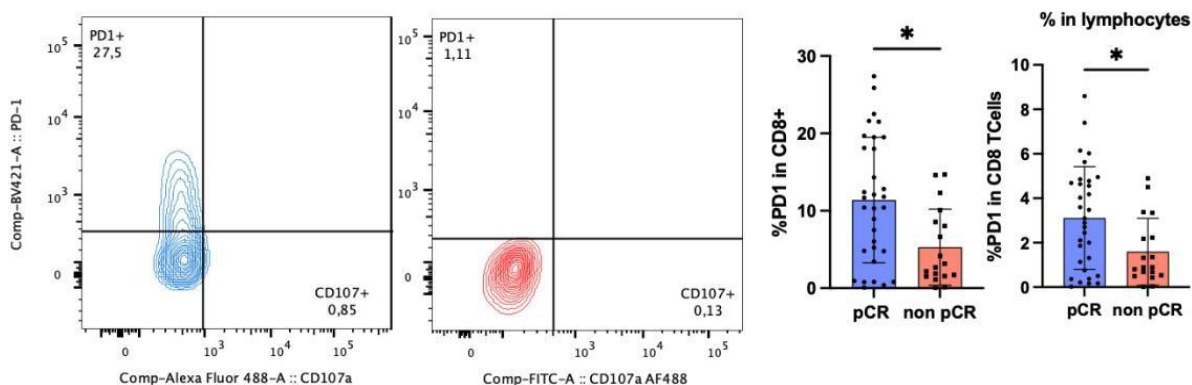


Fonte: Autoria própria.

Figura 17. Avaliação de células imunes em sangue fresco no tempo 1.

Legenda: Frequência relativa da expressão dos marcadores PD1 e CD69 nos linfócitos T CD4+ comparando os grupos respondedores (azul) (n=32) e não respondedores (vermelho) (n=18). As amostras foram adquiridas por citometria de fluxo multiparamétrica. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (*) $p < 0.05$.

Seguindo na avaliação do perfil celular em sangue fresco, notamos a maior expressão de PD1+ em linfócitos T CD8+ em pCR ($p=0.014$) e maior frequência de linfócitos T CD8+ PD1+ em respondedores ($p=0.037$) (Figura 18).



Fonte: Autoria própria.

Figura 18. Avaliação de células imunes no sangue fresco no tempo 1.

Legenda: Frequência relativa da expressão dos marcadores PD1 nos linfócitos T CD8+ comparando os grupos respondedores (azul) (n=32) e não respondedores (vermelho) (n=18). As

amostras foram adquiridas por citometria de fluxo multiparamétrica. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (*) $p < 0.05$.

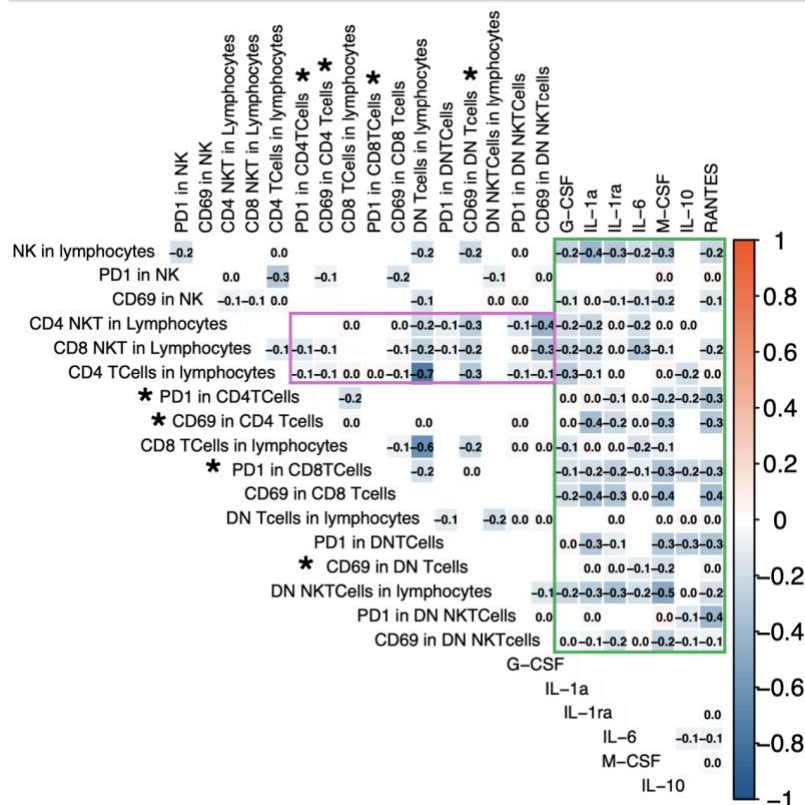
A expressão da molécula PD1 em linfócitos T chama atenção, principalmente por seu papel amplamente descrito como checkpoint imunológico. Sua principal função é impedir a ativação imunológica exacerbada, atuando como mecanismo de regulação para evitar danos teciduais e autoimunidade(79,80). No entanto, é importante destacar que PD1 é caracteristicamente expresso em linfócitos T recém-ativados, sendo induzido nas primeiras horas após a estimulação do TCR(81,82). Nesse contexto, a coexpressão de PD1 com o marcador de ativação CD69 reforça o fenótipo ativado desses linfócitos circulantes, sugerindo que, apesar do papel regulador associado ao PD1, essas células podem ainda estar funcionalmente ativas no momento da análise(83,84).

Na avaliação sistêmica, analisamos os mediadores solúveis de pacientes com CMTN previamente ao início do tratamento utilizando o sistema de suspensão Milliplex. A fim de explorar possíveis interações entre o perfil de ativação imune e o ambiente inflamatório circulante, correlacionamos os mediadores com as subpopulações linfocitárias detectadas no sangue periférico e a consequente expressão de marcadores. Essa análise permitiu identificar diferenças nos padrões de correlação entre pacientes respondedores e não respondedores, sugerindo perfil imunológicos distintos entre os dois grupos.

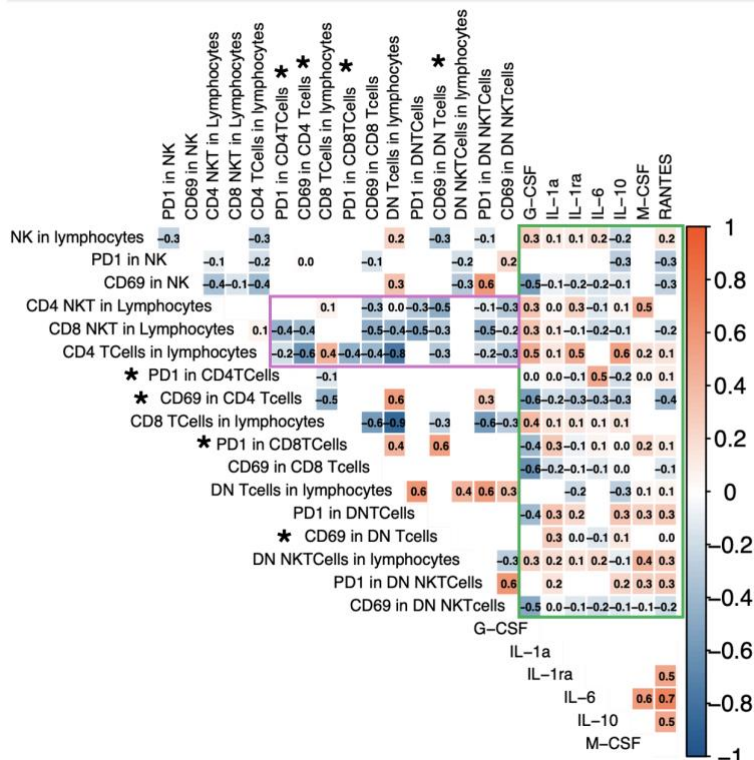
No grupo de respondedores, observamos que as moléculas CD69 e PD1 expressos em células como linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T DN apresentaram correlações negativas com citocinas inflamatórias, como IL6 e MCSF (caixa verde). Além disso, a expressão de PD1 em células T CD4⁺ mostrou correlações nulas ou levemente negativas com os mesmos mediadores, o que pode indicar um perfil de ativação mais regulado (Figura 19A).

Em contraste, no grupo de pacientes não respondedores, notamos uma inversão no padrão da resposta, com diversas correlações positivas entre as citocinas inflamatórias e marcadores de ativação em múltiplas subpopulações, como CD69⁺ em células T DN e PD1⁺ em células T CD8⁺ (caixa verde). Além disso, destacam-se as correlações positivas entre IL10 e marcadores em células TCD4 (Figura 19B).

A) pCR



B) Non pCR



Fonte: Autoria própria.

Figura 19. Matriz de correlação entre células circulantes e fatores solúveis.

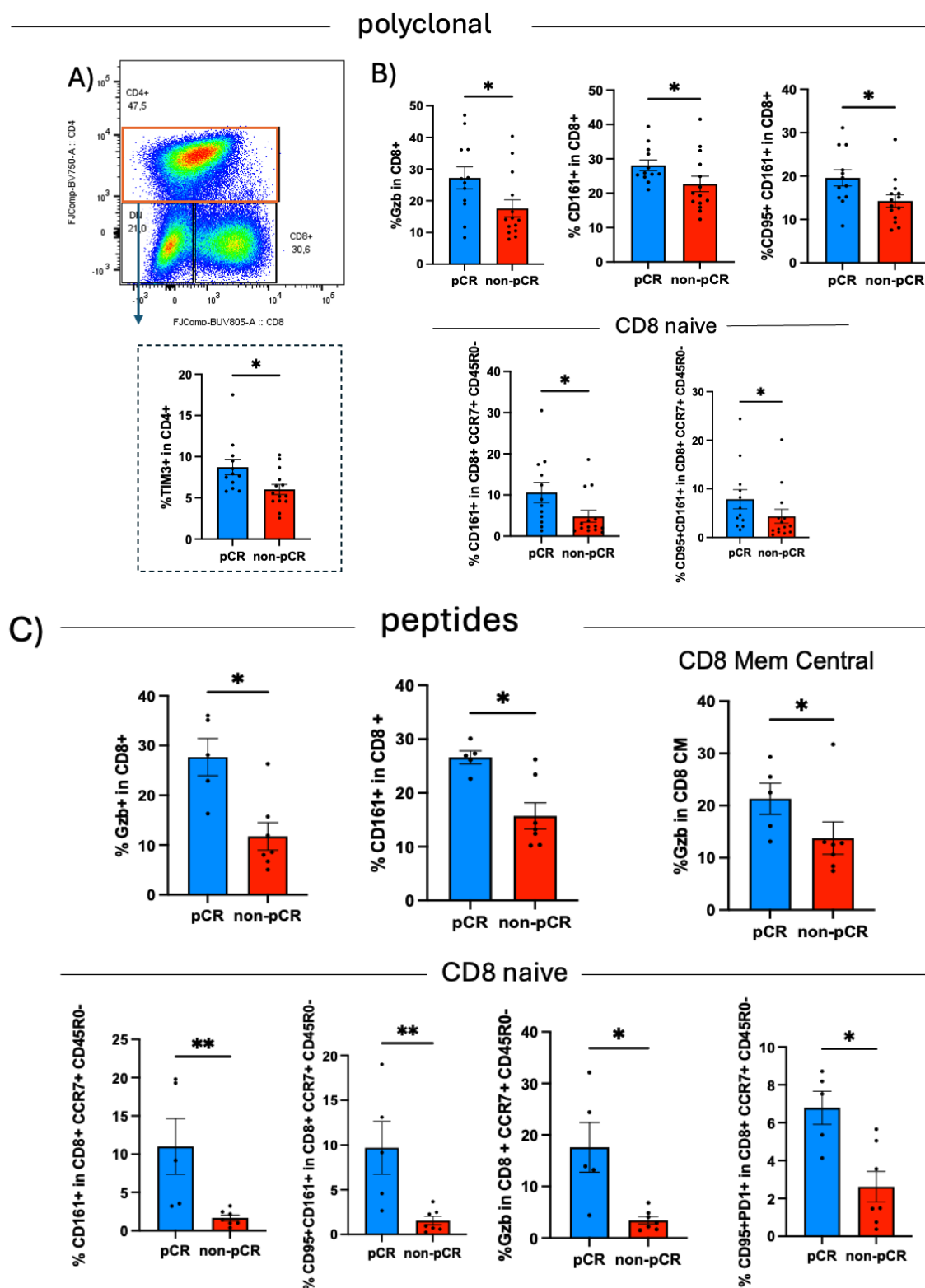
Legenda: (A) Matriz de correlação no grupo de pacientes respondedores (pCR, n=31) e não respondedores (NonpCR, n=16). As caixas rosas e verdes destacam as variáveis observadas diferentes entre os grupos de paciente. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste Spearman e apenas as correlações significativas ($p < 0.05$) são representadas.

Após a identificação das populações imunes no sangue fresco e suas correlações com fatores solúveis inibidores nos grupos de pacientes com desfechos clínicos distintos, prosseguimos com a caracterização mais aprofundada das PBMC. O objetivo foi realizar uma avaliação mais robusta das subpopulações celulares, incluindo a identificação do status de memória e ativação, bem como a produção de citocinas por essas subpopulações. Dessa forma, analisamos a frequência das subpopulações nos dois grupos de pacientes.

Como descrito na metodologia, as células foram estimuladas de duas maneiras, sendo: (1) um estímulo policlonal com anti-CD3 e anti-CD28, com o intuito de induzir ativação ampla e não específica das células T, e (2) estímulo antígeno-específico por meio da incubação com peptídeos selecionados, visando a detecção de respostas imunes direcionadas a epítomos específicos.

Em pacientes respondedores, observamos que o estímulo policlonal induziu maior expressão de TIM3 por linfócitos T CD4+ (Figura 20A), bem como maior expressão de Granzima B (Gzb), CD161 e a coexpressão de CD95 e CD161 em linfócitos T CD8+ (Figura 20B). Notamos também que linfócitos T CD8+ naive (CCR7+ CD54R0-) expressaram CD161 e coexpressaram CD161 e CD95 no mesmo grupo de pacientes (Figura 20B).

O estímulo antígeno-específico revelou que, em pacientes respondedores, houve uma maior expressão de Gzb e CD161 em linfócitos T CD8+. Além disso, verificou-se maior expressão desses marcadores e coexpressão de CD95 e CD161, assim como maior expressão individual de CD95 e PD1 em linfócitos T CD8+ naive. Observamos também maior expressão de Gzb em linfócitos T CD8+ de memória central (CCR7+ CD54R0+) (Figura 20C).



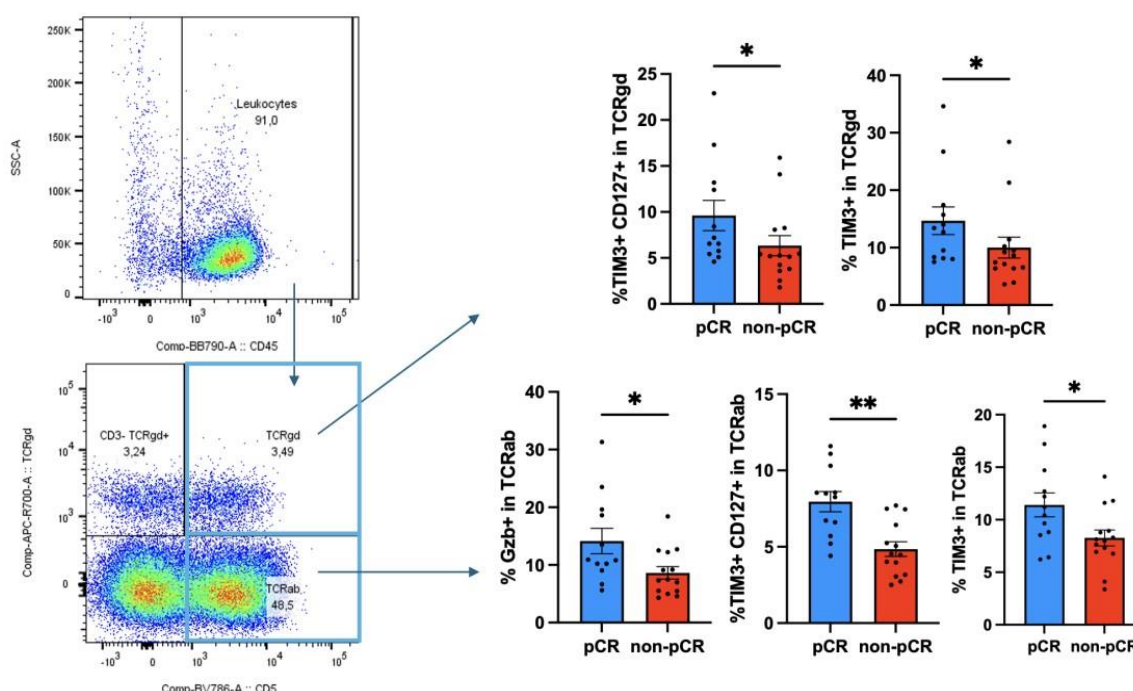
Fonte: Autoria própria.

Figura 20. População de células T CD4+ e TCD8+ em estímulo policlonal e antígeno específico.

Legenda: Avaliação da porcentagem de células CD4+ e CD8+, suas subpopulações e expressão de marcadores de ativação e exaustão em respondedores (pcR, azul) e não respondedores (nonpCR, vermelho) em PBMC por citometria de fluxo. (A) Célula T CD4+ com estímulo policlonal (anti-CD3 e

anti-CD28), (B) Células T CD8+ com estímulo policlonal (anti-CD3 e anti-CD28) (respondedores n=12 e não respondedores n=14). (C) Células T CD8+ com estimulação antígeno específico (peptídeos + anti-CD28) (respondedores n=5 e não respondedores n=7). As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (*) $p < 0.05$.

Seguindo com a análise supervisionada, o estímulo policlonal revelou que no grupo de pacientes respondedores há uma alta expressão de TIM3 e sua coexpressão com CD127 em células TCR $\gamma\delta$ e TCR $\alpha\beta$, além de alta expressão de Gzab em TCR $\alpha\beta$ (Figura 21).



Fonte: Autoria própria.

Figura 21. População de células imunes após estímulo policlonal.

Legenda: Avaliação da expressão dos marcadores TIM3, CD127 e Granzima B nas células TCR $\gamma\delta$ e TCR $\alpha\beta$ em respondedores (azul, n=12) e não respondedores (vermelho, n=14). As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (*) $p < 0.05$.

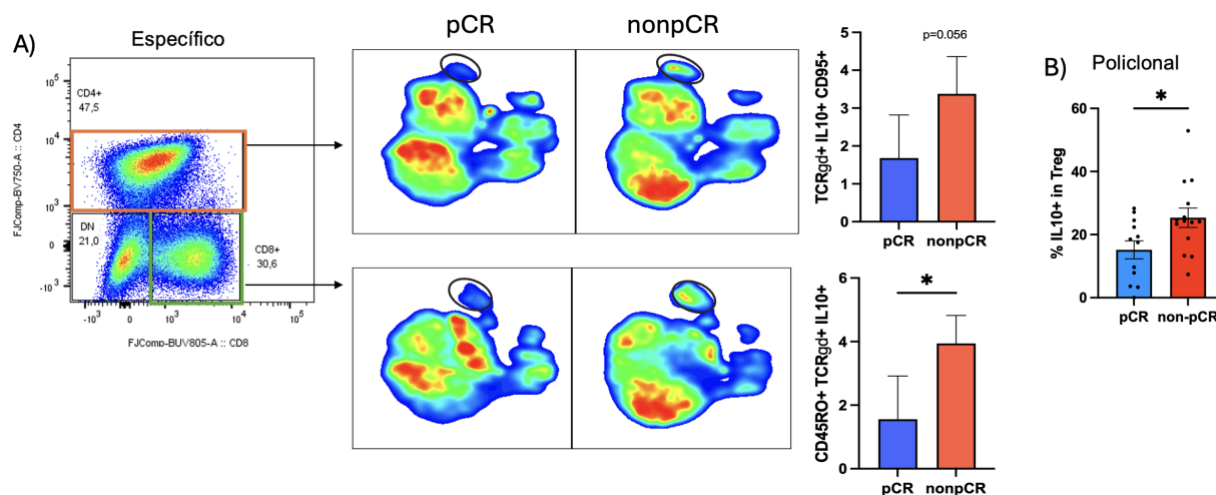
Apesar de ser comumente associada a fenótipos de exaustão, a expressão de TIM3 não deve ser interpretada isoladamente como indicativo de disfunção. Estudos apontam que TIM-3 também pode atuar como um receptor coestimulador, expresso após a ativação, e participar na indução de respostas efectoras de curta duração(85). No nosso estudo, a coexpressão de TIM3 com CD127 em células TCR $\gamma\delta$ e TCR $\alpha\beta$ no grupo de respondedores, associada à maior expressão de Granzima B, sugere um

perfil funcionalmente ativo. Além disso, a coexpressão de CD95 e CD161 em células CD8+ reforça um estado de ativação celular com potencial citotóxico.

Em seguida, realizamos a análise não supervisionada das amostras de PBMC com o objetivo de explorar padrões emergentes nos dados sem a introdução de viés prévio como as características celulares previamente definidas. Essa abordagem possibilitou uma avaliação mais abrangente da heterogeneidade imunológica, destacando perfis associados à resposta terapêutica.

Dessa forma, utilizamos o método UMAP para a redução de dimensionalidade e agrupamento celular com base nos marcadores avaliados. Através dessa avaliação nas subpopulações de linfócitos T CD4+ e TCD8+, identificamos a maior presença de uma subpopulação celular específica no grupo de pacientes não respondedores.

Em linfócitos T CD4+, essas células apresentaram uma coexpressão de TCR $\gamma\delta$, CD95 e IL10, enquanto nos linfócitos T CD8+, essas células foram caracterizadas pela coexpressão de CD45RO, TCR $\gamma\delta$ e IL10, e estavam significativamente mais frequentes em pacientes não respondedores (Figura 22A). Diante dos achados obtidos, buscamos investigar os linfócitos T reguladores (T reg) na análise supervisionada e notamos a maior expressão de IL10 em pacientes não respondedores (Figura 22B).



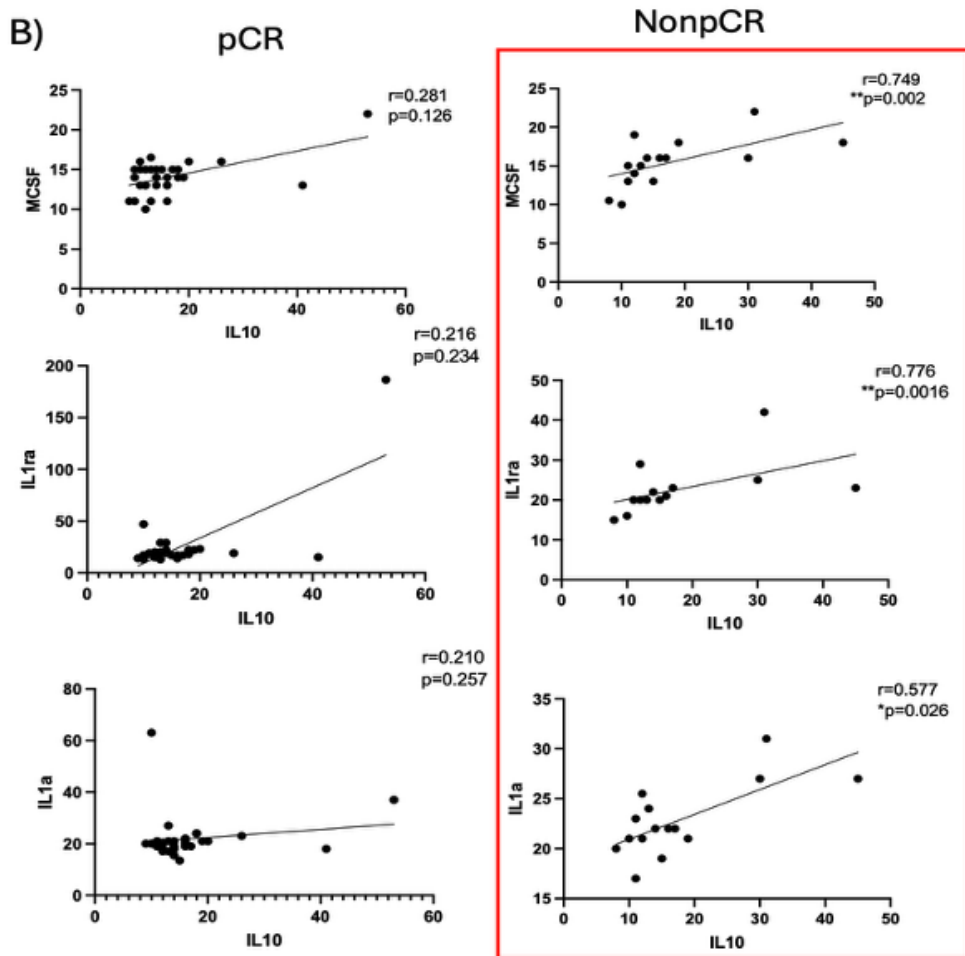
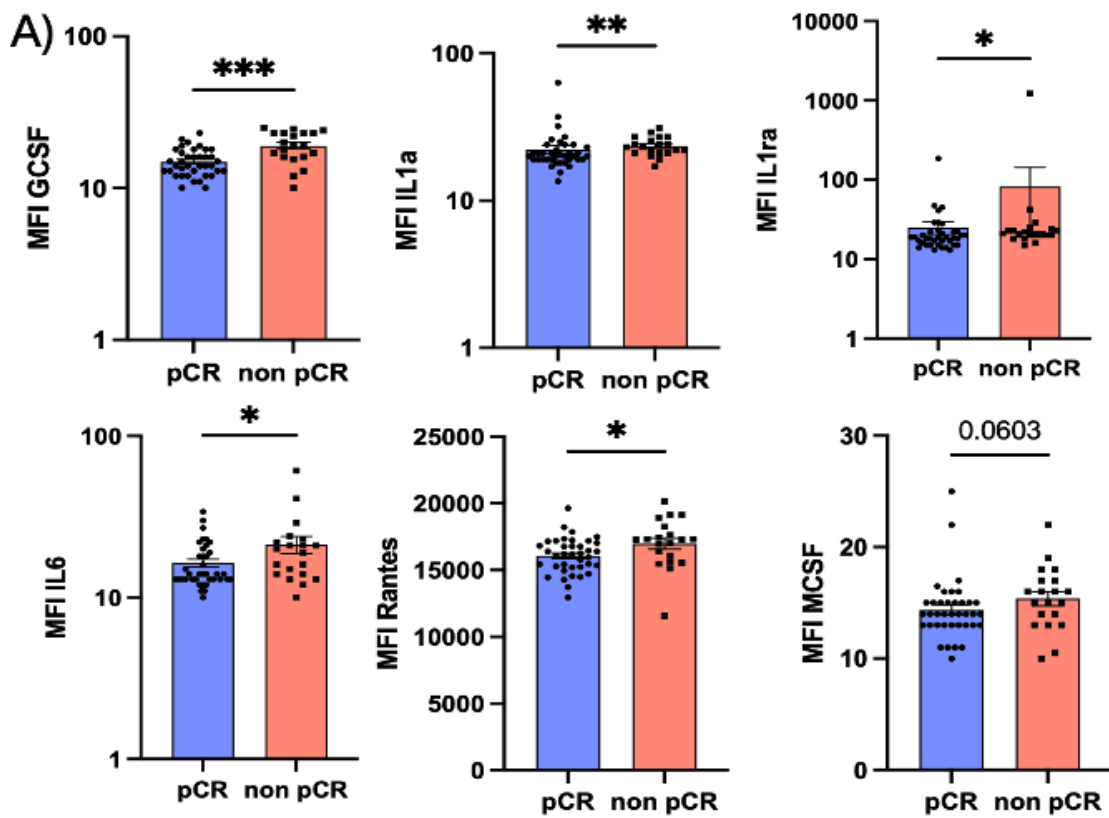
Fonte: Autoria própria.

Figura 22. Avaliação não supervisionada por UMAP das subpopulações de CD4+ e CD8+.

Legenda: (A) Avaliação não supervisionada através do plugin UMAP no software FlowJo das subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+, para concatenar populações através da expressão de marcadores. Identificação e caracterização de subpopulações diferentes entre os grupos de respondedores (azul, n=5) e não respondedores (vermelho, n=7). (B) Análise da expressão de IL-10

pela célula CD4⁺ T Reguladora em estímulo policlonal (anti-CD3 e anti-CD28) entre respondedores (azul, n=12) e não respondedores (vermelho, n=14). As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (*) $p < 0.05$.

Ao avaliar a diferença nos fatores solúveis entre os grupos de pacientes antes do tratamento, observamos que os pacientes não respondedores apresentaram maior intensidade média de fluorescência (MFI) para as citocinas GCSF, IL1-a, IL1-ra, IL6, Rantes e MCSF (Figura 23A). Para investigar se essas citocinas aumentadas em não respondedores se relacionavam ao alto nível de expressão de IL10 detectado em PBMC, avaliamos a correlação entre esses fatores. Essa análise revelou que pacientes não respondedores apresentaram uma correlação positiva entre a IL10 detectada no plasma de pacientes com as citocinas MCSF, IL1ra e IL1a, um perfil não observado no grupo de pacientes respondedores (Figura 23B).



Fonte: Autoria própria.

Figura 23. Fatores solúveis pré-tratamento e correlações em respondedor e não respondedor.

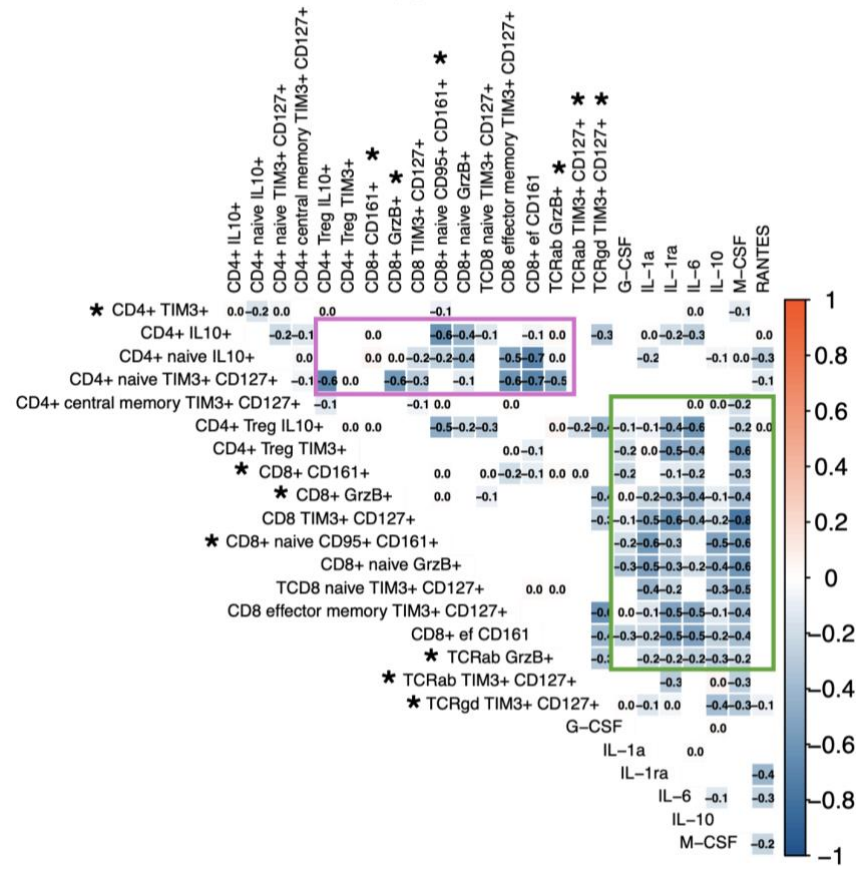
Legenda: (A) Concentração das citocinas e quimiocinas circulantes em Intensidade Média de Fluorescência (MFI) no grupo de pacientes respondedores (azul, n= 37) e não respondedores (vermelho, n= 20) pré-tratamento através do ensaio Milliplex™. (B) Correlação entre as citocinas MCSF, IL1ra e IL1a e a citocinas IL10, nos mesmos grupos de pacientes (respondedores n=31 e não respondedores n=15). As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (A) e Spearman (B) (*) $p < 0.05$.

Ao analisarmos as correlações entre as subpopulações de PBMC que apresentaram diferença significativas entre os grupos de pacientes e os níveis de citocinas, observamos padrões distintos em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento.

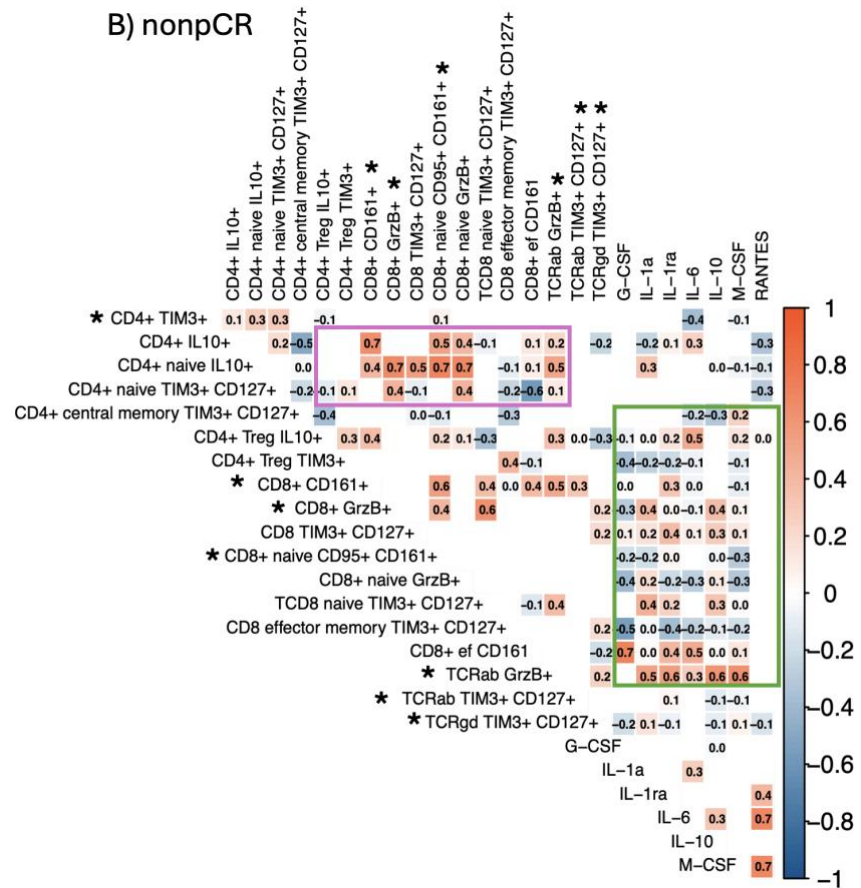
No grupo de pacientes respondedores, predominam novamente correlações negativas, especialmente entre as citocinas inflamatórias e as populações celulares mais frequentes nesse grupo, como CD8⁺ CD161⁺, CD8⁺ Gzb⁺, CD8⁺ TIM3⁺CD127⁺, CD8⁺ naive e CD8⁺ memória efetora (Figura 24A, caixa verde). Além disso, observamos correlações negativas entre populações CD4⁺ IL10⁺, CD4⁺ naive IL10⁺ e CD4⁺ naive TIM3⁺ CD127⁺ e as populações CD8⁺ naive CD95⁺CD161⁺ e CD8⁺ memória efetora (Figura 24A, caixa rosa).

Por outro lado, no grupo de pacientes não respondedores, as correlações são predominantemente positivas. Essas relações envolvem citocinas inflamatórias e subpopulações como TCRαβ GrzB⁺, CD8⁺ TIM3⁺ CD127⁺ e CD8⁺ efetoras CD161⁺ (Figura 24B, caixa verde). De forma semelhante, observam-se correlações positivas entre as células CD4⁺ IL10⁺, CD4⁺ naive IL10⁺ e diversas subpopulações de CD8⁺, incluindo CD161⁺, Gzb⁺, TIM3⁺CD127⁺, naive CD95⁺CD161⁺ e naive Gzb⁺ (Figura 24, caixa rosa).

A) pCR



B) nonpCR



Fonte: Autoria própria.

Figura 24. Matriz de correlação entre PBMC e fatores solúveis.

Legenda: (A) Matriz de correlação no grupo de pacientes respondedores (pCR, n=31). (B) Matriz de correlação no grupo de pacientes não respondedores (non pCR, n=15). As caixas rosa e verde destacam as variáveis observadas diferentes nos dois grupos de pacientes. Os * apontam as populações celulares aumentadas em respondedores na análise supervisionada do PBMC. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste Spearman e apenas as correlações significativas ($p < 0.05$) são representadas.

Até o momento, os resultados evidenciam um perfil imunológico inicial distinto entre os grupos de respondedores e não respondedores ao tratamento, destacando diferenças críticas na dinâmica de correlações celulares e na expressão de marcadores imunológicos.

Pacientes respondedores apresentaram um perfil mais coordenado, com correlações predominantemente negativas entre citocinas inflamatórias e subpopulações celulares, além de maior expressão de GzB, CD161 e CD95 em linfócitos T CD8, bem como coexpressão de CD127, TIM3 e GZB em células TCR $\gamma\delta$ e TCR $\alpha\beta$. Esse padrão sugere uma ativação funcional e direcionada, com preservação da citotoxicidade e menor sinal de exaustão, indicando uma resposta imune eficaz e potencialmente antitumoral, mas sem inflamação sistêmica exacerbada.

Em contraste, pacientes não respondedores exibiram um perfil caracterizado por desorganização funcional da resposta imune. Observou-se maior proporção de linfócitos T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ coexpressando TCR $\gamma\delta$ e IL-10, além de um padrão predominante de correlações positivas entre essas células e citocinas como IL10, IL1ra e GCSF. Também foram identificadas associações positivas entre subpopulações de DN e DN NKT com citocinas como RANTES e M-CSF. Esses dados sugerem um ambiente sistêmico inflamatório crônico, porém guiado por vias reguladoras, caracterizado pela coexistência de sinais ativadores e supressores, um padrão descrito como disfuncional e frequentemente associado à falha na resposta imune antitumoral(86–88)

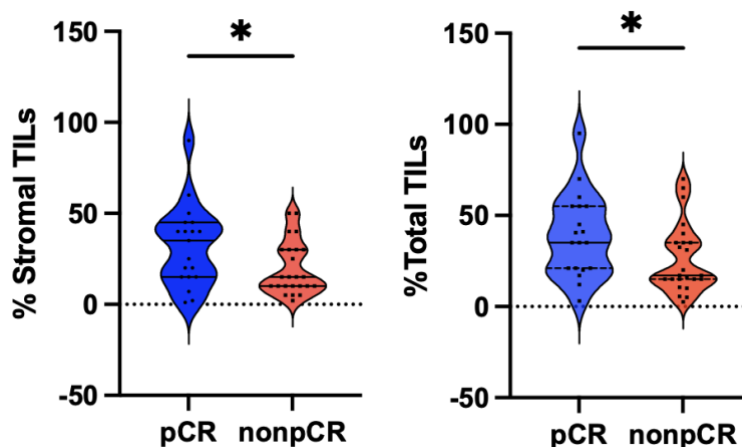
A atividade imunorreguladora das células Treg, incluindo a produção de IL-10, é um mecanismo conhecido de controle da resposta imune, inibindo diretamente a função das células efectoras (89). Em pacientes com câncer de mama, além das Tregs, IL-10 é produzida por monócitos, células com padrão Th2 e outros subtipos de células T e B, exercendo um papel importante na regulação da inflamação (90). Níveis

elevados de IL-10 e de monócitos clássicos já foram associados à menor taxa de resposta patológica completa em pacientes com câncer de mama HER2+ tratados com quimioterapia (91) Além disso, a presença sustentada dessa citocina na circulação ou no microambiente tumoral tem sido relacionada com o à progressão tumoral e menor sobrevida(92,93).

Adicionalmente, os níveis aumentados de IL-6 e RANTES (CCL5) em pacientes não respondedores, reforçam a existência de um ambiente inflamatório persistente. Estudo prévios mostraram que essas citocinas, além de promoverem ativação das células imunes, também favorecem a interação entre tumor e estroma linfático, facilitando migração, invasão e metástase(94). O padrão observado em nossos dados aponta para um estado inflamatório crônico, não efetivo e regulado, que em vez de promover controle tumoral pode estar favorecendo mecanismos de evasão tumoral e resistência terapêutica.

4.1.3. Relações entre o infiltrado linfocitário tumoral e a resposta imune periférica

Como mencionado na sessão de metodologia, avaliamos o infiltrado linfocitário tumoral (TIL) nas biópsias obtidas antes do início do tratamento. Na análise do TIL estromal, observamos níveis significativamente mais elevados em pacientes respondedores em comparação aos não respondedores. De forma consistente, a porcentagem total de TILs, considerando as regiões estromal e intratumoral, também foi maior no grupo de pacientes que apresentou resposta patológica (Figura 25).



Fonte: Autoria própria.

Figura 25. Nível de TILs em pacientes CMTN antes do tratamento

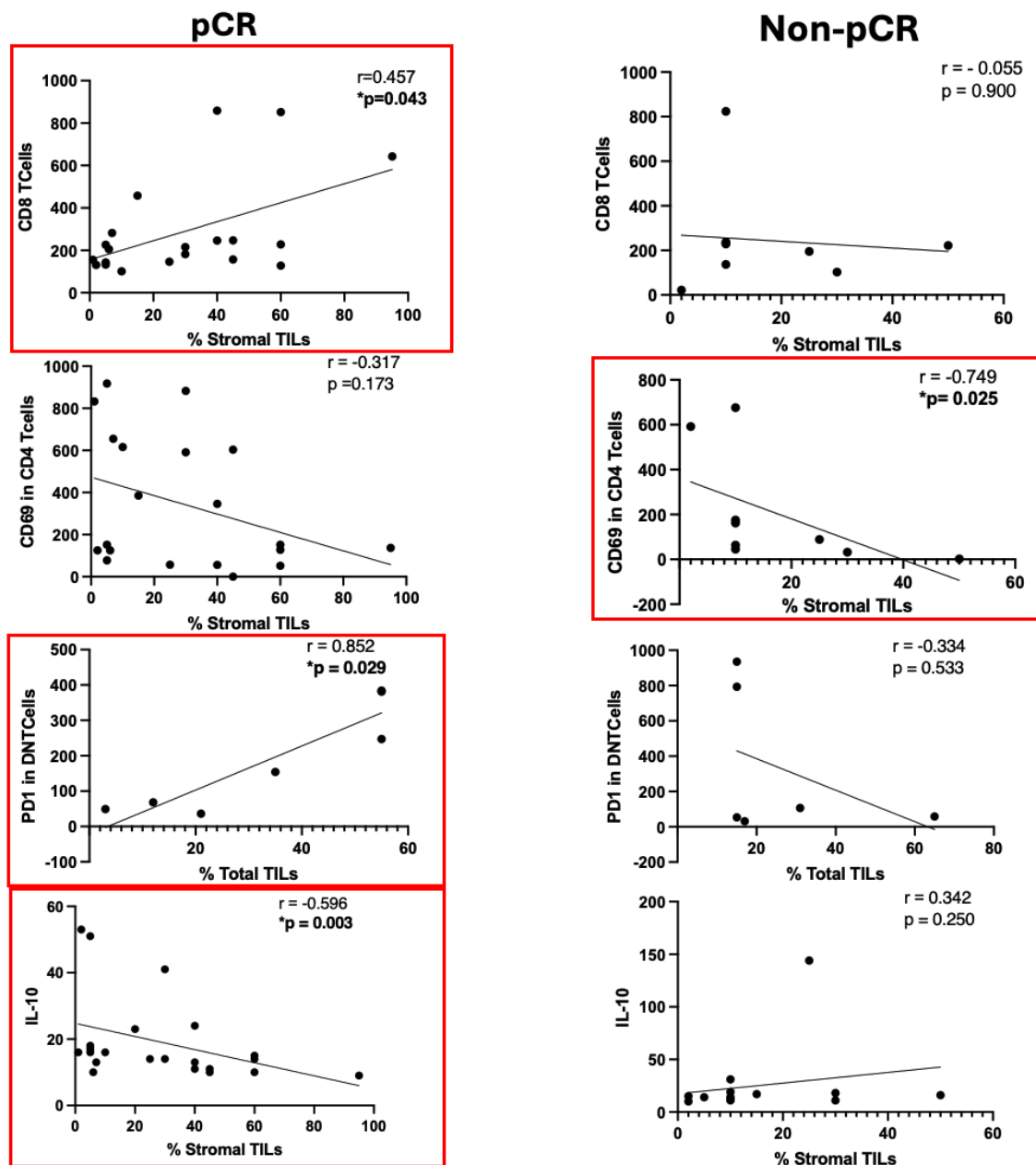
Legenda: Frequência relativa da porcentagem de TILs comparando os grupos de interesse. A porcentagem foi determinada por análise morfométrica em cortes histológicos corados com

hematoxilina e eosina (H&E). À esquerda, observa-se a quantificação dos TILs estromais nos grupos de respondedores (azul, n=19) e não respondedores (vermelho, n=24). À direita, apresenta-se a quantificação dos TILs totais, calculados como a soma dos TILs estromais e intratumorais, nos mesmos grupos de pacientes. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (*) $p<0.05$.

No intuito de investigar se a presença de TILs se relaciona ao perfil imunológico sistêmico, seja influenciando o perfil sistêmico ou sendo por ele modulada, avaliamos a correlação entre a porcentagem de TILs nas amostras tumorais e a frequência de subpopulações celulares de interesse e citocinas circulantes.

Em pacientes respondedores, observamos uma correlação positiva entre os níveis de TILs estromais e a frequência de células T CD8+ no sangue periférico ($r=0.457$; $p=0.043$). Além disso, o percentual total de TILs também se correlacionou positivamente com a expressão de PD1 em células DN ($r=0.852$; $p=0.029$). Por outro lado, observou-se uma correlação negativa entre TILs estromais e os níveis plasmáticos de IL-10 ($r=-0.695$; $p=0.003$) nesse grupo de pacientes (Figura 26).

Em pacientes não respondedores, a única correlação significativa observada foi uma correlação negativa entre TILs estromais e a frequência de CD69+ em células T CD4+ ($r=-0.749$; $p=0.025$) (Figura 26). As demais variáveis não apresentaram correlações estatisticamente significativas.



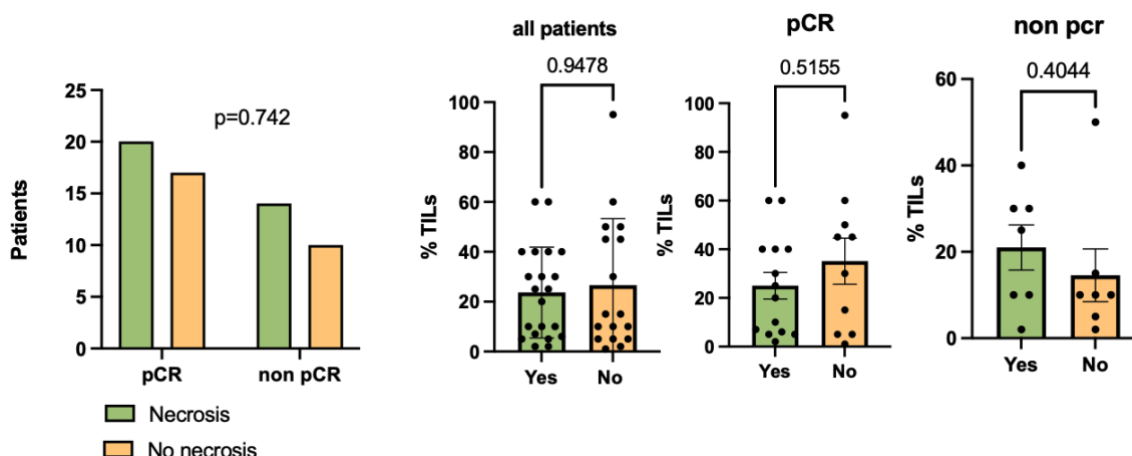
Fonte: Autoria própria.

Figura 26. Correlação entre infiltrados tumorais e fatores de interesse.

Legenda: As análises de correlação foram realizadas separadamente nos grupos de respondedores (pCR, n=20) e não respondedores (nonpCR, n=9), (com exceção da correlação entre IL-10 e TILs, na qual o número de pacientes foi de pCR n=22 e nonpCR n=13). Avaliaram-se as associações entre a porcentagem de linfócitos infiltrantes totais ou estromais (avaliados por HE) e os seguintes parâmetros circulantes: linfócitos TCD8+, linfócitos TCD4+ expressando CD69+, células DN expressando PD1 e níveis plasmáticos da citocina IL-10. As células foram detectadas por citometria de fluxo, a citocina IL10 foi medida através da técnica Milliplex. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Spearman (*) $p<0.05$.

Considerando a hipótese de que a ausência de resposta terapêutica em alguns pacientes possa estar relacionada a um microambiente tumoral imunossuprimido, investigamos a presença de necrose tumoral como um fator associado à disfunção tecidual local. A necrose, frequentemente associada a regiões de hipóxia e baixa vascularização, pode refletir um ambiente tumoral inadequado para ativação e recrutamento celular. Em nossa avaliação, a necrose foi observada em 58% dos pacientes não respondedores e 54% dos pacientes respondedores, sem diferença significativa entre os grupos ($p=0.742$, Figura 27).

Também investigamos se a presença de necrose tumoral se associaria aos níveis de infiltrado, com o objetivo de avaliar um possível impacto no recrutamento das células imunes ao TME. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre a presença de necrose e os níveis de TILs estromais em nossa coorte, tanto em respondedores quanto não respondedores (Figura 27).



Fonte: Autoria própria.

Figura 27 . Presença de necrose e associação com níveis de infiltrado tumoral.

Legenda: À esquerda, apresentamos a frequência absoluta de pacientes com presença (Necrosis – verde) ou ausência (No necrosis – laranja) de necrose tumoral nos grupos respondedores (pCR: com necrose $n=20$ e sem necrose $n=17$) e não respondedores (non pCR com necrose $n=14$ e sem necrose $n=10$). Nos gráficos à direita, comparamos a porcentagem de TILs estromais entre pacientes com ou sem necrose, considerando todos pacientes (all patients, Yes $n=21$, No $n=17$), apenas respondedores (pCR, Yes $n=15$, No $n=10$) e apenas não respondedores (non pCR, Yes $n=7$ e No $n=7$). As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Chi-square e Mann-Whitney (*) $p<0.05$.

Nossos achados vão de acordo com dados prévios da literatura, que apontam que níveis elevados de TILs como um possível marcador de melhor resposta

terapêutica, especialmente em câncer de mama triplo negativo (42,95,96) Além disso, nossos resultados reforçam dados obtidos em análises anteriores conduzidas em nosso trabalho anterior no qual já havia sido observado uma associação entre infiltração linfocitária e resposta patológica, embora em uma coorte reduzida (97).

Buscando explorar possíveis conexões entre o TME e o sistema imune periférico, analisamos a correlação entre a presença de TILs e variáveis imunológicas sistêmicas em ambos os grupos. Em pacientes respondedores, observamos uma correlação positiva entre TILs estromais e a frequência de células T CD8+ circulantes, sugerindo uma possível integração ente funcional entre a resposta imune periférica e a infiltração tumoral. Além disso, a correlação positiva entre TILs totais e a expressão de PD1 em células DN pode refletir um estado de ativação ou recrutamento desses linfócitos para o TME(44,45). Já a correlação negativa entre TILs estromais e os níveis solúveis de IL-10 reforçam a hipótese de que resposta sistêmicos menos reguladores, com baixa atividade de citocinas imunossupressoras podem favorecer a migração e retenção de células efetoras no tecido tumoral(98,99).

Por outro lado, em pacientes não respondedores, a única correlação significativa observada foi negativa entre os TILs estromais e a expressão de CD69 em células T CD4+, o que pode indicar um desequilíbrio entre a ativação periférica e o recrutamento ao sítio tumoral. A ausência de correlações consistentes entre os compartimentos sistêmico e tumoral nesse grupo pode refletir uma desorganização funcional, com ativação periférica, mas sem impacto efetivo sobre o TME. Esses dados reforçam a ideia de que a falta de coordenação entre esses compartimentos pode comprometer a efetividade da resposta antitumoral e consequente resposta ao tratamento(100,101).

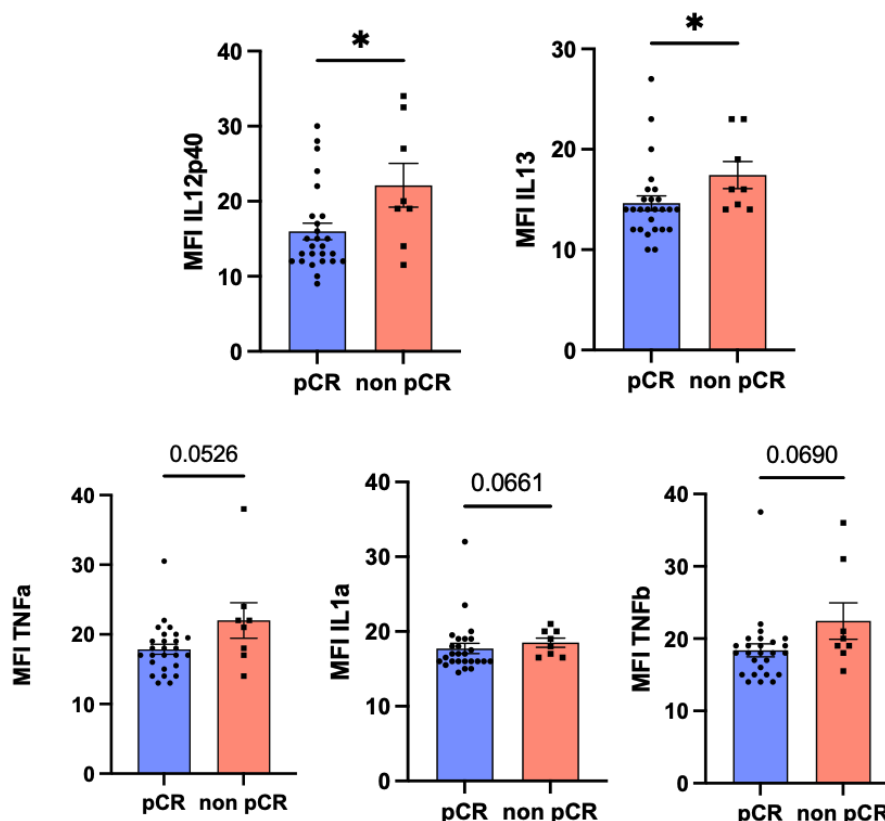
A investigação da necrose tumoral como um possível indicativo de disfunção tecidual ou fator impeditivo de infiltração imune não revelou diferenças significativas entre os grupos. Além disso, a ausência de associação entre necrose e níveis de TILs estromais sugere que esse parâmetro não teve impacto direto sobre a atividade imune local ou eficácia do tratamento em nossa coorte.

4.1.4. Caracterização imunológica sistêmica pós-tratamento

Com o objetivo de compreender como o perfil imunológico sistêmico se apresenta após a quimioterapia neoadjuvante e como essas características podem influenciar a resposta terapêutica, investigamos a composição celular do sangue periférico e os níveis de citocinas circulantes no final da quimioterapia. Essa análise

no Tempo 2 permitiu explorar os efeitos do tratamento sobre a resposta imune e identificar possíveis mecanismos de respostas associados à efetividade clínica nos dois grupos de pacientes.

Ao avaliarmos os fatores solúveis no plasma de pacientes após a quimioterapia, nós identificamos o aumento das citocinas IL12p40, IL13, TNF α , IL1a e TNFb em pacientes não respondedoras em comparação com as respondedoras. Entre os resultados observados no início do tratamento, apenas a concentração da citocina IL1a se manteve alta nesse grupo de pacientes (Figura 28).



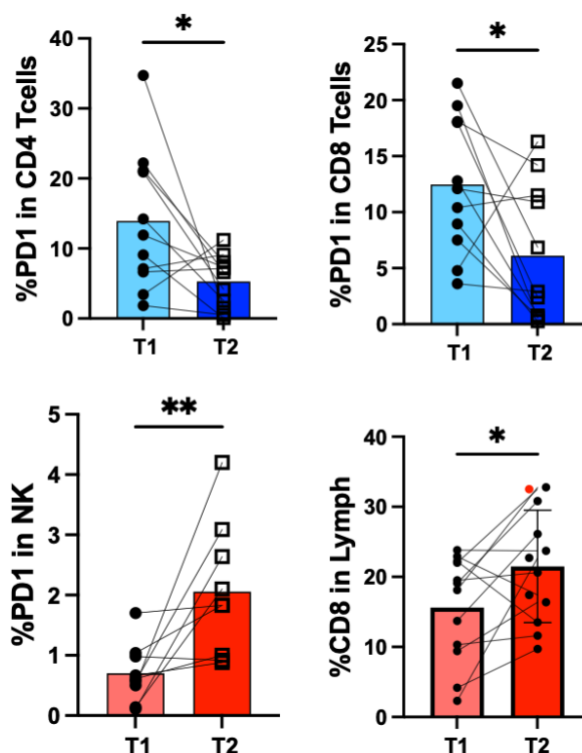
Fonte: Autoria própria.

Figura 28. Perfil solúvel pós-tratamento.

Legenda: Comparação das citocinas e quimiocinas circulantes em Intensidade Média de Fluorescência (MFI) no grupo de pacientes respondedores (azul, n=37) e não respondedores (vermelho, n=20) após tratamento através do ensaio Milliplex™. As análises estatísticas foram realizadas através do teste Mann-Whitney (*) p<0.05.

Na avaliação do perfil celular no sangue fresco, não observamos nenhuma diferença entre as populações celulares entre o grupo de respondedores e não respondedores. Entretanto, ao avaliarmos a porcentagem de população celulares entre o Tempo 1 e o Tempo 2 em nossa coorte, observamos que pacientes respondedores apresentaram uma diminuição da expressão de PD1 em células

TCD4+ e TCD8+ (Figura 29). Por outro lado, o grupo de pacientes não respondedores mostrou um aumento da expressão de PD1 em células NK após o tratamento, além do aumento de células T CD8+ (Figura 29).



Fonte: Autoria própria.

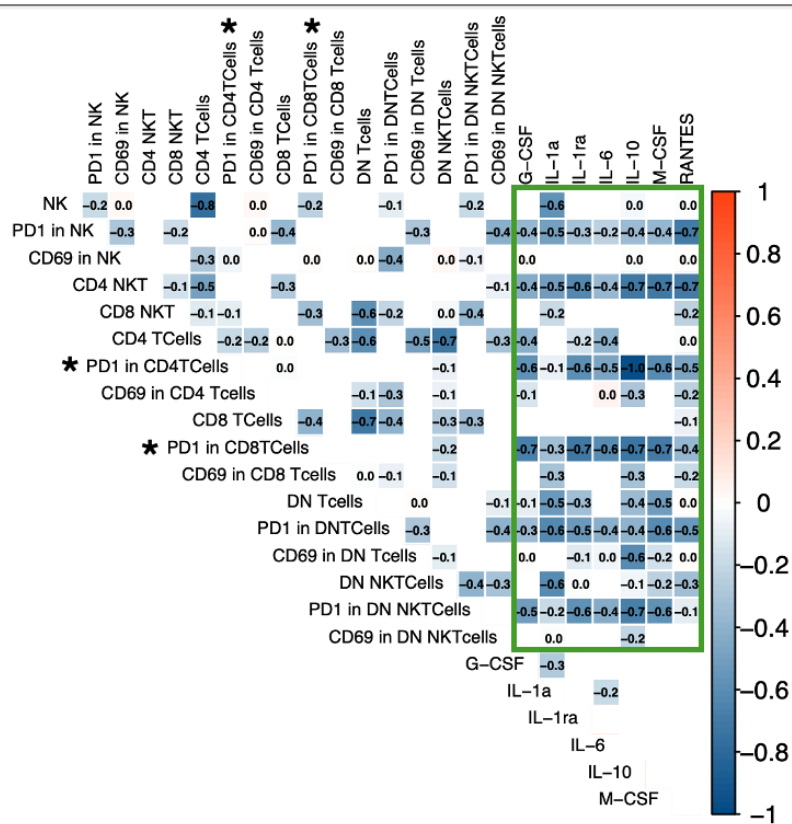
Figura 29. Perfil celular pós-tratamento.

Legenda: Frequência relativa da expressão dos marcadores PD1 em células T CD4+ e T CD8+ em respondedores (n= 11) comparando o Tempo 1 (azul claro) e Tempo 2 (azul escuro). Frequência relativa da expressão do marcador PD1 em células NK e a frequência de células T CD8+ no grupo de não respondedores (n=11) comparando o Tempo 1 (vermelho claro) e Tempo 2 (vermelho escuro). As análises estatísticas foram realizadas através do teste Kruskal-Wallis (*) p<0.05.

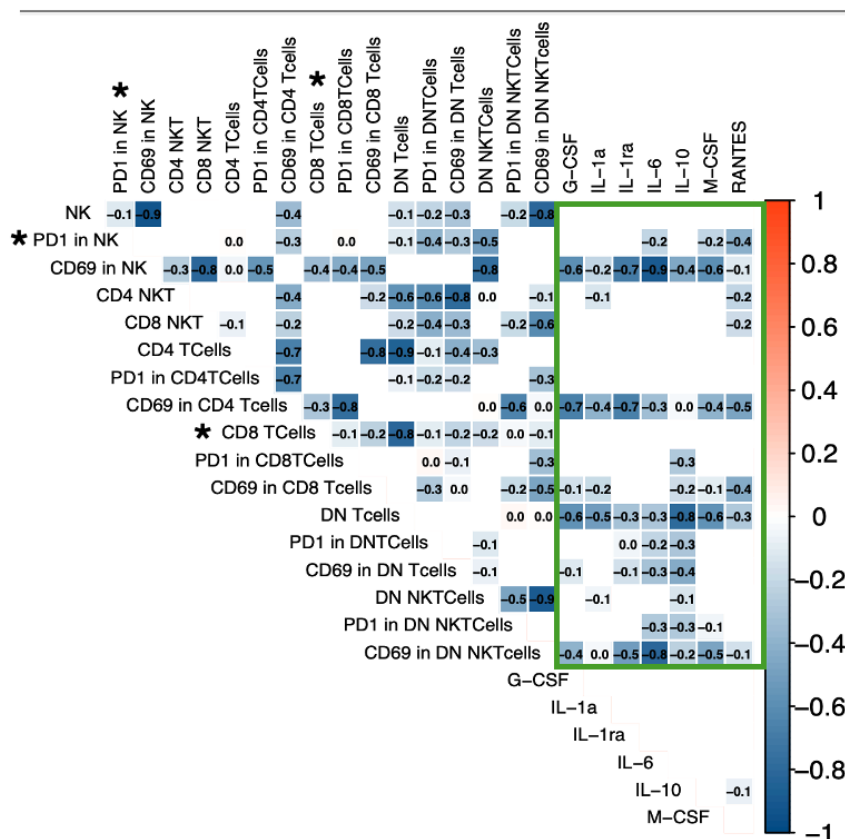
Para melhor compreender a associação entre os fatores solúveis e as populações imunológicas entre os grupos após o tratamento, nós realizamos uma matriz de correlação entre esses fatores.

No grupo respondedor, pacientes mantiveram um padrão de correlações negativas entre a expressão de marcadores de ativação (CD69 e PD1) em linfócitos periféricos e os níveis de citocinas inflamatórias sistêmicas, como IL-6, M-CSF e IL-1 β (Figura 30). Em contraste, no grupo de pacientes não respondedores, as correlações observadas entre os marcadores de ativação e as citocinas inflamatórias foram mais dispersas e de menor intensidade, além de não manterem um padrão consistente (Figura 30).

A) pCR



B) nonpCR



Fonte: Autoria própria.

Figura 30. Matriz de correlação entre células circulantes e fatores solúveis pós-tratamento.

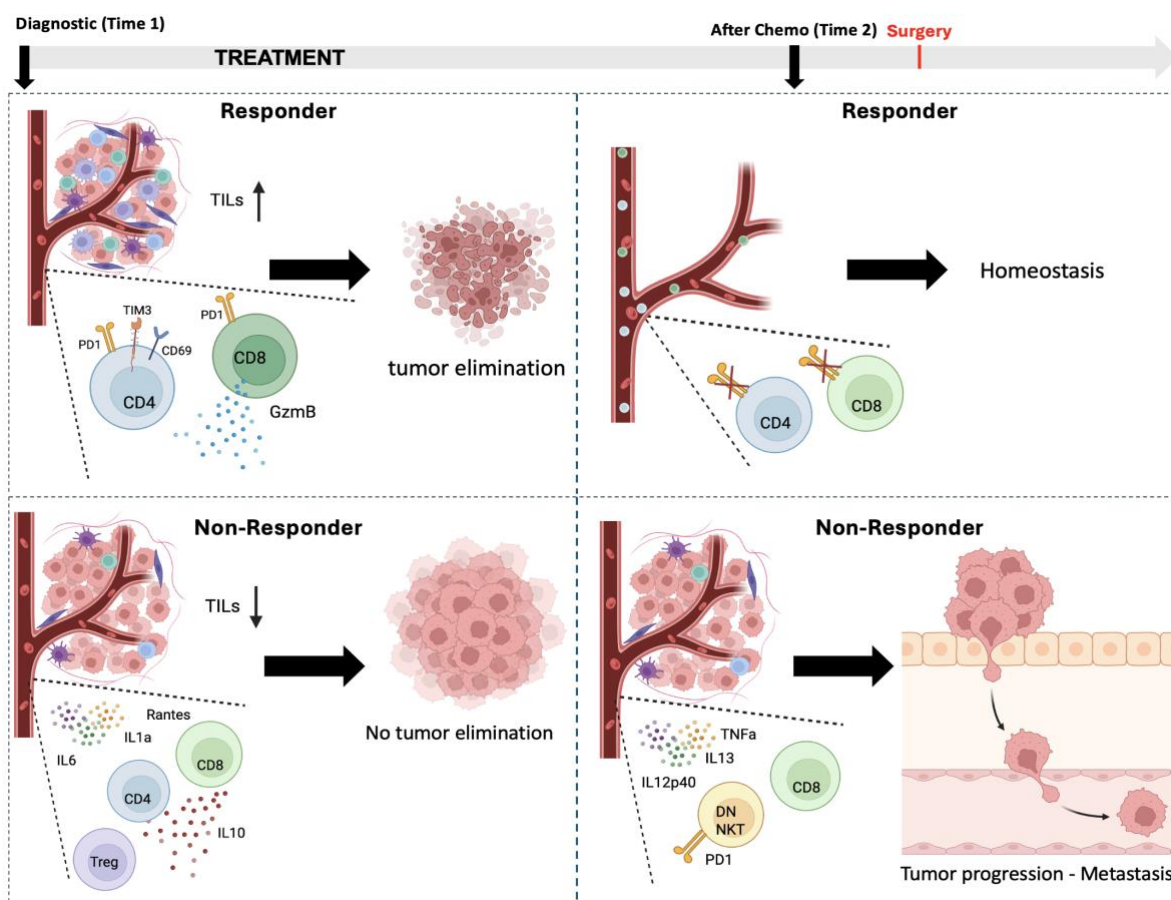
Legenda: (A) Matriz de correlação no grupo de pacientes respondedores (pCR, n=9). (B) Matriz de correlação no grupo de pacientes não respondedores (NonpCR, n=8). As caixas verdes destacam as variáveis observadas diferentes nos dois grupos de pacientes. Os * apontam as populações células aumentadas em respondedores na análise supervisionada do PBMC. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste Spearman e apenas as correlações significativas ($p < 0.05$) são representadas.

O perfil observado no grupo respondedor após o tratamento se manteve semelhante ao identificado no início do tratamento, indicando uma resposta imune funcional persistente e associada a níveis reduzidos de inflamação sistêmica. A redução da expressão de PD1 observada entre o Tempo 1 e o Tempo 2 nesse grupo reforça esse cenário, com menor sinal de exaustão celular. Esse equilíbrio pode favorecer uma resposta antitumoral eficaz sem provocar um quadro inflamatório exacerbado.

Em relação ao grupo de pacientes não respondedores, os dados obtidos após a quimioterapia indicam, novamente, um padrão imunológico sistêmico novamente desregulado e potencialmente inflamatório. As correlações entre marcadores de ativação e citocinas inflamatórias foram mais dispersas, de baixa intensidade e sem consistência funcional aparente.

Também é notado um aumento da expressão de PD1 em células NK, acompanhado de elevação na frequência de células T CD8+, sugerindo ativação imune sem coordenação efetora. Nos fatores solúveis, foram detectados altos níveis de IL12p40, IL13, TNF α , IL1 α e TNF β quando comparados aos respondedores, reforçando a presença da inflamação sistêmica. Dentre essas citocinas, apenas a IL1 α se manteve elevada desde o início do tratamento. Esse conjunto de achados sugere que, mesmo diante de uma ativação imune aparente, há falhas na efetividade e modulação adequada da resposta refletindo em um estado inflamatório crônico e disfuncional, desfavorável a eliminação tumoral.

A partir da análise integrativa entre os compartimentos sistêmicos e tumoral, observamos que em pacientes não respondedores apresentaram um padrão imunológico caracterizado por inflamação persistente, aumento da expressão de marcadores reguladores e ausência de coordenação funcional com o microambiente tumoral. Ainda que antes do tratamento esse grupo já demonstrasse uma ativação imune desorganizada, com elevação de citocinas como IL-6, IL-10 e RANTES, esse perfil se manteve ou foi agravado após a quimioterapia. No pós-tratamento, identificamos o aumento da produção de citocinas inflamatórias como IL1 α , TNF β e IL12p40, além da elevação da expressão de PD1 em células circulantes e células T CD8+, o que sugere uma ativação contínua e potencialmente exausta, sem direcionamento efetivo ao tumor (Figura 31).



Fonte: Autoria própria.

Figura 31. Revisão da análise imunometabólico em tumores murinos.

Legenda: No painel superior, representando pacientes respondedores, observa-se um microambiente tumoral rico em TILs, com um perfil imunológico circulante composto por células T CD4+ e T CD8+ expressando marcadores como PD1, CD69 e TIM3, além da produção de granzima B. Esse contexto favorece a eliminação tumoral durante o tratamento e o restabelecimento da homeostase imunológica após a quimioterapia. Abaixo, o painel inferior representa os pacientes não respondedores, caracterizados por baixa infiltração de TILs, presença de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 α , RANTES e IL-10, além de linfócitos Tregs e células DN NKT expressando PD1. A presença de marcadores inflamatórios e imunossupressores sugere uma resposta descoordenada, resposta imune e favorecimento à progressão tumoral e metástase.

Esse cenário inflamatório crônico, desregulado e resistente à modulação terapêutica vai de acordo com a literatura em relação a desorganização funcional da atividade periférica em modelos tumorais (100). Mesmo diante de estímulos imunológicos ou intervenção terapêutica, a resposta imune se mantém desregulado, com menor plasticidade e capacidade de adaptação. Dessa forma a ativação adequada das APCs fica comprometida, prejudicando o recrutamento de linfócitos para o TME.

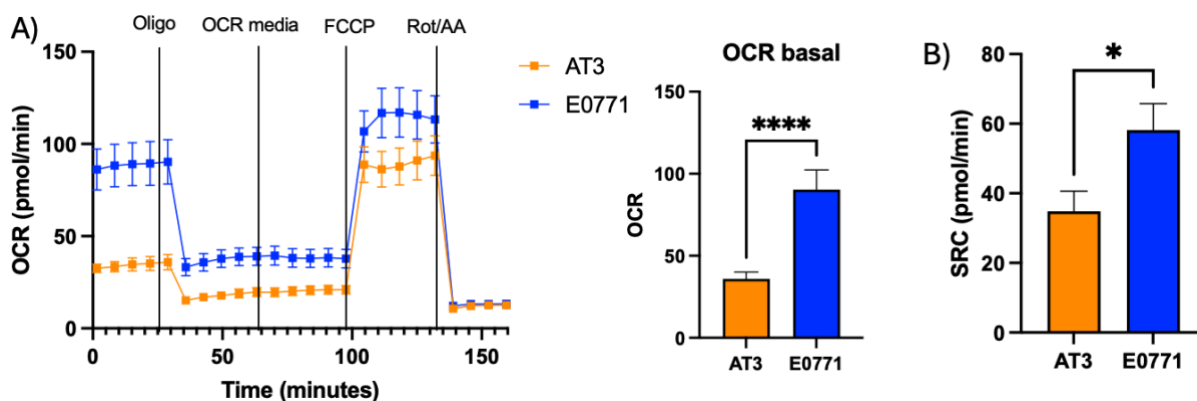
Adicionalmente, a produção persistente de mediadores inflamatórios como TNF β , IL1 α e RANTES pode ser sustentada por interações entre o tumor, células do estroma tumoral e células inflamatórias, o que favorece um ambiente estimulador da angiogênese, evasão e progressão tumoral (102,103). Esse cenário de inflamação disfuncional pode ativar vias como NF- κ B, STAT3 e PGE2, já implicadas na resistência à quimioterapia e na promoção de fenótipos agressivos do câncer de mama(102,104,105)

4.2. Avaliação imunometabólica dos tumores murinos

Com o objetivo de aprofundar a compreensão sobre os mecanismos que podem estar por trás da desregulação imunológica observada em pacientes que não respondem ao tratamento, direcionamos nossa investigação para o contexto imunometabólico do microambiente tumoral. Como descrito anteriormente, foi nesse intuito que realizamos um estágio de pesquisa no laboratório do Dr. Greg Delgoffe (University of Pittsburgh), referência na área de imunometabolismo do câncer. Durante esse período, nós conduzimos experimentos utilizando dois modelos murinos de CMTN, com o propósito de explorar como alterações metabólicas no TME poderiam impactar a funcionalidade das células T e contribuir para a falha da resposta imune antitumoral.

4.2.1. Caracterização das linhagens tumorais

Para compreender a relação entre os perfis metabólicos das linhagens celulares AT3 e E0771 e seu crescimento tumoral, realizamos a avaliação mitocondrial através do ensaio Seahorse. Nessa análise, observamos que a linhagem E0771 apresentou um consumo de oxigênio mitocondrial significativamente maior, tanto em níveis basais quanto máximos, em comparação com a linhagem AT3, indicando uma atividade metabólica mais elevada (Figura 32). A capacidade respiratória de reserva (SRC) da linhagem E0771 mostrou níveis significativamente elevados, sugerindo uma maior flexibilidade metabólica em condições de estresse comparada a linhagem AT3 (Figura 32).

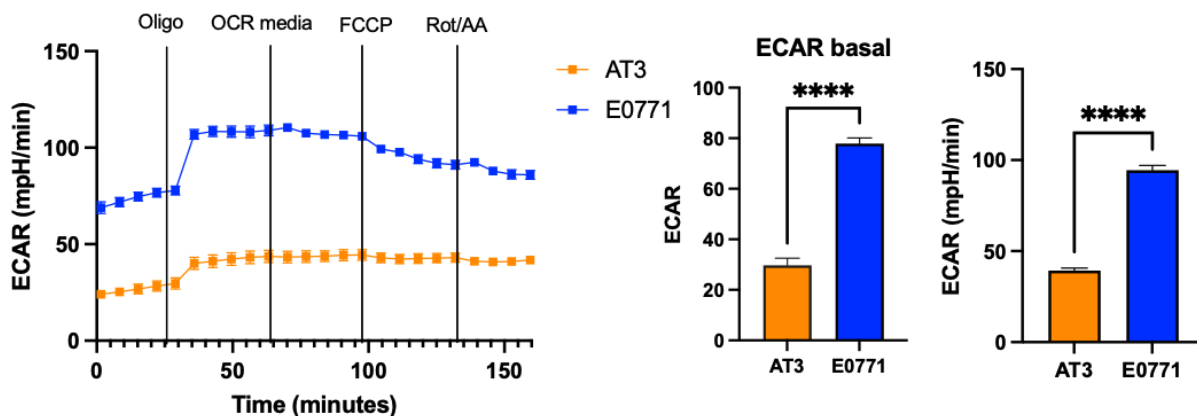


Fonte: Autoria própria.

Figura 32. Caracterização metabólica de AT3 e E0771.

Legenda: Taxas representativas de consumo de oxigênio (OCR) das linhagens AT3 (laranja) e E0771(azul), com comparação quantitativa do OCR basal (A) e capacidade respiratória de reserva (SRC pmol/min). As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA (*) $p < 0.05$.

Além disso, a taxa de acidificação extracelular (ECAR) revelou que E0771 possui taxas basais e totais de acidificação mais altas, o que indica uma maior produção de ácido lático e outros produtos da glicólise (Figura 33). Essas características destacam o perfil metabólico distintos da linhagem E0771 em relação à AT3.

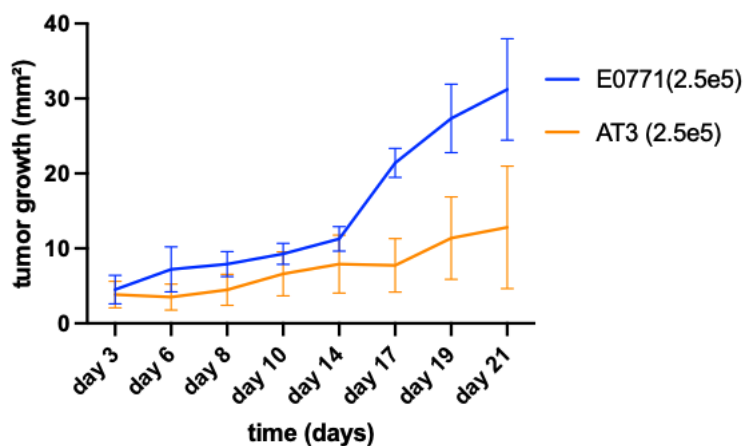


Fonte: Autoria própria.

Figura 33. Caracterização metabólica de AT3 e E0771.

Legenda: Taxas representativas de acidificação extracelular (ECAR) das linhagens AT3 (laranja) e E0771(azul), com comparação quantitativa da ECAR basal e total. As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA (*) $p < 0.05$.

Na avaliação do crescimento tumoral *in vivo*, observamos que, embora o mesmo número de células ($2,5 \times 10^5$) tenham sido injetados em camundongos distintos, a linhagem tumoral E0771 apresentou um crescimento mais acelerado, alcançando 150 mm^2 no intervalo de 7 dias. Em contraste, a linhagem AT3 demorou aproximadamente 3 semanas para atingir o mesmo tamanho (Figura 34).



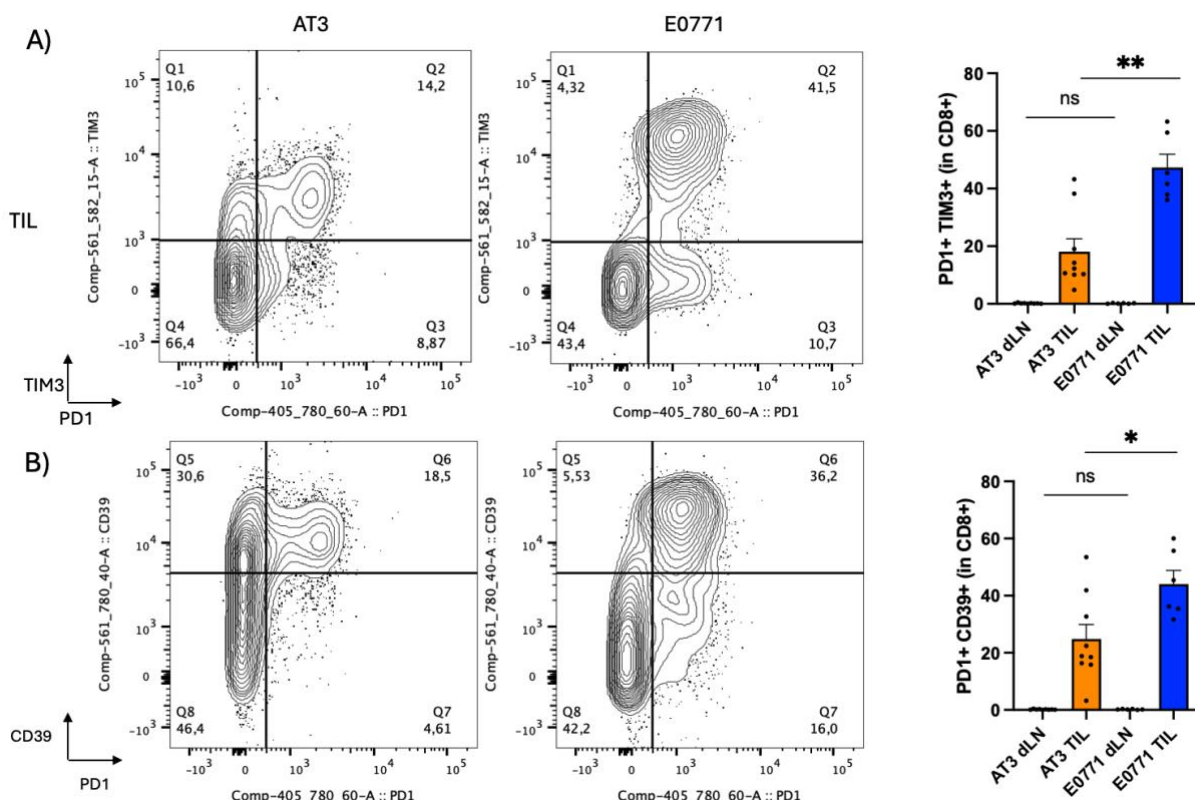
Fonte: Autoria própria.

Figura 34. Avaliação do crescimento tumoral.

Legenda: Avaliação do crescimento tumoral em camundongos implantados com $2,5 \times 10^5$ células das linhagens murinas de CMTN E0771 (azul, n=3) e AT3 (laranja, n=3). O volume tumoral foi monitorado ao longo de 21 dias. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão.

4.2.2. Avaliação do infiltrado imunológico nos tumores murinos

Avaliamos o microambiente tumoral dos modelos murinos por meio da análise por citometria de fluxo dos TILs, aproximadamente 21 dias após a injeção do tumor. Nos tumores E0771, observamos níveis mais elevados de linfócitos T CD8+ coexpressando os marcadores de exaustão PD1 e TIM3, além de PD1 e CD39, em comparação com os tumores AT3 (Figura 35).

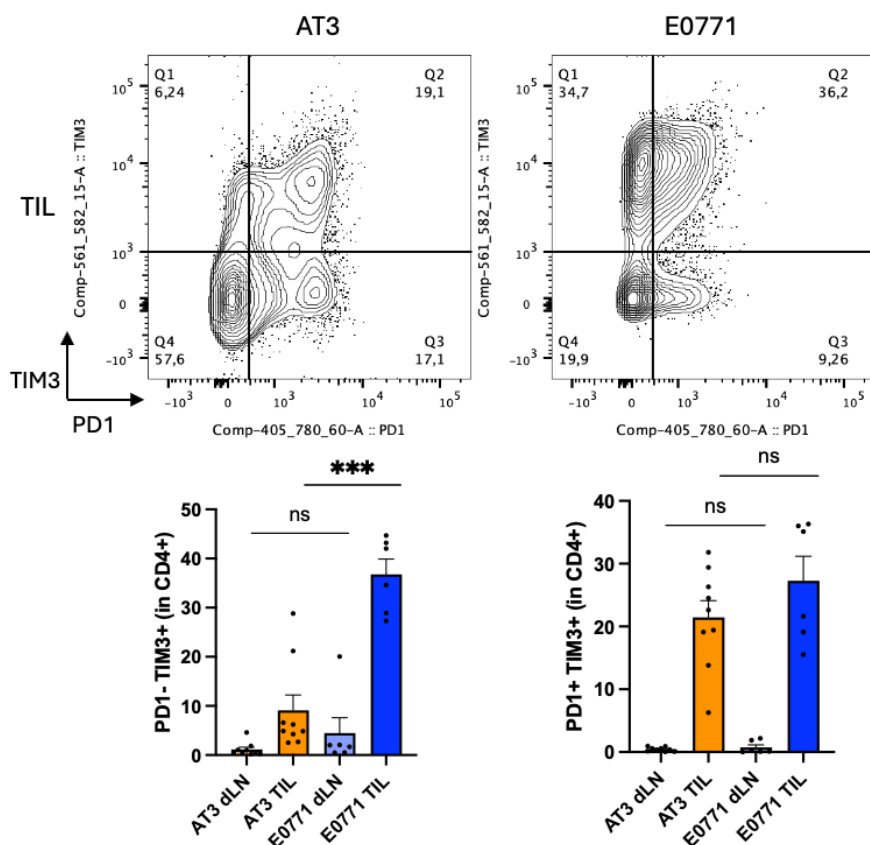


Fonte: Autoria própria.

Figura 35. Avaliação de TILs em tumores murinos.

Legenda: Quantificação da expressão de PD1, TIM3 (A) e CD39 (B) em linfócitos T CD8+ dos tumores murinos AT3 (laranja, n=9) e E0771 (azul, n=6). As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA (*) $p < 0.05$.

Linfócitos T CD4+ infiltrados também apresentaram maior expressão de TIM3 no grupo E0771 em comparação ao AT3 (Figura 36). Nenhuma diferença significativa foi observada na coexpressão de PD1 e TIM3 nesses linfócitos.

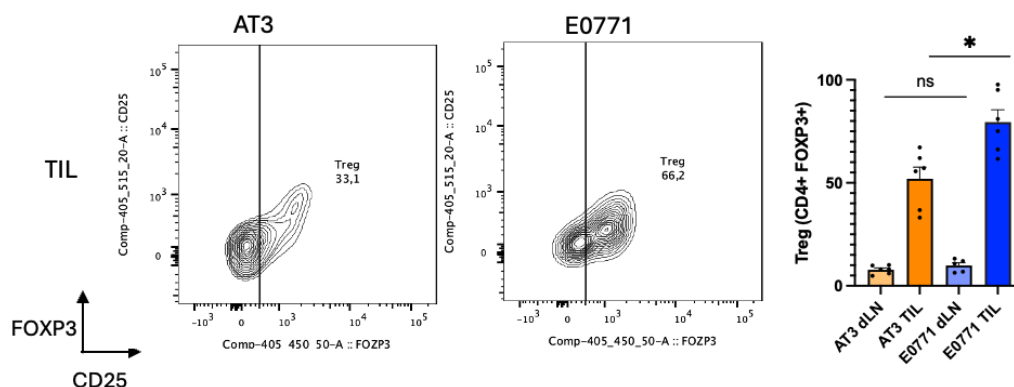


Fonte: Autoria própria.

Figura 36. Avaliação de TILs em tumores murinos

Legenda: Quantificação da expressão de PD1 e TIM3 em linfócitos T CD4+ dos tumores murinos AT3 (laranja, n=9) e E0771 (azul, n=3). As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA (*) p<0.05.

A presença da população de células Treg também foi avaliada. Os resultados mostraram que a linhagem E0771 apresentou um maior número de células Treg CD4+ (CD25+ ou CD25+ e FOXP3+) infiltradas no tumor em comparação com a linhagem AT3 (Figura 37).



Fonte: Autoria própria.

Figura 37. População de células Treg em TILs dos tumores murinos.

Legenda: Quantificação das populações FOXP3+CD25neg/pos em população T CD4+ nos tumores AT3 (laranja, n=6) e E0771 (azul, n=6). As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA (*) $p < 0.05$.

A linhagem E0771 demonstrou um perfil metabólico significativamente mais ativo de que AT3, evidenciado por maior consumo de oxigênio mitocondrial e acidificação extracelular. Esses resultados indicam uma elevada capacidade bioenergética e glicolítica, características que conferem maior flexibilidade metabólica frente ao estresse. Esse perfil híbrido, com uso concomitante de OXPHOS e glicólise, tem sido associado a maior agressividade tumoral e potencial de crescimento acelerado, o que corrobora os dados *in vivo* de progressão mais rápida dos tumores E0771 (106,107).

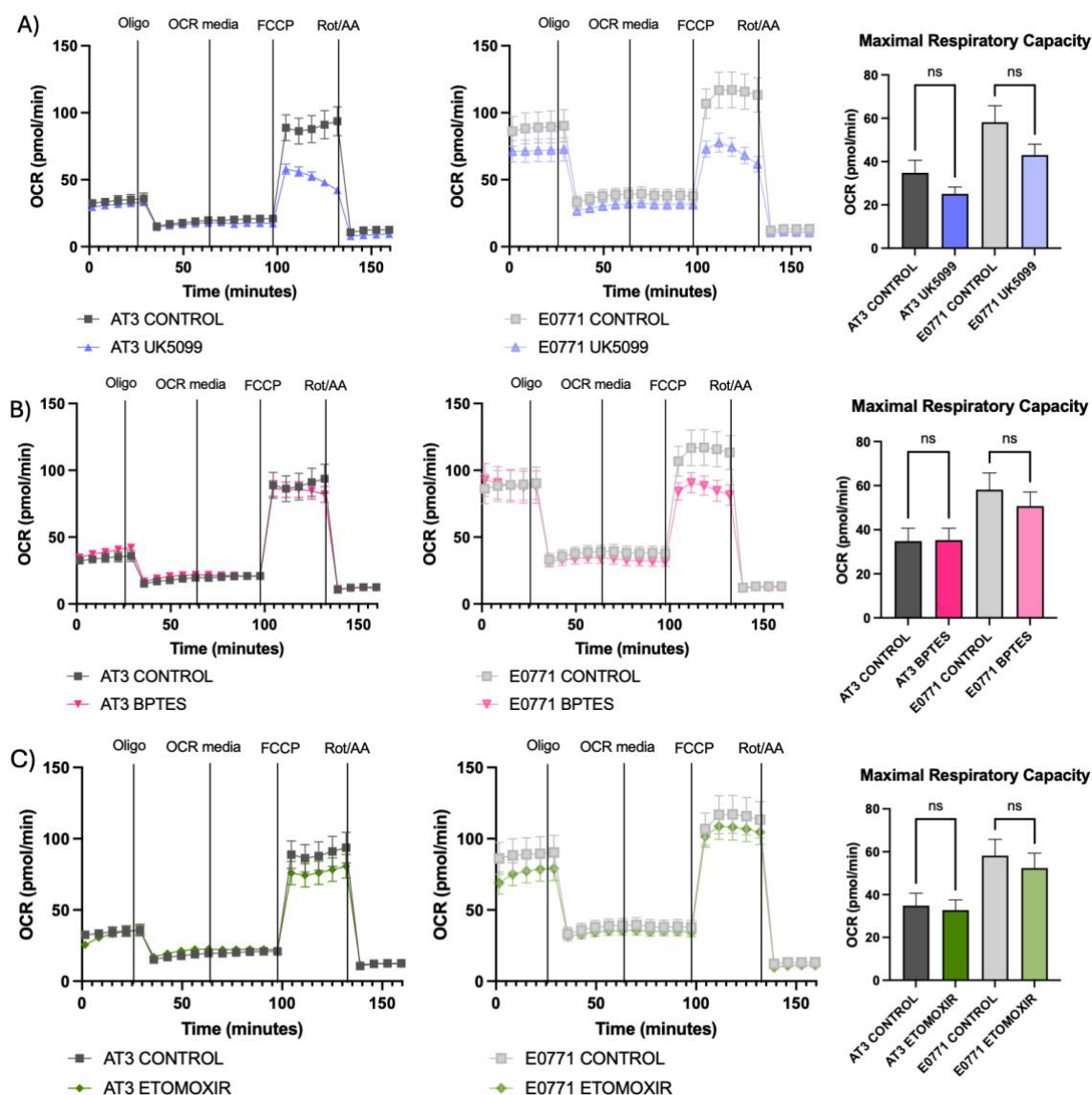
No contexto imunológico, tumores derivados da linhagem E0771 apresentaram um infiltrado de linfócitos T caracterizados por aumento de marcadores associados à disfunção, como PD1+TIM3+ e PD1+CD39+ em células T CD8+, além de maior expressão de TIM3 em T CD4+(108,109). Esses fenótipos são indicativos de ativação crônica e redução da função efetora, frequentemente observados em tumores com microambiente imunossupressor. A presença aumentada de Tregs CD4+CD25+FOXP3+ reforça esse cenário, uma vez que essas células promovem supressão imunológica local e facilitam a evasão tumoral(110).

4.2.3. Caracterização das vias bioenergéticas associadas ao perfil tumoral mais agressivo.

A linhagem murina E0771, que apresentou crescimento tumoral mais acelerado em comparação à AT3, foi considerada representativa desse perfil mais agressivo e imunologicamente desbalanceado, semelhante ao observado em pacientes com ausência de resposta terapêutica. Considerando que alterações no metabolismo tumoral impactam diretamente o microambiente imune e podem comprometer a eficácia da resposta antitumoral, buscamos investigar quais vias bioenergéticas poderiam estar envolvidas nesse comportamento proliferativo mais intenso.

Para isso, realizamos experimentos funcionais *in vitro* utilizando a tecnologia Seahorse com o objetivo de mapear os principais eixos metabólicos responsáveis pelo aumento do consumo de oxigênio nessa linhagem. Dessa forma, as linhagens foram cultivadas na presença de quatro inibidores metabólicos específicos, sendo UK509, BPTES, Etomoxir e Metformina.

A utilização dos inibidores UK5099 (Figura 38A), BPTES (Figura 38B) e Etomoxir (Figura 38C) não demonstraram nenhuma diferença significativa entre as linhagens tratadas e o controle, bem como entre as linhagens entre si.



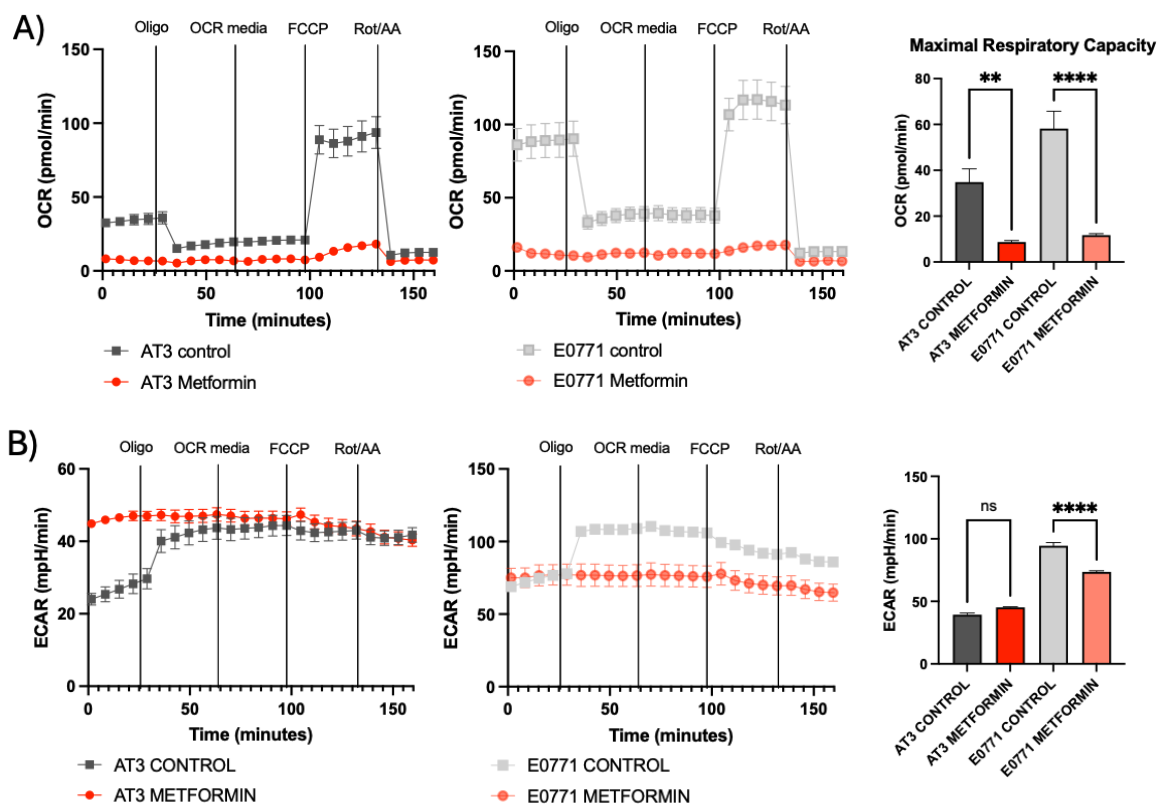
Fonte: Autoria própria.

Figura 38. Avaliação da atuação dos inibidores nas linhagens tumorais em cultura.

Legenda: Taxas representativas de consumo de oxigênio (OCR) para as linhagens AT3 e E0771 tratados com os inibidores (A) UK5099 (Lilás), (B) BPTES (rosa) e (C) Etomoxir (verde), em comparação quantitativa do OCR dos controles. As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA (*) $p < 0.05$.

A avaliação com metformina, que foi administrada uma hora antes da análise, nos mostrou uma inibição significativa tanto do consumo de oxigênio basal quanto o

máximo em ambas as linhagens tumorais (Figura 39A). No entanto, a avaliação de acidificação extracelular revelou um impacto mais acentuado na linhagem E0771, com uma redução notável de ECAR em comparação com AT3 (Figura 39B).



Fonte: Autoria própria.

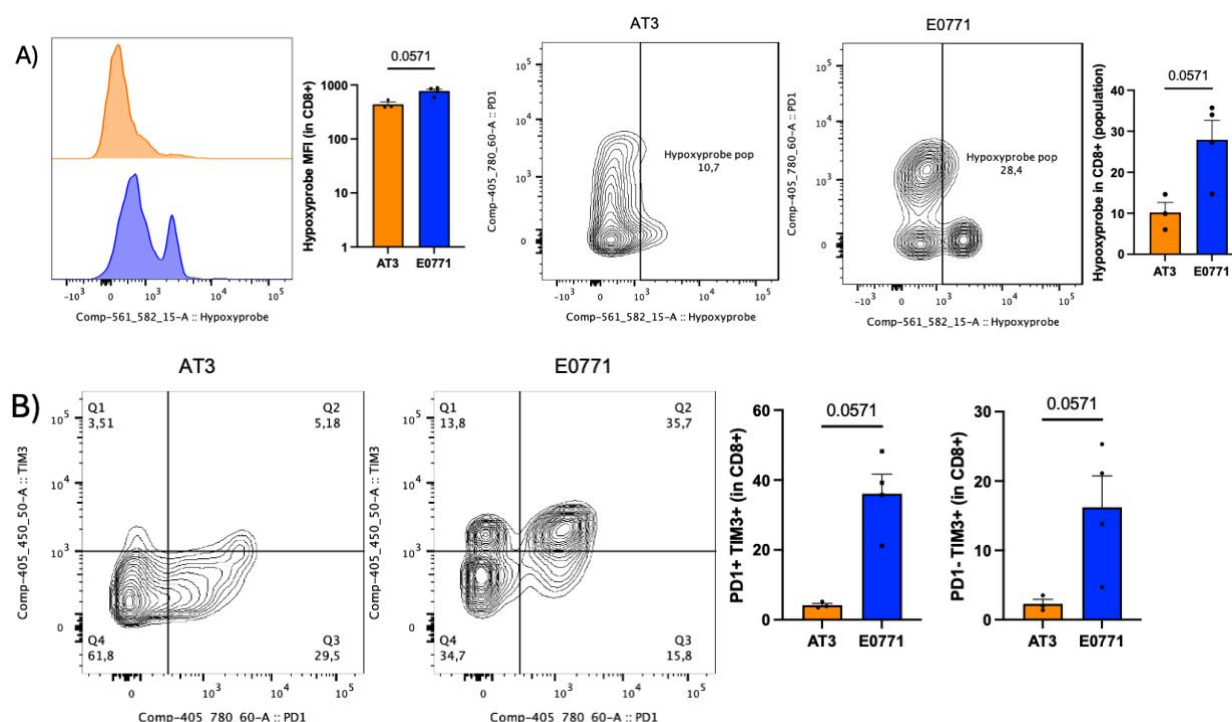
Figura 39. Ensaio metabólico com metformina.

Legenda: Curvas de OCR das células AT3 e E0771 (20.000 células/poço) e curvas de ECAR das células AT3 e E0771 (20.000 células/poço) avaliadas quanto à atividade mitocondrial em Seahorse. As análises estatísticas foram realizadas através do teste one-way ANOVA (*) $p < 0.05$.

Devido ao impacto da administração de metformina em nosso ensaio *in vitro*, nós investigamos a presença de hipóxia no TME dos tumores AT3 e E0771, administrando Pimonidazol (Hypoxyprobe™) antes da eutanásia dos animais e coleta dos tumores.

Foram avaliados 7 camundongos (E0771 $n=4$ e AT3 $n=3$) e, embora a diferença não tenha alcançado significância estatística, as células T CD8+ nos TILs apresentaram indícios de maior grau de hipóxia nos tumores E0771 em comparação ao grupo AT3, mostrado pela expressão de Hypoxyprobe™ (Figura 40A). Além disso, a avaliação dos marcadores de exaustão nesses TILs revelou níveis mais elevados de células T CD8+ coexpressando PD1 e TIM3 no grupo E0771, enquanto nos tumores AT3 foi observada a expressão isolada de PD1 em células T CD8+ (Figura

40B). Esse perfil segue a mesma tendência observada previamente na caracterização do TME das linhagens AT3 e E0771.



Fonte: Autoria própria.

Figura 40. Avaliação de hipóxia em TILs.

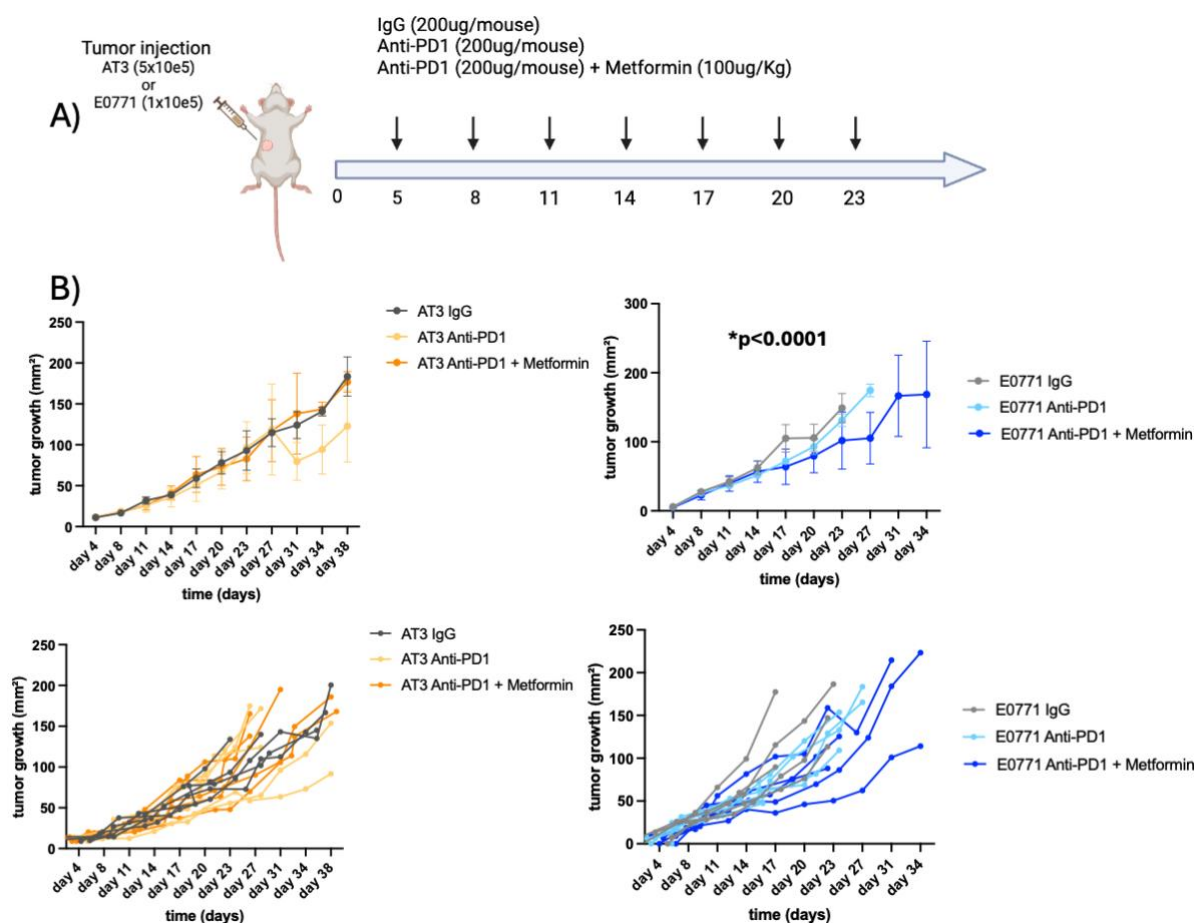
Legenda: Histograma e quantificação da Hypoxyprobe em linfócitos T CD8+ isolados de tumores AT3 (laranja, n=3) e E0771 (azul, n=4) (A). Quantificação da expressão de PD1 e TIM3 em células T CD8+ dos tumores murinos (B). As análises estatísticas foram realizadas através do teste Mann-Whitney (*) p<0.05.

Os resultados obtidos até o momento sugerem que a linhagem E0771 apresenta um perfil metabólico oxidativo, caracterizado por maior consumo de oxigênio e aumento da acidificação basal e total do microambiente, em comparação com a linhagem AT3. Além disso, observamos que os TILs na linhagem E0717 estão possivelmente mais expostos a níveis elevados de hipóxia, o que pode contribuir para uma possível diferenciação em um fenótipo exausto.

No intuito de investigar se a modulação da hipóxia impacta o crescimento tumoral e a composição do infiltrado imune, conduzimos experimentos combinando o imunoterápico anti-PD1 e metformina nas linhagens de interesse. O tratamento foi iniciado no quinto dia após a injeção das células tumorais, quando os tumores atingiram volumes entre 6 a 9 mm³. Os animais foram então distribuídos em três grupos experimentais: controle (IgG), anti-PD1 isolado (200ug) e combinação de anti-

PD1 com metformina. As administrações foram realizadas a cada três dias (Figura 41A).

Nesse cenário, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos tratados com IgG e anti-PD1 em ambas as linhagens celulares. No entanto, a combinação de metformina com anti-PD1 levou a uma redução significativa no crescimento tumoral na linhagem E0771 (Figura 41B), em comparação com os tumores tratados apenas com anti-PD1 e o grupo controle. Nenhuma diferença foi observada na linhagem AT3.



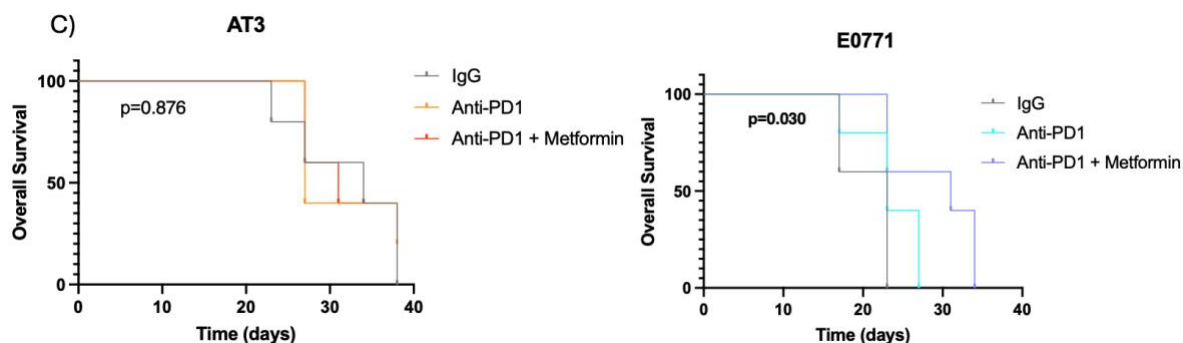
Fonte: Autoria própria.

Figura 41. Tratamento com anti-PD1 e metformina.

Legenda: (A) Esquema de tratamento com 5 camundongos por grupo. (B) Curva de crescimento tumoral com valores individuais de tratamento das linhagens AT3 (laranja) e E0771 (azul). As análises estatísticas foram realizadas através do teste two-way ANOVA (*) $p < 0.05$.

A avaliação de sobrevida global dos animais submetidos aos diferentes tratamentos foi avaliada através da análise de Kaplan-Meier e teste de Cox. Na linhagem tumoral E0771, nós observamos uma diferença significativa na sobrevida entre os grupos tratados com anti-PD1 e metformina combinada em comparação com

os grupos de tratamento com anti-PD1 e IgG. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos de tratamento da linhagem AT3 (Figura 42).



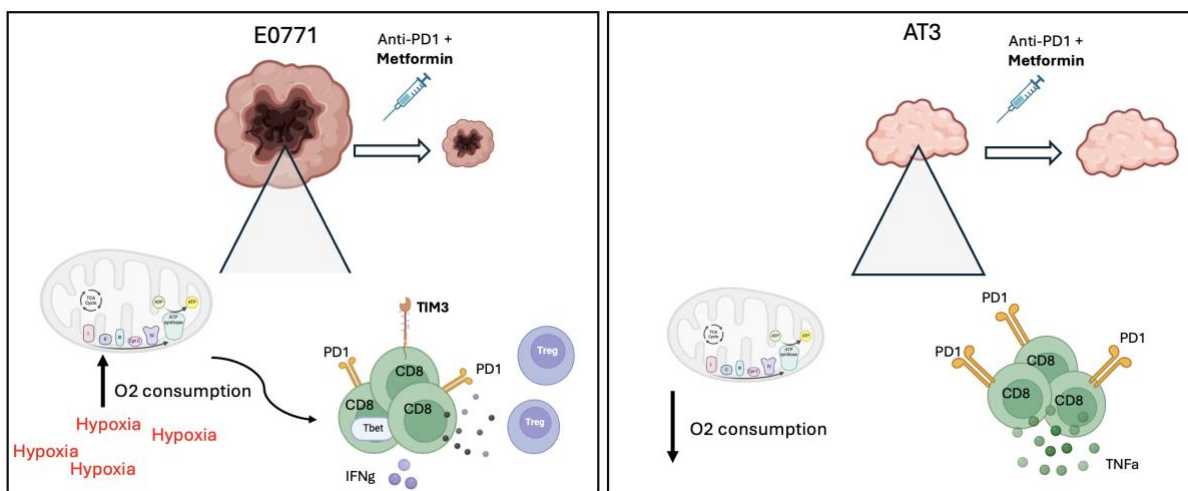
Fonte: Autoria própria.

Figura 42. Avaliação de sobrevida global.

Legenda: Avaliação da sobrevida global (do inglês *Overall Survival* – OS) aos tratamentos controle (IgG), anti-PD1 e anti-PD1 combinado com Metformina.

A linhagem AT3 não demonstrou resposta a nenhum dos tratamentos testados, incluindo o bloqueio de PD1 isolado ou combinado à metformina, reforçando seu perfil previamente descrito de resistência intrínseca(111). Essa resistência tem sido atribuída à baixa imunogenicidade tumoral, reduzida expressão de marcadores inflamatórios e presença de um infiltrado imune pouco funcional.

Em conclusão, a linhagem tumoral E0771 demonstrou um comportamento mais agressivo com rápido crescimento, impulsionado por processos metabólicos ativados, refletidos por taxas elevadas de OCR e SRC. O indício de hipóxia no TME pode ser o fator chave para a criação de um ambiente imunossupressor, contribuindo para a regulação positiva de marcadores de exaustão, como PD1, TIM3 e CD39, além de intensificar o recrutamento de linfócitos T reguladores (Figura 43).



Fonte: Autoria própria.

Figura 43. Revisão da análise imunometabólico em tumores murinos.

Legenda: À esquerda, a linhagem E0771 é caracterizada por um consumo elevado de oxigênio e maior infiltrado de linfócitos TCD8+ e TCD4+ expressando marcadores de exaustão, além de maior infiltrado de células Treg. O tratamento com Anti-PD1 combinado com metformina resultou em uma melhora nas taxas de sobrevida e uma redução no tamanho tumoral nesse grupo. À direita, são representados os tumores AT3, que ao contrário do grupo E0771, não apresentaram o mesmo nível de consumo de oxigênio e seu TME foi marcado pela baixa expressão de marcadores de exaustão.

Os resultados encontrados em linhagens de E0771 reforçam observações anteriores no CMTN, onde a baixa eficácia do bloqueio de checkpoints imunes tem sido atribuída à uma incapacidade do sistema imune em manter uma resposta efetora antitumoral sustentada (112,113).

Caracterizado pelo crescimento tumoral acelerado e um perfil imunológico desbalanceado, o modelo apresentou aumento da frequência de T CD8+ com expressão de marcadores reguladores (PD1, TIM3, CD39) além do acúmulo de Tregs, refletindo um microambiente imune com sinalização imune persistente, porém disfuncional. Esse padrão tem sido descrito como um dos principais empasses à eficácia a imunoterapia em tumores agressivos como o CMTN, especialmente quando há falha na coordenação entre sinalização imune, controle metabólico e recrutamento celular adequado (100,103,112)

Estudos conduzidos no laboratório de imunometabolismo do câncer do Dr. Greg Delgoffe evidenciaram que linhagens tumorais com um perfil metabólico oxidativo, como o melanoma, apresentam mecanismos que inibem as respostas à terapia com anti-PD1 (114). Além disso, a hipóxia tem sido identificada como um fator crucial no comportamento tumoral, especialmente em modelos tumorais de cabeça e pescoço(115).

No cenário do CMTN, Napier T. e colaboradores mostraram que a falha na resposta combinada de paclitaxel com anti-PD1 se relacionou com a redução do infiltrado de células imunes no tumor e com aumentos de níveis de hipóxia no TME (57). Adicionalmente, a hipóxia no CMTN também se mostrou envolvida à disfunção de linfócitos T, resultando em uma resposta antitumoral comprometida. A inibição farmacológica do fator de indução de hipóxia (HIF1 α) *in vitro* e *in vivo* demonstrou aumento da eficácia da imunoterapia (56).

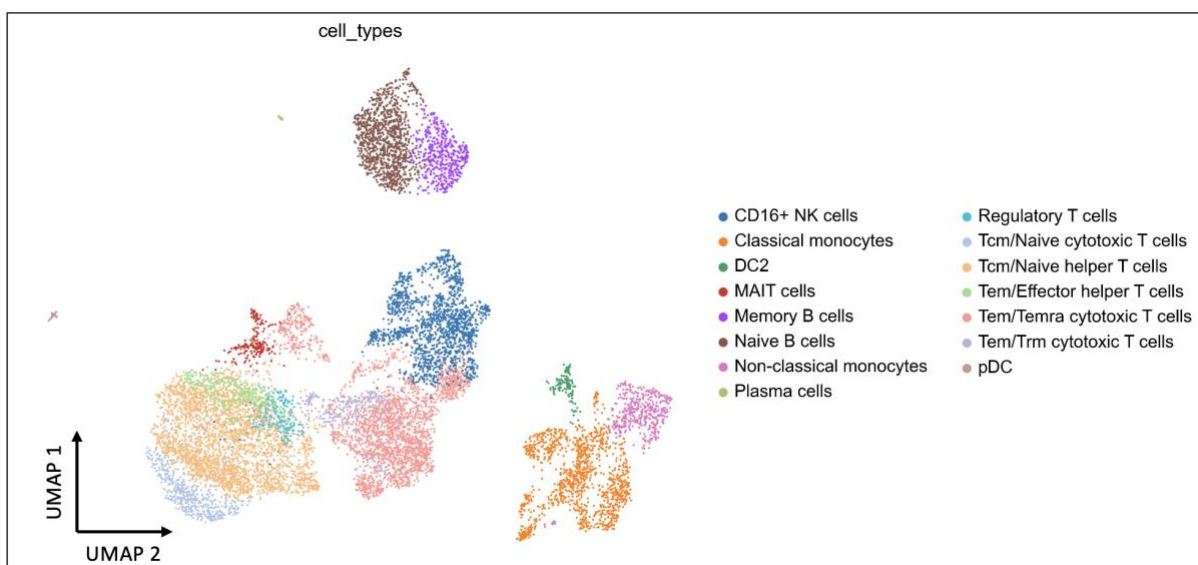
4.3. Análise dos dados públicos de transcriptoma de pacientes com CMTN

4.3.1. Análise dos dados transcriptômicos de PBMC

Diante dos achados obtidos tanto em pacientes com CMTN quanto nos modelos murinos, observamos a recorrência de um padrão inflamatório sistêmico desorganizado e metabolicamente desbalanceado associado à falha terapêutica. No entanto, apesar da vasta literatura sobre o microambiente de CMTN, especialmente em relação às assinaturas de hipóxia e resposta imune local, ainda são escassos os estudos que abordam de forma integrada o perfil imunológico periférico. Nesse contexto, a próxima etapa do trabalho teve como objetivo expandir e validar nossos achados por meio da análise de dados públicos de pacientes com CMTN tratados com quimioterapia e imunoterapia combinada.

Para isso, utilizamos um dataset que inclui análises pareadas de sangue periférico e tecido tumoral antes do tratamento. Além de fornecer uma validação externa dos nossos dados clínicos e pré-clínicos, essa estratégia também visou identificar mecanismos imunes centrais potencialmente associados à eficácia terapêutica em diferentes contextos de tratamento.

Para ampliar e validar nossos achados, realizamos uma análise secundária utilizando dados públicos de transcriptoma de PBMC, obtidos por RNA-seq de célula única (scRNA-seq) de pacientes com CMTN. A partir da anotação dos tipos celulares no PBMC dos pacientes, observamos uma ampla variedade de subpopulações imunes circulantes, incluindo subtipos de linfócitos T, B, células NK, monócitos e células dendríticas (Figura 44).



Fonte: Autoria própria.

Figura 44. Populações celulares identificadas no PBMC de pacientes com CMTN.

Legenda: Visualização por UMAP das populações imunes identificadas no PBMC, sendo: células NK 16+, monócitos clássicos, células dendríticas convencionais (DC2), células T não convencionais associadas à mucosa – MAIT (dos inglês *Mucosal-associated invariant T cells*), células B de memória, células B naïve, monócitos não clássicos, plasmócitos (do inglês *plasma cells*), células T reguladoras, células T memória central/naïve citotóxicas, células T memória central/naïve auxiliaadoras, células T memória efetora/ memória efetora CD45 RA+, células T memória efetora/memória residentes e células dendríticas plasmocitóides (pDC).

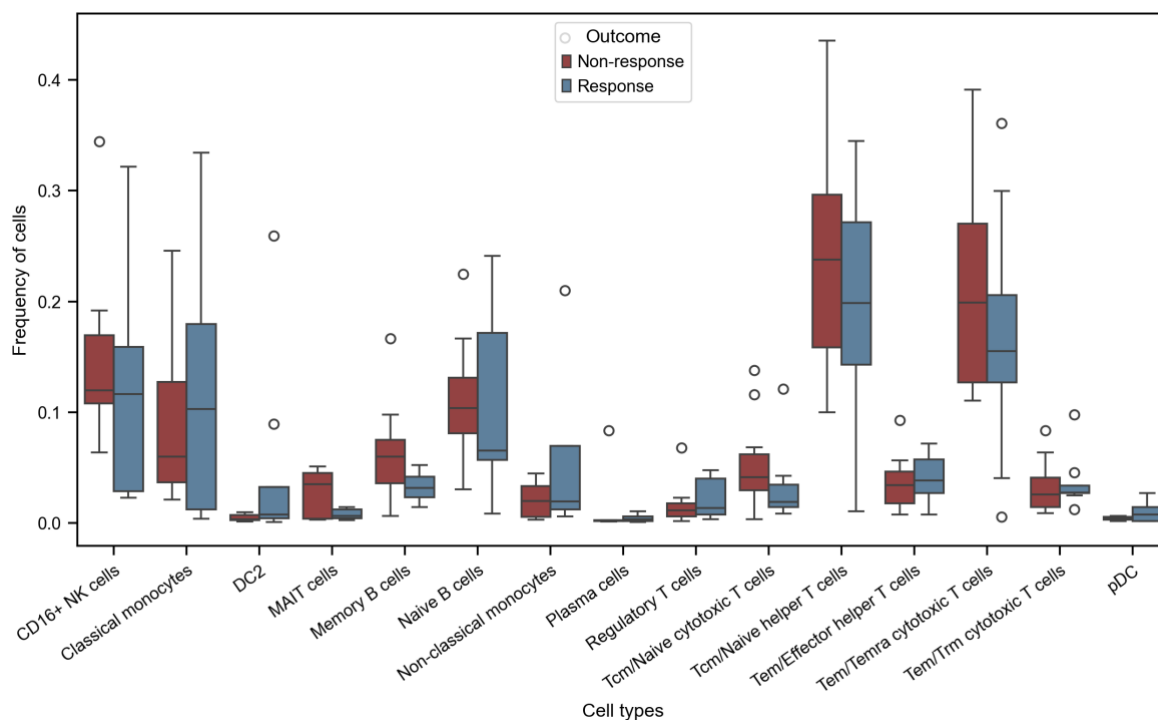
A contagem absoluta de células por subtipo celular revelou predomínio de células T do tipo Tcm/naïve helper (células T auxiliaadoras, de memória central e naïve, n=2613), CD16+ NK cells (n=1565) e monócitos clássicos (n=1248), enquanto populações como células plasmáticas e pDCs foram menos representadas (Tabela 5).

Tabela 5. Número de células identificadas por população de células imunes.

Cluster	Cell count	Cluster	Cell count
Tcm/Naïve helper T cells	2613	Naïve B cells	1092
Tcm/Naïve cytotoxic T cells	510	Memory B cells	479
Tem/Trm cytotoxic T cells	330	pDC	33
Tem/Effector helper T cells	407	Plasma cells	18
Regulatory T cells	223	DC2	136
MAIT cells	189	Non-classical monocytes	432
CD16 ⁺ NK cells	1565	Classical monocytes	1248

Fonte: Autoria própria.

Na análise de abundância relativa entre os grupos, comparamos as proporções de cada subtipo celular entre pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento. Embora algumas tendências visuais possam ser observadas, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi identificada (Figura 45), indicando que, nesse conjunto, a frequência dos tipos celulares no sangue periférico isoladamente não distingue os grupos clínicos.

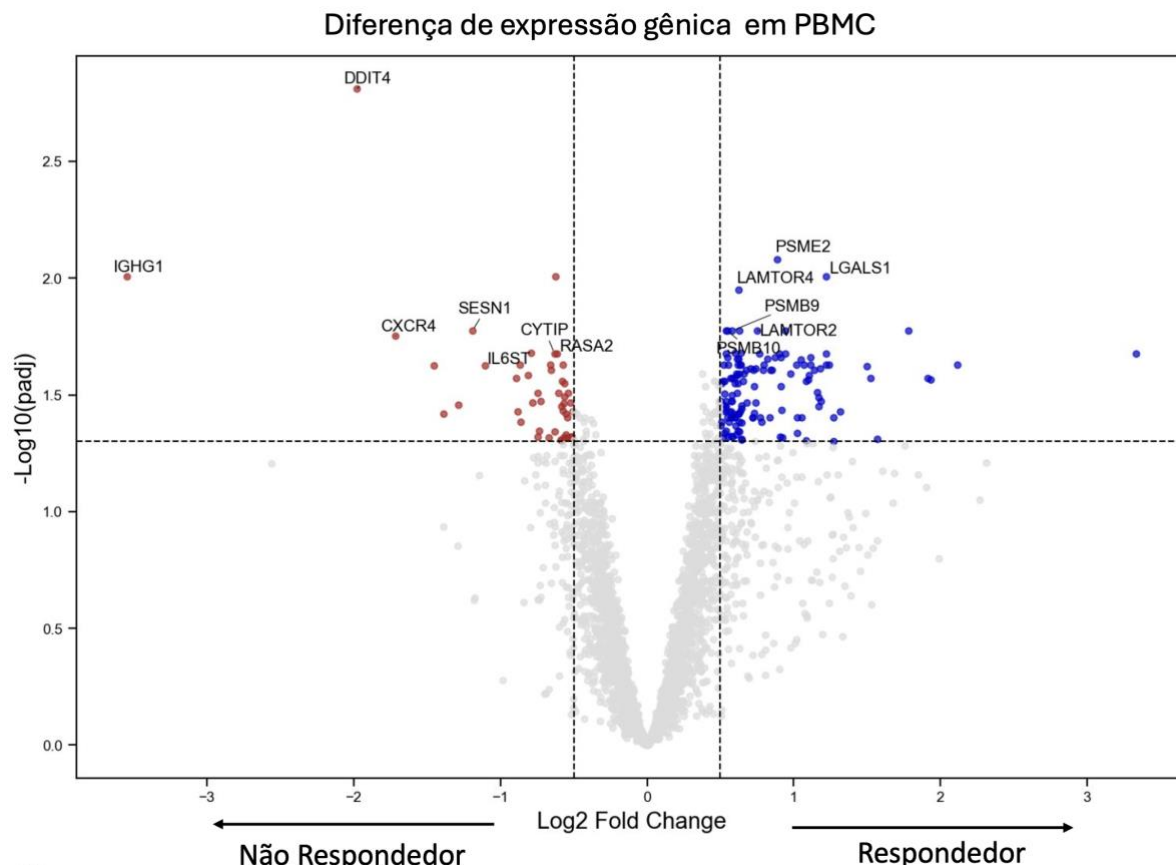


Fonte: Autoria própria.

Figura 45. Frequência das células imunes identificadas nos grupos de pacientes.

Legenda: Frequência de subtipos celulares identificados por single-cell RNA-seq em PBMC de pacientes com CMTN, antes do tratamento quimioterápico e combinado. Os grupos comparados foram respondedores (Response – azul, n=9) e não respondedores (Non-Response – vermelho, n=11).

Na análise de genes diferencialmente expressos (DEGs) por pseudobulk, comparamos os perfis transcricionais dos PBMCs entre pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento. O volcano plot (Figura 46) destaca os principais genes upregulados em cada grupo, permitindo a identificação das diferenças de expressão gênica associadas à resposta clínica.



Fonte: Autoria própria.

Figura 46. Análise dos genes up-regulados e down-regulados em pacientes CMTN respondedores vs não respondedores na coorte de validação.

Legenda: Volcano plot mostrando os genes analisados nos valores de log2 fold change e o valor de p ajustado. O valor de p considerado para significância estatística padj <0.05.

Em não respondedores, observamos a que os genes IGHG1, CXCR4, DDIT4, SESN1 e IL6ST estão upregulados. O aumento de IGHG1, que codifica a cadeia pesada da IgG1, pode indicar expansão de clones de células B ou ativação de resposta humoral no sangue periférico de pacientes não respondedores. A produção desregulada de anticorpos no sangue periférico, sem integração efetiva com a resposta celular, pode representar um estado inflamatório crônico ou ineficaz, como já descrito em contextos de desfecho clínico desfavorável em CMTN (92). O aumento de CXCR4, frequentemente envolvido na migração e recrutamento de Tregs, pode indicar um perfil pré-tumoral e imunossupressor(116). Os genes DDIT4 e SESN1, ambos inibidores da via mTORC1, sugerem um ambiente celular submetido a estresse metabólico e inflamatório, com supressão de proliferação e função efetora(117,118). Por fim, a maior expressão de IL6ST pode indicar uma sensibilização das células imunes à sinalização por citocinas inflamatórias da família IL-6, além de

sugerir uma maior atividade da via JAK/STAT3 e possíveis inícios de reprogramação funcional das células imunes circulantes(119) (Figura 39).

Nos respondedores, destacam-se os genes PSME2, PSMB9, PSMB10, LAMTO2, LAMTOR4 e LGALS1, que compõem um perfil funcionalmente mais ativo e coordenado. A expressão aumentada de PSME2 e das subunidades do imunoproteossomo PSMB9/10 sugere uma ativação da via de apresentação antigênica via MHC classe I, associada a interferon-gama e resposta citotóxica mediada por células T CD8+(120). A expressão elevada de LAMTOR2 e LAMTOR4, reguladores positivos de mTORC1, indica ativação metabólica e proliferativa das células imunes, compatível com um fenótipo funcionalmente ativo (121). A presença de Igals1 (galectina-1), apesar de associada a funções regulatórias, pode refletir um mecanismo de resolução pós-ativação intensa, favorecendo homeostase após a resposta imunológica eficiente (122).

A fim de aprofundar a interpretação biológica dos genes diferencialmente expressos entre pacientes respondedores e não respondedores, foram conduzidas análises de enriquecimento funcional utilizando a abordagem de *Over-representation Analysis* - ORA. Para isso, foram empregas duas bases complementares e amplamente utilizadas: a *Gene Ontology – Biological Process* (GO:BP,2025) e a coleção de assinaturas *MSigDB Hallmark* (2020). As análises foram conduzidas separadamente para os genes upregulados e downregulados, com base em uma métrica de ranqueamento combinando significância estatística e magnitude de expressão: $-\log_{10}(\text{p-valor ajustado}) \times \log_2(\text{fold change})$.

Entre os pacientes classificados como respondedores ao tratamento, observou-se o enriquecimento de vias relacionadas à atividade bioenergética, resposta imune antiviral e citotoxicidade efetora. Através da análise de super-representação utilizando o banco de dados *GO: Biological Process* (2025), destacaram-se processos associados à cadeia respiratória mitocondrial, como cadeia de transporte de transporte de elétrons aeróbica (GO:0019646), síntese de ATP mitocondrial acoplada ao transporte de elétrons (GO:0042775), respiração celular (GO:0045333) e síntese de ATP impulsionada por força próton-motriz (GO:0015986; GO:0042776) (Figura 47).

Tais vias foram suportadas pela expressão aumentada de genes mitocondriais como COX6A1, NDUFA1, UQCRC1 e subunidades do complexo ATP sintase (ATP5F1E), sugerindo um perfil de maior atividade metabólica nas células mononucleares circulantes. Ainda que transcritos mitocondriais possam, em alguns

casos, refletir artefatos relacionados a estresse celular ou viabilidade, os genes identificados neste conjunto são codificados nuclearmente, o que reduz o risco de viés técnico direto. Além disso, o padrão observado foi consistente entre diferentes métodos de enriquecimento funcional, reforçando sua relevância biológica.

De forma convergente, a análise baseada no MSigDB Hallmark revelou enriquecimento de assinaturas relacionadas à fosforilação oxidativa, corroborando com um perfil metabólico funcional das células imunológicas nesses pacientes. Além disso, observaram-se assinaturas relacionadas à resposta à interferon gamma e interferon alfa que refletem um ambiente imunológico ativado e antiviral. Também foram enriquecidas vias associadas à atividade citotóxica, como a assinatura de rejeição de aloenxerto, e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)(Figura 48).

Esse conjunto de vias indica a ativação coordenada de mecanismos imunológicos efetores, com destaque para respostas mediadas por interferon tipo I/II, que se associam à resposta antitumoral adaptativa. A presença concomitante de genes como PSME2, PSMB9, ISG15, HLA-DRA e TNFSF10 reforça essa hipótese, apontando uma assinatura imunológica circulante compatível com a ativação coordenada da resposta adaptativa.

Em relação aos pacientes não respondedores, observou-se um padrão distinto de enriquecimento funcional, caracterizado por vias relacionadas à reprogramação inflamatória, estresse celular e regulação negativa da ativação imune. A análise por enriquecimento no banco de dados *GO: Biological Process (2025)*, evidenciou a participação de vias como diferenciação de células T helper (GO:0042093), regulação da via de sinalização do receptor Toll-like 4 (GO:0034143), reconhecimento de sítio de splicing de mRNA (GO:0006376), resposta a citocinas (GO:0034097) e translocação de fosfolípidios (GO:0045332)(Figura 47).

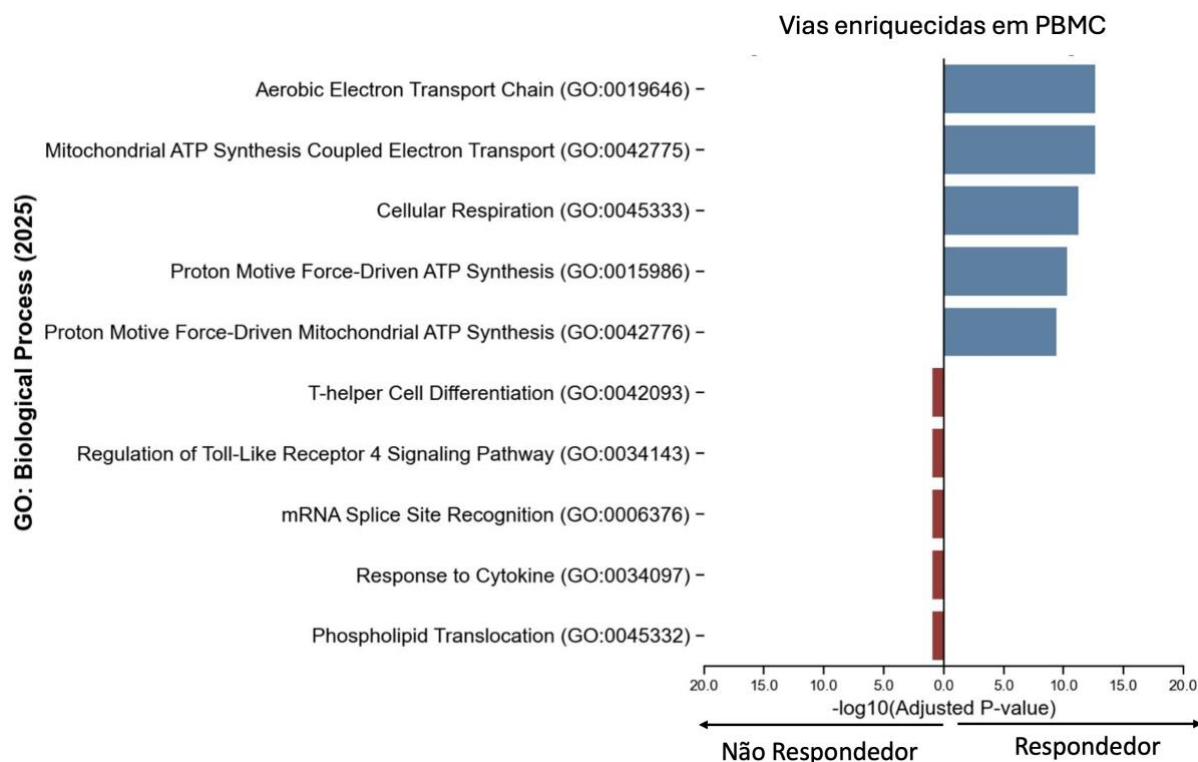
Esses termos estiveram associados à expressão aumentada de genes como CXCR4, IL6ST, STAT4, PIK3R1 e TNFAIP3, sugerindo a presença de mecanismos de tolerância periférica, ativação disfuncional e polarização funcional imunossupressora.

Adicionalmente, a base de dados MSigDB Hallmark (2020) revelou o enriquecimento de assinaturas funcionais ligadas à sinalização do TNF- α via NF- κ B, resposta à hipóxia, resposta ao interferon gamma, via do p53 e resposta à radiação UV (*UV Response Down*)(Figura 48). A expressão aumentada de genes como DDIT4, SESN1, BTG1 e TXNIP, todos relacionados à inibição de mTORC1 e à adaptação a

estressores metabólicos e inflamatórios, sugere que as células imunes desses pacientes atuam sob um estado de baixa atividade funcional, associado à exaustão ou inibição persistente.

De forma integrativa, os resultados das análises de enriquecimento funcional revelam assinatura transcricional sistemicamente distintas entre os grupos clínicos, tanto em termos de processos biológicos (*GO: Biological process*) quanto de vias canônicas amplamente validadas (*MSigDB Hallmark*). Pacientes respondedores apresentaram ativação coordenada de vias metabólicas mitocondriais e resposta imune efetora, incluindo a indução de genes associados à apresentação antigênica e sinalização por interferons. Em contraste, os não respondedores demonstraram enriquecimento em vias associadas à modulação negativa da resposta inflamatória, sinalização por citocinas regulatórias e estresse metabólico celular, sugerindo um perfil funcional de baixa ativação e potencial tolerância periférica.

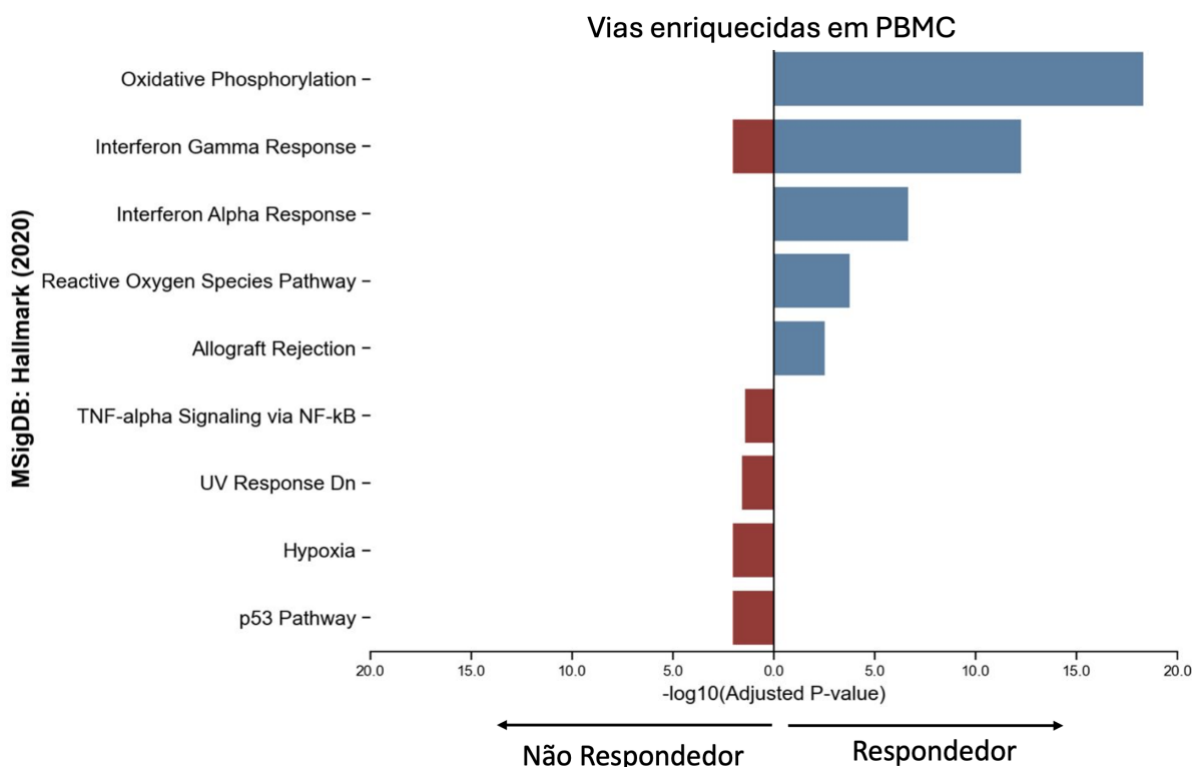
Esses perfis distintos foram visualmente representados por meio dos gráficos de vias enriquecidas, destacando em azul as vias mais expressas em respondedores e em vermelho aquelas associadas aos não respondedores, com base nos bancos de dados utilizados (Figura 47 e Figura 48).



Fonte: Autoria própria.

Figura 47. Análise de super-representação (do inglês Over-representation analyses - ORA) das vias em GO: Biological Process (2025).

Legenda: Gráfico mostrando as vias enriquecidas em respondedor e em não respondedor estatisticamente significativas padj <0.05.

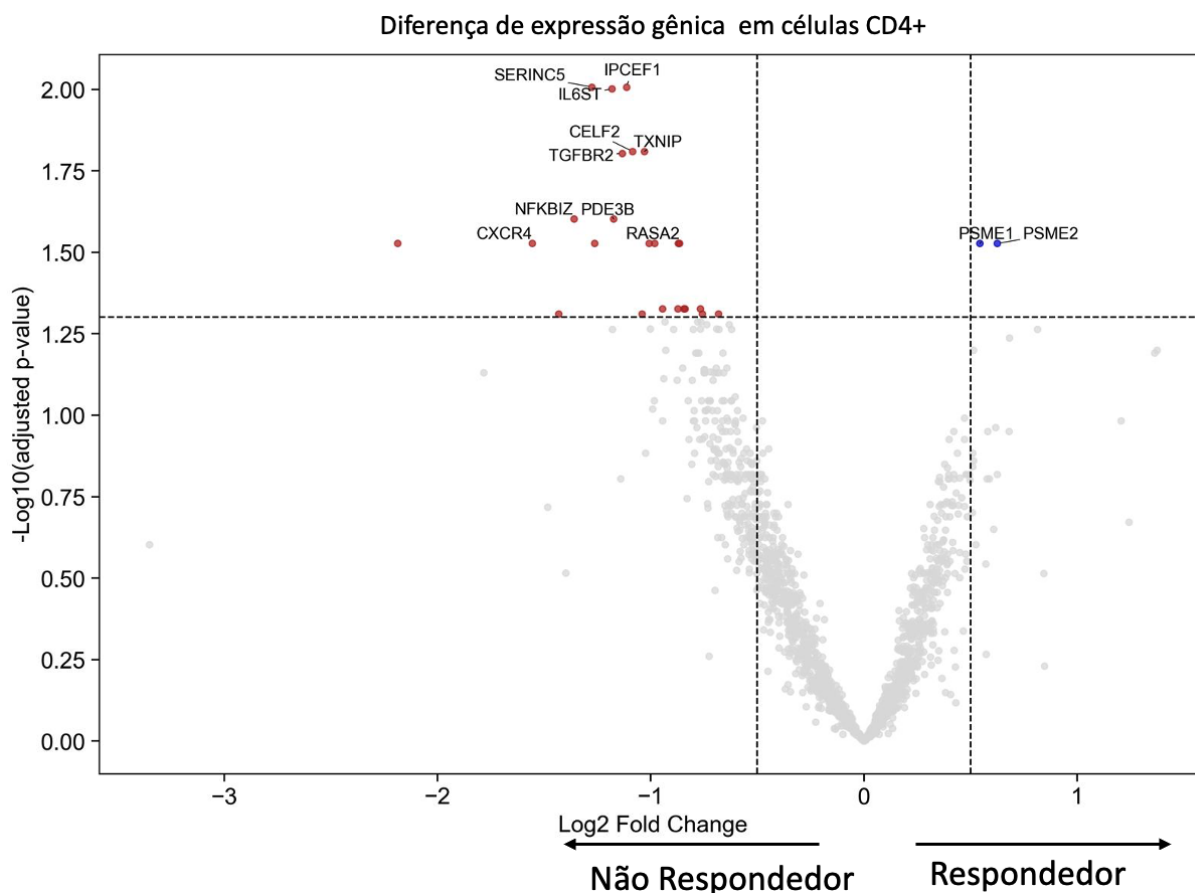


Fonte: Autoria própria.

Figura 48. Análise de super-representação (do inglês Over-representation analyses - ORA) das vias em MSigDB: Hallmark (2020).

Legenda: Gráfico mostrando as vias enriquecidas em respondedor e em não respondedor estatisticamente significativas padj <0.05.

Ainda em PBMC, nós avaliamos dentro do cluster de células T CD4+ (Tcm/Naive helper T cells, Tem/effector helper T cells e Regulatory T cells) quais genes estariam diferencialmente expressos entre os grupos de respondedores e não respondedores. Através dessa análise notamos que em pacientes não respondedores estavam upregulados os genes IPCEF1, SERINC5, IL6ST, CELF2, TXNIP, TGFBR2, NFKBIZ, CXCR4, PDE3B e RASA2 (Figura 49).



Fonte: Autoria própria.

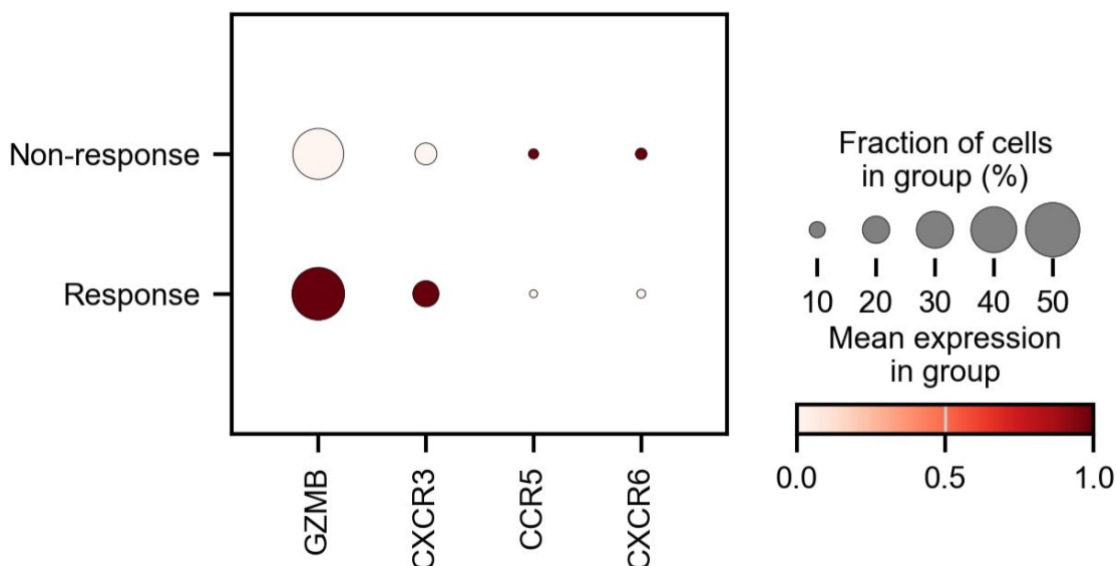
Figura 49. Análise dos genes up-regulados e down-regulados linfócitos T CD4+ em PBMC de pacientes CMTN respondedores vs não respondedores na coorte de validação.

Legenda: Volcano plot mostrando os genes analisados nos valores de log2 fold change e o valor de p ajustado. O valor de p considerado para significância estatística padj <0.05.

Com base em nossos dados de pacientes com CMTN respondedores, que apresentaram níveis elevados de GZB em linfócitos circulantes e correlação positiva entre essas células e níveis de TILs, investigamos a expressão de genes associados à atividade citotóxica (GZMB) e migração de linfócitos TCD8+ (CXCR3, CCR5 e CXCR6) nos dados públicos, com o objetivo de validar esse perfil funcional no sangue periférico.

A análise qualitativa da expressão gênica em células T CD8+ circulantes revelou uma tendência de maior expressão média de GZB e CXCR3 em pacientes respondedores, assim como uma fração mais elevada de células positivas para esses marcadores (Figura 50). Assim, ainda que não haja a robustez estatística, essa análise

exploratória qualitativa pode indicar um compartimento circulante mais preparado para resposta efetora em pacientes respondedores, em linha com os nossos achados funcionais e teciduais.



Fonte: Autoria própria.

Figura 50. Análise exploratória da expressão gênica em células T CD8+ circulantes de pacientes com CMTN.

Legenda: Cada ponto representa a média de expressão dos genes GZMB, CXCR3, CCR5 e CXCR6, além da proporção das células positivas em cada grupo de resposta, sendo respondedor (Response) e não respondedor (Non-response). O diâmetro dos círculos reflete a fração de células que expressam o gene (%), enquanto a intensidade da cor representa a média de expressão dentro do grupo.

As análises das células T CD4+ dentro do compartimento de PBMC revelou um padrão de expressão gênica compatível com um perfil inflamatório crônico e desregulado em pacientes não respondedores. Genes como IL6ST, NFKBIZ e TGFBR2 estavam aumentados e sugerem ativação simultânea de vias pró-inflamatórias (JAK/STAT3 e NF- κ B) e imunossupressoras (TGF- β), processos frequentemente associados à progressão tumoral e à falha terapêutica em CMTN(104,123,124). Além disso, O aumento de TXNIP, regulador de estresse oxidativo e inibidor de mTORC1, reforça a hipótese de um estado metabólico inflamatório crônico, potencialmente menos responsivo a estímulo ativadores. (125).

Esses achados se alinham aos nossos resultados prévios na coorte própria e nos dados públicos de PBMC, nos quais observamos níveis elevados de IL-6 circulante antes do tratamento, além da expressão aumenta de IL6ST. Esse gene

codifica o co-receptor gp130, essencial para a transdução da sinalização mediada por citocinas da família IL-6. Segundo Ma et al. (2020), a ativação da via JAK/STAT3, promovida por IL-6, IL-10 e por fatores de crescimento, tem sido amplamente implicada em processos como proliferação tumoral, metástase e resistência terapêutica (119,124,126).

Dessa forma, a expressão aumentada de IL6ST pode indicar uma sensibilização exacerbada à sinalização inflamatória sistêmica, favorecendo uma reprogramação funcional imunes periféricas e para uma resposta sistêmica disfuncional. Esses dados reforçam a hipótese de que a ativação crônica de vias inflamatórias periféricas pode ter papel relevante na falha terapêutica observada em pacientes com CMTN.

Além da ativação de vias inflamatórias e imunossupressoras discutidas previamente, observamos em pacientes não respondedores o aumento na expressão de genes DDIT4, SESN1 e TXNIP, todos reconhecidos inibidores da **via mTORC1**, essencial para o suporte energético, proliferação e função efetora das células T. A expressão desses genes é induzida em resposta a condições adversas como hipóxia, estresse oxidativa e inflamação crônica, contextos frequentemente associados à disfunção imune(117,118,127–129). O aumento de TXNIP, especificamente em células T CD4+, reforça o envolvimento direto dessa subpopulação em um estado de regulação negativa do metabolismo celular.

Corroborando esses achados, nossas análises de enriquecimento funcional identificaram entre esse grupo de pacientes não respondedores, vias relacionadas à hipóxia, resposta ao estresse celular (como resposta ao UV e via do p53) e sinalização do TNF- α via NF- κ B. Ainda que a via do TNF- α seja tradicionalmente associada à ativação imune, sua ativação crônica pode promover desregulação e tolerância imunológica, contribuindo para um ambiente sistêmico imunossuprimido.

Além desses resultados, nós também observamos que em pacientes respondedores há um enriquecimento robusto de vias relacionadas à atividade bioenergética mitocondrial e resposta imune efetiva, como fosforilação oxidativa (OXPHOS), resposta a interferon e citotoxicidade mediada por célula T.

Em condições normais de ativação aguda, células T efetoras recém-ativadas passam por uma reprogramação metabólica que prioriza a glicólise aeróbica, mesmo na presença de oxigênio, como forma de produção mais efetiva de ATP. No entanto, estudos recentes vêm ampliando essa compreensão, sugerindo que esse modelo não reflete totalmente a realidade em contextos fisiológicos. Estudos conduzidos por Ma

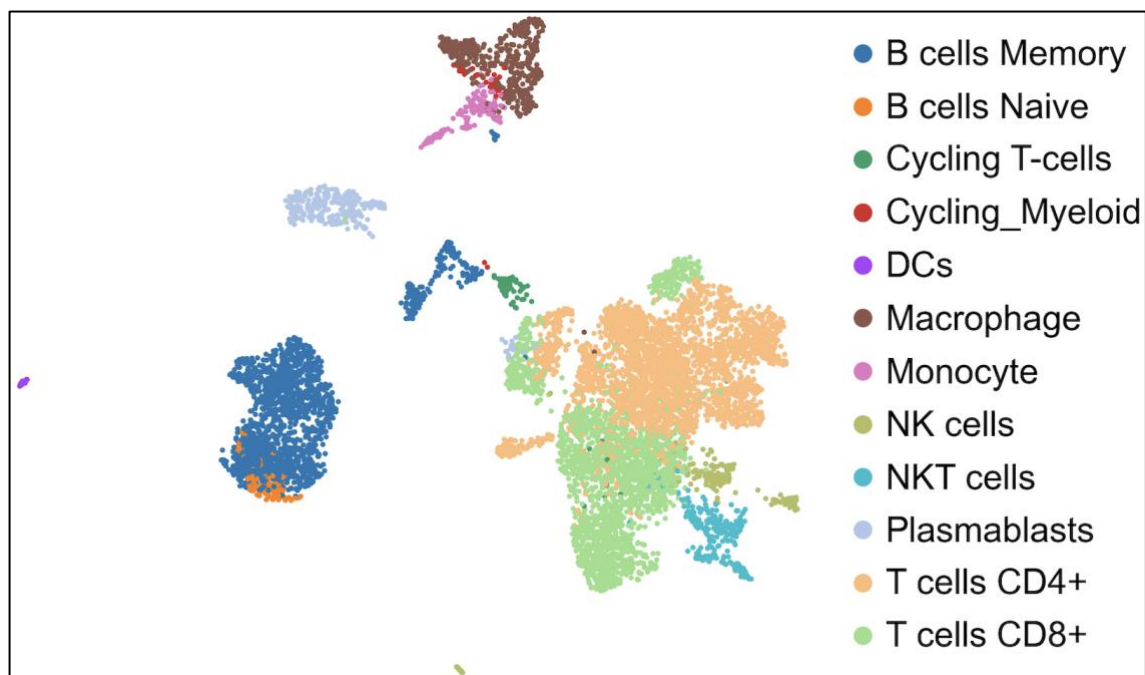
et al (2019) e Levine et al (2021) demonstraram que, em contextos fisiológicos *in vivo*, células T CD8+ ativadas apresentam maior atividade oxidativa mitocondrial (OXPHOS) do que glicolítica, o que confere maior capacidade bioenergética e durabilidade funcional(130,131). Essa preferência pela OXPHOS, especialmente observada em células de memória, tem sido associada à geração de uma resposta imune mais sustentável e duradoura, um elemento chave na eficiência terapêutica em longo prazo.

4.3.2. Análise do microambiente tumoral em tecido de pacientes com CMTN

Para complementar os achados obtidos em sangue periférico desse dataset e aprofundar a caracterização da resposta imunológica no CMTN, avaliamos dados transcriptômicos de tecido tumoral de pacientes submetidas à quimioterapia isolada ou em combinação com imunoterapia. As amostras correspondiam ao tumor primário (mamário) ou a sítios metastáticos, coletadas antes do início do tratamento.

Foram incluídas amostras de 15 pacientes com CMTN, sendo 7 classificados como respondedores e 8 como não-respondedores à terapia. As células foram organizadas e analisadas de forma conjunta, permitindo a avaliação de padrões compartilhados e distintos entre os grupos.

Após a etapa exploratória descrita na metodologia, realizamos a anotação das populações celulares presentes no microambiente tumoral, com ênfase na identificação de subtipos linfocitários, como células T CD4+, T CD8+, células NK e células B (Figura 51). Para isso, utilizamos marcadores de expressão gênica amplamente descritos na literatura, acoplados à estratégia de clusterização.



Fonte: Autoria própria.

Figura 51. Populações celulares identificadas no tecido tumoral de pacientes com CMTN.

Legenda: Visualização por UMAP das populações imunes identificadas no PBMC, sendo: células B naive, células T em proliferação (do inglês - Cycling T-cells), células mieloides em proliferação (do inglês – Cycling Myeloid), células dendríticas, macrófagos (Macrophages), monócitos (Monocytes), células NK, células T NK, plasmablastos (Plasmablasts), células T CD4+ e células T CD8+.

Tabela 6. Número de células identificadas por população de células imunes no TME.

Cluster	count	Cluster	count
T cells CD4+	2825	NK cells	194
T cells CD8+	2093	Monocyte	140
B cells Memory	1582	B cells Naive	118
Macrophage	461	Cycling T-cells	65
Plasmablasts	289	Cycling_Myeloid	35
NKT cells	232	DCs	26

Fonte: Autoria própria.

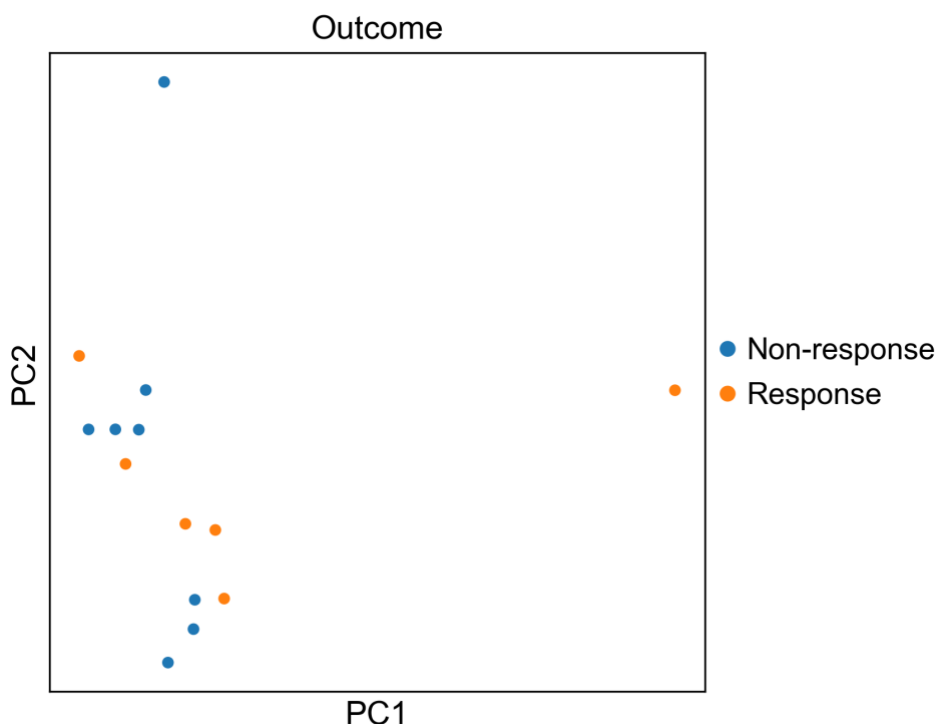
A contagem absoluta de células por subtipo celular revelou predomínio de células T CD4+ (n=2825), células T CD8+ (n=2093) e células B de memória (do inglês – B cells Memory, n=1582) enquanto populações como células proliferativas e DCs foram menos representadas (Tabela 6).

Em seguida, conduzimos uma análise de genes diferencialmente expressos entre os grupos de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento. No entanto, essa comparação não resultou em genes com diferença estatisticamente significativa, tanto na análise global quanto estratificada por subtipos celulares.

Prosseguimos para uma análise direcionada da expressão gênica de um conjunto previamente selecionado com base em nossos resultados no PBMC e em nossa coorte, além de achados relevantes da literatura. Os genes incluídos foram: HIF1A, HIF2A, IL10, IL6, STAT3, CCL5, CXCR4, CXCL12, IL6ST, DDIT4 e SESN1, todos implicados em vias inflamatórias, hipóxia tumoral ou regulação metabólica imune.

Essa análise foi realizada tanto a nível global do tecido tumoral quanto em subconjuntos celulares específicos, com destaque para células T CD4+ e T CD8+. Ainda assim, não foram observadas diferenças significativas na expressão desses genes entre os grupos de resposta.

A ausência de diferenças significativas na expressão gênica no tecido tumoral pode estar relacionada à heterogeneidade dentro dos grupos avaliados. Essa variabilidade é reforçada pela análise de PCA, que não evidenciou uma separação clara entre respondedores e não respondedores (Figura 52).



Fonte: Autoria própria.

Figura 52. Análise de PCA de amostras tumorais de acordo com a resposta à terapia.

Gráfico de PCA das amostras tumorais com coloração conforme o desfecho clínico, sendo pacientes respondedores (Response, laranja, n=7) e não respondedores (Non Response, azul, n=8).

Em conclusão, nossos achados nos dados públicos de PBMC e tecido reforçam a hipótese de que, em pacientes não respondedores, mecanismos de inflamação crônica, estresse celular e inibição metabólica contribuem para uma resposta imune periférica disfuncional. A ativação persistente de vias como JAK/STAT3, NF- κ B e a inibição da via mTORC1, evidenciada pelo aumento de genes como IL6ST, DDIT4, SESN1 e TXNIP, sugerem um sistema imunológico pouco responsivo e comprometido metabolicamente.

Por outro lado, a ausência de diferenças significativas na expressão gênica no tecido tumoral, mesmo quando analisado por subconjuntos celulares específicos como células T CD4+ e T CD8+, pode refletir a heterogeneidade intrínseca das amostras avaliadas. Isso reforça a importância da análise do sistema periférico que revelou um perfil imunológico mais claro e consistente, contribuindo de forma direta para a compreensão dos mecanismos associados à falha terapêutica em CMTN.

4.3 Integração dos dados

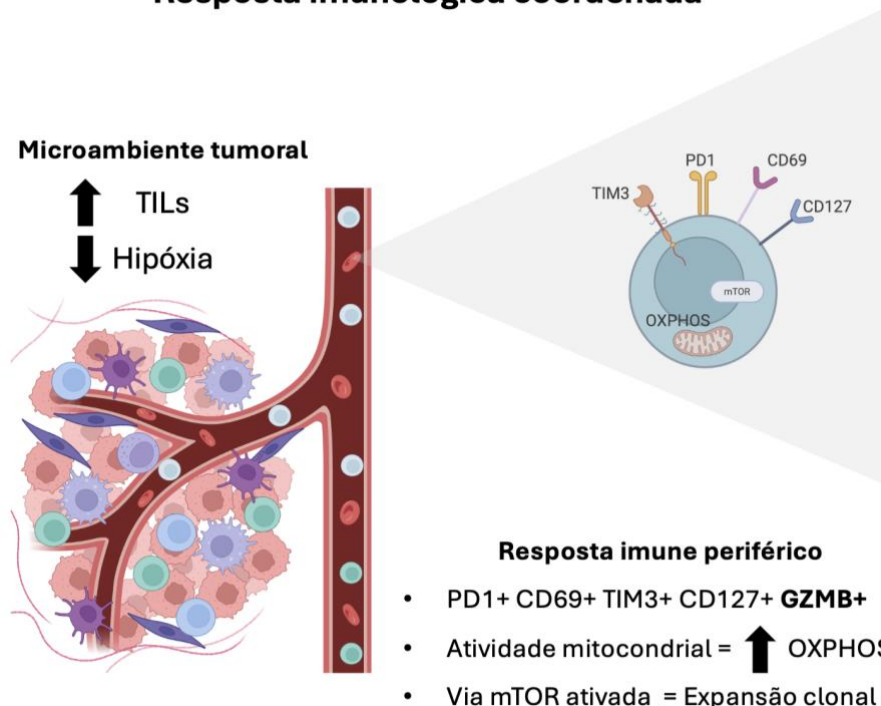
Por último, buscamos integrar os achados provenientes de diferentes abordagens utilizadas ao longo do estudo, incluindo análises em pacientes com CMTN antes e após o tratamento, modelos murinos e dados públicos, a fim de traçar um panorama imune funcional comparativo entre os grupos de pacientes respondedores e não respondedores.

De forma geral, pacientes classificados como respondedores apresentaram um perfil imune mais organizado e funcional (Figura 53). Observamos maior densidade de TILs tumorais associada à maior frequência de linfócitos T circulantes e menor concentração de citocinas inflamatórias no sangue periférico. As populações imunes desses pacientes demonstraram um fenótipo mais ativado, sem evidências de sinalização inflamatória crônica.

Esses achados foram sustentados pela análise de dados públicos, na qual pacientes respondedores apresentaram um enriquecimento de vias citotóxicas, interferon e metabolismo mitocondrial funcional, com destaque para a fosforilação oxidativa. O aumento da atividade do eixo mTORC1, essencial para expansão e funcionalidade de células T, também reforçam um ambiente imunológico mais

competente. Em conjunto, esses dados sugerem que a resposta terapêutica efetiva em CMTN está associada a uma ativação coordenada do sistema imune, capaz de eliminar o tumor e retomar ao estado de homeostase.

Resposta imunológica coordenada



Fonte: Autoria própria.

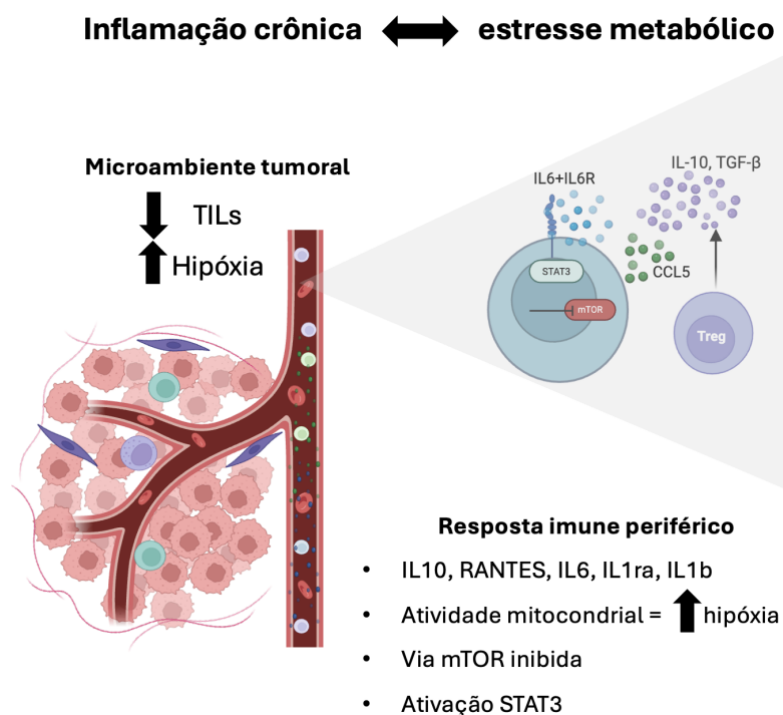
Figura 53. Panorama dos achados no presente estudo em pacientes respondedores.

Por outro lado, pacientes não respondedores revelaram um perfil imunológico desorganizado e inflamatório. Apresentaram menor infiltração de TILs quando há maior presença de linfócitos T CD4+ ativados na circulação, sugerindo uma desconexão entre esses compartimentos. Níveis elevados de citocinas inflamatórias, associados à IL-10 e maior frequência de Tregs produtores de IL-10, indicam um ambiente sistêmico pró-inflamatório, mas com regulação ativa. Após o tratamento, esses pacientes mantiveram expressão aumentada de PD1, sem resposta patológica completa, compatível com um cenário de ativação crônica e perda funcional.

Dados públicos corroboram esse padrão encontrado, com aumento da expressão de genes relacionados à via IL6/STAT3, um eixo associado a progressão e resistência terapêutica no CMTN, e de genes inibidores de mTORC1 (DDIT4, SESN1 e TXNIP), frequentemente induzidos por hipóxia ou estresse celular. Modelos murinos reforçaram essa associação ao demonstrar que a hipóxia no TME se relaciona a um

perfil exausto e progressivo, o que também foi observado nos dados públicos de não respondedores.

Em conjunto, os achados sugerem que não respondedores apresentam uma resposta imune desorganizada e frustrada, marcada por ativação exacerbada, estresse metabólico e perda da capacidade de controle tumoral (Figura 54). Esse contraste com o perfil funcional e sustentado dos respondedores destaca a importância de um equilíbrio entre ativação e regulação imune para a eficácia terapêutica em CMTN.



Fonte: Autoria própria.

Figura 54. Panorama dos achados no presente estudo em pacientes não respondedores.

5. Conclusão

A partir de uma abordagem integrativa entre sangue periférico, microambiente tumoral, modelos murinos e dados públicos, identificamos que a resposta efetiva ao tratamento está associada a um sistema imune funcional, metabolicamente equilibrado e capaz de manter sua atividade ao longo da quimioterapia. Em contraste, a ausência de resposta terapêutica foi marcada por ativação inflamatória crônica, estresse metabólico e falhas na coordenação funcional entre os compartimentos sistêmico e tumoral.

Nosso estudo contribui para a compreensão dos mecanismos imunológicos e metabólicos associados à resposta terapêutica em pacientes com CMTN. Esses mecanismos estão integrados e ilustrados nas Figura 53 e Figura 54, que sintetizam os principais perfis imunológicos identificados nos grupos de pacientes respondedores e não respondedores. Ainda, nossos resultados reforçam a importância de uma ativação imune eficaz e regulada, capaz de sustentar o controle tumoral sem disfunção crônica. Além de fornecer novas perspectivas sobre os mecanismos de resistência terapêutica, os dados aqui apresentados podem apoiar o desenvolvimento de estratégias personalizadas e orientar a seleção de alvos terapêuticos mais eficientes.

6. REFERÊNCIAS

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Vol. 12, Cancer Discovery. American Association for Cancer Research Inc.; 2022. p. 31–46.
2. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: Burden and trends. Vol. 26, Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. American Association for Cancer Research Inc.; 2017. p. 444–57.
3. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Annals of Oncology*. 2011;22(8):1736–47.
4. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Ress CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
5. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5(1):5–23.
6. Wolff AC, Elizabeth Hale Hammond M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(20):2105–22.
7. Ehinger A, Malmström P, Bendahl PO, Elston CW, Falck AK, Forsare C, et al. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013. *Acta Oncol (Madr)*. 2017;56(1):68–74.
8. Trop I, Leblanc SM, David J, Lalonde L, Tran-Thanh D, Labelle M, et al. Molecular classification of infiltrating breast cancer: Toward personalized therapy. *Radiographics*. 2014 Sep 1;34(5):1178–95.
9. Brenton JD, Carey LA, Ahmed A, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: Ready for clinical application? Vol. 23, *Journal of Clinical Oncology*. 2005. p. 7350–60.
10. Almansour NM. Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. Vol. 9, *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A.; 2022.

11. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. Vol. 13, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 674–90.
12. Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2013;18(2):123–33.
13. Shi Y, Jin J, Ji W, Guan X. Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer. Vol. 17, *Molecular Cancer*. Molecular Cancer; 2018. p. 1–11.
14. Lips EH, Mulder L, Oonk A, Van Der Kolk LE, Hogervorst FBL, Imholz ALT, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer*. 2013 May;108(10):2172–7.
15. Mulligan JM, Hill LA, Deharo S, Irwin G, Boyle D, Keating KE, et al. Identification and validation of an anthracycline/cyclophosphamide-based chemotherapy response assay in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(1).
16. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Vol. 25, *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology; 2014. p. 2677–81.
17. Melinda LT, Kirsten MT, Julia R, Bryan H, Gordon BM, Kristin CJ, et al. Homologous recombination deficiency (hrd) score predicts response to platinum-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016 Aug 1;22(15):3764–73.
18. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 May 20;30(15):1796–804.
19. Bonotto M, Gerratana L, Poletto E, Driol P, Giangreco M, Russo S, et al. Measures of Outcome in Metastatic Breast Cancer: Insights From a Real-World Scenario. *Oncologist*. 2014;19(6):608–15.
20. Echeverria G V., Ge Z, Seth S, Zhang X, Jeter-Jones S, Zhou X, et al. Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state. *Sci Transl Med*. 2019;11(488).
21. Cortes J, Rugo HS, Cescon DW, Im SA, Yusof MM, Gallardo C, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022 Jul 21;387(3):217–26.

22. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018 Nov 29;379(22):2108–21.
23. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 27;382(9):810–21.
24. Renner A, Burotto M, Rojas C. Immune Checkpoint Inhibitor Dosing: Can We Go Lower Without Compromising Clinical Efficacy? 2019.
25. Yu PP, Eton O, Garrison LP. Challenges in assessing the clinical utility and economic value of immune checkpoint inhibitor therapies of Cancer. Vol. 7, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2019.
26. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. Vol. 27, *Current Opinion in Immunology*. 2014. p. 16–25.
27. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. Vol. 16, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 151–67.
28. Wu X, Peng M, Huang B, Zhang H, Wang H, Huang B, et al. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett*. 2013;340(1):124–33.
29. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. Vol. 14, *Nature Immunology*. 2013. p. 1014–22.
30. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. Vol. 1843, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier; 2014. p. 2563–82.
31. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2006 Jul 10;203(7):1651–6.
32. Fabian KP, Wolfson B, Hodge JW. From Immunogenic Cell Death to Immunogenic Modulation: Select Chemotherapy Regimens Induce a Spectrum of Immune-Enhancing Activities in the Tumor Microenvironment. Vol. 11, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2021.

33. Liu P, Zhao L, Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immunogenic cell death (ICD) enhancers—Drugs that enhance the perception of ICD by dendritic cells. Vol. 321, *Immunological Reviews*. John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 7–19.
34. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. Vol. 8, *Nature Reviews Immunology*. 2008. p. 59–73.
35. Mukherjee O, Rakshit S, Shanmugam G, Sarkar K. Role of chemotherapeutic drugs in immunomodulation of cancer. Vol. 4, *Current Research in Immunology*. Elsevier B.V.; 2023.
36. Gbadamosi MO, Molchan E, Makarem MS, Coleman KL, Ohaegbulam AC, Streeks KH. Chemoimmunomodulation in triple negative breast cancer: a key to maximizing anti-PD-1 chemoimmunotherapeutic efficacy. Vol. 14, *OncolImmunology*. Taylor and Francis Ltd.; 2025.
37. Zingoni A, Antonangeli F, Sozzani S, Santoni A, Cippitelli M, Soriani A. The senescence journey in cancer immunoediting. Vol. 23, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd; 2024.
38. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. Vol. 6, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2021.
39. Fang L, Liu K, Liu C, Wang X, Ma W, Xu W, et al. Tumor accomplice: T cell exhaustion induced by chronic inflammation. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
40. Wagner J, Rapsomaniki MA, Chevrier S, Anzeneder T, Langwieder C, Dykgers A, et al. A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. *Cell*. 2019;177(5):1330-1345.e18.
41. Azizi E, Carr AJ, Plitas G, Cornish AE, Konopacki C, Prabhakaran S, et al. Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell*. 2018 Aug 23;174(5):1293-1308.e36.
42. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018 Jan 1;19(1):40–50.
43. Herrero-Vicent C, Guerrero A, Gavilá J, Gozalbo F, Hernández A, Sandiego S, et al. Predictive and prognostic impact of tumour-infiltrating lymphocytes in triple-

negative breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ecancermedalscience*. 2017 Aug 15;11.

44. Iwahori K, Shintani Y, Funaki S, Yamamoto Y, Matsumoto M, Yoshida T, et al. Peripheral T cell cytotoxicity predicts T cell function in the tumor microenvironment. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
45. Lucca LE, Axisa PP, Lu B, Harnett B, Jessel S, Zhang L, et al. Circulating clonally expanded T cells reflect functions of tumor-infiltrating T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2021 Apr 5;218(4).
46. Li F, Tian C, Wang Y, Wu H, Jin M, Du X, et al. Prognostic significance of peripheral and tumor-infiltrating lymphocytes in newly diagnosed stage III/IV non-small-cell lung cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2024;11.
47. Cai Z, Jiang J, Huang L, Yuan Y, Zheng R, Zhang J, et al. The Prognostic Impact of Combined Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Pretreatment Blood Lymphocyte Percentage in Locally Advanced Nasopharyngeal Carcinoma. *Front Oncol*. 2022 Jan 18;11.
48. Li M, Xu J, Jiang C, Zhang J, Sun T. Predictive and Prognostic Role of Peripheral Blood T-Cell Subsets in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. 2022 Feb 15;12.
49. Chauhan SK, Dunn C, Andresen NK, Røssevold AH, Skorstad G, Sike A, et al. Peripheral immune cells in metastatic breast cancer patients display a systemic immunosuppressed signature consistent with chronic inflammation. *NPJ Breast Cancer*. 2024 Dec 1;10(1).
50. Giro A, Passildas-Jahanmohan J, Kossai M, Bidet Y, Molnar I, Bernadach M, et al. Comparison of the Predictive and Prognostic Capacities of Neutrophil, Lymphocyte and Platelet Counts and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Triple-negative Breast Cancer: Preliminary Results of the PERCEPTION Study. *Anticancer Res*. 2024 Nov 1;44(11):4983–94.
51. Giatromanolaki A, Michos GD, Xanthopoulou E, Koukourakis MI. HLA-class-I expression loss, tumor microenvironment and breast cancer prognosis. *Cell Immunol*. 2024 May 1;399–400.
52. Mast JM, Kuppusamy P. Hyperoxygenation as a therapeutic supplement for treatment of triple negative breast cancer. *Front Oncol*. 2018;8(NOV).

53. Liu L, Bai J, Hu L, Jiang D. Hypoxia-mediated activation of hypoxia-inducible factor-1 α in triple-negative breast cancer: A review. Vol. 102, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2023. p. E35493.
54. Ivashkiv LB. The hypoxia–lactate axis tempers inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2020 Feb 1;20(2):85–6.
55. Duechler M, Peczek L, Zuk K, Zalesna I, Jeziorski A, Czyz M. The heterogeneous immune microenvironment in breast cancer is affected by hypoxia-related genes. *Immunobiology*. 2014 Feb;219(2):158–65.
56. Ma S, Zhao Y, Lee WC, Ong LT, Lee PL, Jiang Z, et al. Hypoxia induces HIF1 α -dependent epigenetic vulnerability in triple negative breast cancer to confer immune effector dysfunction and resistance to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
57. Napier TS, Lynch SE, Lu Y, Song PN, Burns AC, Sorace AG. Molecular Imaging of Oxygenation Changes during Immunotherapy in Combination with Paclitaxel in Triple Negative Breast Cancer. *Biomedicines*. 2023 Jan 1;11(1).
58. Vignali PDA, DePeaux K, Watson MLJ, Ye C, Ford BR, Lontos K, et al. Hypoxia drives CD39-dependent suppressor function in exhausted T cells to limit antitumor immunity. *Nat Immunol*. 2023 Feb 1;24(2):267–79.
59. Scharping NE, Rivadeneira DB, Menk A V., Vignali PDA, Ford BR, Rittenhouse NL, et al. Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2021;22(2):205–15.
60. Wang L, Han H, Ma J, Feng Y, Han Z, Maharaj V, et al. Identification of hypoxia-immune-related signatures for predicting immune efficacy in triple-negative breast cancer. *Oncologie*. 2024;
61. Ba L, Zhao Z, Zhang C, Chu Y, Wu C. Expression and prognostic impact of hypoxia- and immune escape-related genes in triple-negative breast cancer: A comprehensive analysis. *Int Immunopharmacol*. 2025 Jan 27;146.
62. Yang X, Weng X, Yang Y, Zhang M, Xiu Y, Peng W, et al. A combined hypoxia and immune gene signature for predicting survival and risk stratification in triple-negative breast cancer [Internet]. Vol. 13. 2021. Available from: www.aging-us.com
63. Zheng S, Zou Y, Liang J ying, Xiao W, Yang A, Meng T, et al. Identification and validation of a combined hypoxia and immune index for triple-negative breast cancer. *Mol Oncol*. 2020 Nov 1;14(11):2814–33.

64. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*. 2014;384(9938):164–72.
65. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, Rajan R, Kuerer H, Valero V, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(28):4414–22.
66. Hiraoka N, Ino Y, Sekine S, Tsuda H, Shimada K, Kosuge T, et al. Tumour necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation. Vol. 103, *British Journal of Cancer*. 2010. p. 1057–65.
67. Kennedy Gilchrist BW, Gray R, Fowble B, Tormey DC, Taylor IV SG. Tumor Necrosis Is a Prognostic Predictor for Early Recurrence and Death in Lymph Node-Positive Breast Cancer: A 10-Year Follow-Up Study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group Patients. Vol. 11, *Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology*. 1992.
68. Johnstone CN, Smith YE, Cao Y, Burrows AD, Cross RSN, Ling X, et al. Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *DMM Disease Models and Mechanisms*. 2015 Mar 1;8(3):237–51.
69. Goh PK, Wiede F, Zeissig MN, Britt KL, Liang S, Molloy T, et al. PTPN2 elicits cell autonomous and non-cell autonomous effects on antitumor immunity in triple-negative breast cancer. Vol. 8, *Sci. Adv*. 2022.
70. Zhang Y, Chen H, Mo H, Hu X, Gao R, Zhao Y, et al. Single-cell analyses reveal key immune cell subsets associated with response to PD-L1 blockade in triple-negative breast cancer. *Cancer Cell*. 2021;
71. Wolf FA, Angerer P, Theis FJ. SCANPY: Large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol*. 2018 Feb 6;19(1).
72. Tsuyuzaki K, Sato H, Sato K, Nikaido I. Benchmarking principal component analysis for large-scale single-cell RNA-sequencing. *Genome Biol*. 2020 Jan 20;21(1).
73. Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre CA, Kwok IWH, Ng LG, et al. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol*. 2019 Jan 1;37(1):38–47.

74. Blondel VD, Guillaume JL, Lambiotte R, Lefebvre E. Fast unfolding of communities in large networks. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*. 2008 Oct 1;2008(10).
75. Fang Z, Liu X, Peltz G. GSEAPy: a comprehensive package for performing gene set enrichment analysis in Python. *Bioinformatics*. 2023 Jan 1;39(1).
76. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst*. 2015 Dec 23;1(6):417–25.
77. Godbold G, Proescher J, Gaudet P. New and revised gene ontology biological process terms describe multiorganism interactions critical for understanding microbial pathogenesis and sequences of concern. *J Biomed Semantics*. 2025 Dec 1;16(1).
78. Baek SH, Lee MJ, Kook Y, Bae SJ, Jeong J, Cha YJ, et al. Pathological complete response, histologic grade, and level of stromal tumor-infiltrating lymphocytes in ER + HER2- breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2025 Dec 1;27(1).
79. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 153–67.
80. Chen RY, Zhu Y, Shen YY, Xu QY, Tang HY, Cui NX, et al. The role of PD-1 signaling in health and immune-related diseases. Vol. 14, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
81. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *New England Journal of Medicine*. 2016 Nov 3;375(18):1767–78.
82. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: From discovery to clinical application. Vol. 19, *International Immunology*. 2007. p. 813–24.
83. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. Vol. 47, *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag; 2017. p. 946–53.
84. Mita Y, Kimura MY, Hayashizaki K, Koyama-Nasu R, Ito T, Motohashi S, et al. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *Int Immunol*. 2018 Nov 14;30(12):559–67.
85. Avery L, Filderman J, Szymczak-Workman AL, Kane LP. Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is

dispensable for T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Mar 6;115(10):2455–60.

86. Yi M, Li T, Niu M, Zhang H, Wu Y, Wu K, et al. Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy. Vol. 9, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2024.

87. Bhol NK, Bhanjadeo MM, Singh AK, Dash UC, Ojha RR, Majhi S, et al. The interplay between cytokines, inflammation, and antioxidants: mechanistic insights and therapeutic potentials of various antioxidants and anti-cytokine compounds. Vol. 178, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2024.

88. Akkız H, Şimşek H, Balcı D, Ülger Y, Onan E, Akçaer N, et al. Inflammation and cancer: molecular mechanisms and clinical consequences. Vol. 15, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media SA; 2025.

89. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Vol. 8, *Nature Reviews Immunology*. 2008. p. 523–32.

90. Wang S, Gao X, Shen G, Wang W, Li J, Zhao J, et al. Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Sci Rep*. 2016 Apr 14;6.

91. Valdés-Ferrada J, Muñoz-Durango N, Pérez-Sepulveda A, Muñiz S, Coronado-Arrázola I, Acevedo F, et al. Peripheral Blood Classical Monocytes and Plasma Interleukin 10 Are Associated to Neoadjuvant Chemotherapy Response in Breast Cancer Patients. *Front Immunol*. 2020 Jul 9;11.

92. Toney NJ, Opdenaker LM, Cicek K, Frerichs L, Kennington CR, Oberly S, et al. Tumor-B-cell interactions promote isotype switching to an immunosuppressive IgG4 antibody response through upregulation of IL-10 in triple negative breast cancers. *J Transl Med*. 2022 Dec 1;20(1).

93. Ostapchuk YO, Cetin EA, Perfilyeva Y V., Yilmaz A, Skiba YA, Chirkin AP, et al. Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF- β in healthy donors and breast cancer patients. *Cell Immunol*. 2015 Nov 1;298(1–2):37–46.

94. Jin K, Pandey NB, Popel AS. Simultaneous blockade of IL-6 and CCL5 signaling for synergistic inhibition of triple-negative breast cancer growth and metastasis. *Breast Cancer Research*. 2018 Jun 14;20(1).

95. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V., Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with

or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(9):983–91.

96. Dieci M V., Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. *Annals of Oncology*. 2014;25(3):611–8.

97. Lopes AD, Galdino NAL, Figueiredo AB, Brianese RC, Morais KLP, De Brot M, et al. Systemic immune mediators reflect tumour-infiltrating lymphocyte intensity and predict therapeutic response in triple-negative breast cancer. *Immunology*. 2023;

98. Wang L, Simons DL, Lu X, Tu TY, Solomon S, Wang R, et al. Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer. *Nat Immunol*. 2019 Sep 1;20(9):1220–30.

99. Ahmadzadeh M, Pasetto A, Li J, Deniger DC, Stevanović S, Robbins PF, et al. Tumor-infiltrating human CD4 + regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity [Internet]. Vol. 4, *Sci. Immunol*. 2019. Available from: <http://immunology.sciencemag.org/>

100. Allen BM, Hiam KJ, Burnett CE, Venida A, DeBarge R, TenVooren I, et al. Systemic dysfunction and plasticity of the immune macroenvironment in cancer models. *Nat Med*. 2020 Jul 1;26(7):1125–34.

101. Dyikanov D, Zaitsev A, Vasileva T, Wang I, Sokolov AA, Bolshakov ES, et al. Comprehensive peripheral blood immunoprofiling reveals five immunotypes with immunotherapy response characteristics in patients with cancer. *Cancer Cell*. 2024 May 13;42(5):759-779.e12.

102. Bakrim S, Fessikh M El, Elhrech H, Omari N El, Amanullah M, Ming LC, et al. Targeting inflammation in cancer therapy: from mechanistic insights to emerging therapeutic approaches. Vol. 23, *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd; 2025.

103. Liubomirski Y, Lerrer S, Meshel T, Rubinstein-Achiasaf L, Morein D, Wiemann S, et al. Tumor-stroma-inflammation networks promote pro-metastatic chemokines and aggressiveness characteristics in triple-negative breast cancer. *Front Immunol*. 2019;10(APR):1–24.

104. Di Russo S, Elizabeth Borsatti G, Bouzidi A, Romana Liberati F, Riva A, Tripodi F, et al. NF-κB-mediated cytokine secretion and glutamate metabolic

reprogramming converge in breast cancer brain tropism. 2025; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217907>

105. Egusquiaguirre SP, Yeh JE, Walker SR, Liu S, Frank DA. The STAT3 Target Gene TNFRSF1A Modulates the NF- κ B Pathway in Breast Cancer Cells. *Neoplasia* (United States). 2018 May 1;20(5):489–98.

106. Zhang Y, Kurupati R, Liu L, Zhou XY, Zhang G, Hudaihed A, et al. Enhancing CD8⁺ T Cell Fatty Acid Catabolism within a Metabolically Challenging Tumor Microenvironment Increases the Efficacy of Melanoma Immunotherapy. *Cancer Cell*. 2017 Sep 11;32(3):377-391.e9.

107. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? Vol. 41, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd; 2016. p. 211–8.

108. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. Vol. 33, *Cancer Cell*. Cell Press; 2018. p. 547–62.

109. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo SL, Teng KWW, et al. Bystander CD8⁺ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature*. 2018 May 24;557(7706):575–9.

110. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Vol. 27, *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2017. p. 109–18.

111. Rudqvist NP, Charpentier M, Lhuillier C, Wennerberg E, Spada S, Sheridan C, et al. Immunotherapy targeting different immune compartments in combination with radiation therapy induces regression of resistant tumors. *Nat Commun*. 2023 Dec 1;14(1).

112. Crosby EJ, Wei J, Yang XY, Lei G, Wang T, Liu CX, et al. Complimentary mechanisms of dual checkpoint blockade expand unique T-cell repertoires and activate adaptive anti-tumor immunity in triple-negative breast tumors. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018;7(5). Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1421891>

113. O'Melia MJ, Manspeaker MP, Thomas SN. Tumor-draining lymph nodes are survival niches that support T cell priming against lymphatic transported tumor antigen and effects of immune checkpoint blockade in TNBC. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2021 Aug 1;70(8):2179–95.

114. Najjar YG, Menk A V., Sander C, Rao U, Karunamurthy A, Bhatia R, et al. Tumor cell oxidative metabolism as a barrier to PD-1 blockade immunotherapy in melanoma. *JCI Insight*. 2019 Mar 7;4(5).

115. Zandberg DP, Menk A V., Velez M, Normolle D, Depeaux K, Liu A, et al. Tumor hypoxia is associated with resistance to PD-1 blockade in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Immunother Cancer*. 2021 May 13;9(5).
116. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. Vol. 16, *Clinical Cancer Research*. 2010. p. 2927–31.
117. Foltyn M, Luger AL, Lorenz NI, Sauer B, Mittelbronn M, Harter PN, et al. The physiological mTOR complex 1 inhibitor DDIT4 mediates therapy resistance in glioblastoma. *Br J Cancer*. 2019 Mar 5;120(5):481–7.
118. Parmigiani A, Nourbakhsh A, Ding B, Wang W, Kim YC, Akopiants K, et al. Sestrins Inhibit mTORC1 Kinase Activation through the GATOR Complex. *Cell Rep*. 2014 Nov 20;9(4):1281–91.
119. Ma JH, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. Vol. 18, *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central Ltd.; 2020.
120. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. Proteasomes in immune cells: More than peptide producers? Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. 2010. p. 73–8.
121. Nakatani T, Tsujimoto K, Park JH, Jo T, Kimura T, Hayama Y, et al. The lysosomal Ragulator complex plays an essential role in leukocyte trafficking by activating myosin II. *Nat Commun*. 2021 Dec 1;12(1).
122. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: A small protein with major functions. Vol. 16, *Glycobiology*. 2006.
123. Wu G, Li Y. TGF- β induced reprogramming and drug resistance in triple-negative breast cells. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2022 Dec 1;23(1).
124. Long L, Fei X, Chen L, Yao L, Lei X. Potential therapeutic targets of the JAK2/STAT3 signaling pathway in triple-negative breast cancer. Vol. 14, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media SA; 2024.
125. Deng J, Pan T, Liu Z, McCarthy C, Vicencio JM, Cao L, et al. The role of TXNIP in cancer: a fine balance between redox, metabolic, and immunological tumor control. Vol. 129, *British Journal of Cancer*. Springer Nature; 2023. p. 1877–92.
126. Qin JJ, Yan L, Zhang J, Zhang WD. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: A systematic review. Vol. 38, *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. BioMed Central Ltd.; 2019.
127. Jin HO, Seo SK, Kim YS, Woo SH, Lee KH, Yi JY, et al. TXNIP potentiates Redd1-induced mTOR suppression through stabilization of Redd1. *Oncogene*. 2011 Sep 1;30(35):3792–801.

128. Li Y, Miao LY, Xiao YL, Huang M, Yu M, Meng K, et al. Hypoxia induced high expression of thioredoxin interacting protein (TXNIP) in non-small cell lung cancer and its prognostic effect. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(7):2953–8.
129. Kim JY, Kwon YG, Kim YM. The stress-responsive protein REDD1 and its pathophysiological functions. Vol. 55, *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature; 2023. p. 1933–44.
130. Ma EH, Verway MJ, Johnson RM, Roy DG, Steadman M, Hayes S, et al. Metabolic Profiling Using Stable Isotope Tracing Reveals Distinct Patterns of Glucose Utilization by Physiologically Activated CD8⁺ T Cells. *Immunity*. 2019 Nov 19;51(5):856-870.e5.
131. Levine LS, Hiam-Galvez KJ, Marquez DM, TenVooren I, Madden MZ, Contreras DC, et al. Single-cell analysis by mass cytometry reveals metabolic states of early-activated CD8⁺ T cells during the primary immune response. *Immunity*. 2021 Apr 13;54(4):829-844.e5.