

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO
PRÉ-TRATAMENTO NEOADJUVANTE E ASSOCIAÇÃO
COM RESPOSTA PATOLÓGICA COMPLETA**

ANANDA DOMINGUES LOPES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção de Título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Co-orientador: Amanda Braga de Figueiredo

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

L864 Lopes, Ananda Domingues
 **Determinação de citocinas solúveis no plasma de pacientes com CMTN
 tratados com quimioterapia neoadjuvantes: associação de perfis solúveis de
 citocinas com respostas à terapia e progressão da doença / Ananda
 Domingues Lopes – São Paulo, 2020.**
 40p.
 Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.
 Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
 Orientador: Kenneth John Gollob

 Descritores: 1. Câncer de Mama Triplo-negativo/Triple Negative Breast
 Neoplasm. 2. Imunologia/Immunology. 3. Tratamento neoadjuvante/
 Neoadjuvant Therapy. 4. Citocinas/Cytokines.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08

Dedico este trabalho àqueles que acreditam e apoiam a ciência, a minha família pelo suporte para minhas conquistas e sonhos e aos amigos pelo companheirismo nos momentos difíceis e também nos momentos felizes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que me deu determinação e força para seguir meu caminho. Agradeço meu orientador Dr. Kenneth John Gollob pela chance de desenvolver meu trabalho, pelos ensinamentos e sabedoria compartilhada, pela disposição e empenho em conduzir este trabalho de maneira tão brilhante. Agradeço minha coorientadora Dra. Amanda Braga de Figueiredo por todos os ensinamentos, por horas de estudo e experimento, pela ajuda nos momentos difíceis e pelo companheirismo nessa jornada. É uma honra trabalhar com pessoas ilustres como vocês.

Agradeço minha família, principalmente meus pais Andréa e Benedito, e meu irmão Alan Colin, minha avó e meus tios que sempre acreditaram em mim e me apoiaram. Obrigada por tudo, é um privilégio ter uma família assim, vocês são minha base.

Agradeço meus parceiros de trabalho Nayane, Guilherme, Stéphanie, Dálete e Iasmim por todos os momentos compartilhados, pelas dificuldades e pelas conquistas. Agradeço pelo suporte desde os experimentos até a escrita, pelas viagens e congressos e pelo companheirismo nessa jornada que ficou mais feliz e mais leve por dividir com vocês.

Agradeço também a todos do laboratório de imuno-oncologia do CIPE pela disposição e pela ajuda em todos os processos do trabalho além do conhecimento compartilhado.

Agradeço aos meus amigos e minhas primas que mesmo longe se fizeram presente e me entenderam nos momentos em que não pude comparecer e também por sempre acreditarem em mim, principalmente nos momentos mais difíceis.

RESUMO

Lopes AD. **Determinação de citocinas solúveis no plasma de pacientes com CMTN tratados com quimioterapia neoadjuvantes: associação de perfis solúveis de citocinas com respostas à terapia e progressão da doença.** [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é uma doença agressiva e é definida pela ausência da expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona (ER e PR), bem como a não expressão do gene receptor 2 de fator de crescimento epitelial humano (HER2). A administração de quimioterapia neoadjuvante tem mostrado eficácia no tratamento de CMTN e o alcance da resposta patológica completa (pCR) é associado com uma maior sobrevivência. A resposta imunológica desempenha um importante papel no tratamento neoadjuvante, observado pela relação entre a porcentagem de linfócitos infiltrados na região estromal (TILs) em biópsias de pacientes pré-tratados e a probabilidade de atingir pCR. Além disso, uma forma importante de modulação do sistema imunológico se dá através de proteínas denominadas citocinas/quimiocinas, que podem ter papel de ativação ou de imunossupressão. Como objetivo, avaliamos o perfil imunológico das pacientes com CMTN no momento do diagnóstico através da detecção de 27 citocinas/quimiocinas circulantes e determinação dos níveis de TILs afim de identificar possíveis biomarcadores de resposta. As pacientes que alcançaram a pCR possuíam altos níveis de GM-CSF, FGF-basic, VEGF, IL-2 e IL-5 quando comparadas as pacientes não respondedoras. Além disso, o grupo de pacientes respondedoras possuía uma correlação positiva entre as citocinas IFN- γ e IL-7 com a porcentagem de TILs, enquanto as pacientes não respondedoras mostravam uma correlação negativa, ou não possuíam correlação. Finalmente, observamos que níveis de fatores imunológicos sistêmicos como FGF-basic, IL-5 e principalmente GM-CSF são capazes de predizer pCR (valor de AUC 0,64 – 0,71), e que a combinação desses mediadores com níveis de TILs aumentam seus poderes de predição (valor de AUC 0,71 – 0,82). A partir desses resultados, é possível notar que pacientes que atingem a pCR possuem maiores níveis de TILs e mediadores imunológicos circulantes quando comparadas as pacientes não respondedoras, além de um sistema imunológico com perfil mais pró-inflamatório. Também é possível apontar possíveis biomarcadores para a resposta patológica completa.

Descritores: Câncer de mama triplo-negativo; imunologia; tratamento neoadjuvante; citocinas

ABSTRACT

Lopes AD. **[Determination of plasma soluble cytokines from patients with neoadjuvant chemotherapy: association of soluble cytokine profiles with responses to therapy and disease progression]**. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive form of breast cancer defined by the lack of expression of estrogen receptor, progesterone receptors and of the human epithelial growth factor receptor 2. Neoadjuvant chemotherapy has proven efficacy in the treatment of TNBC and a pathological complete response (pCR) is significantly associated with long-term survival. The immune response exerts an important role in response to neoadjuvant chemotherapy as indicated by the relation between the percentage of stromal tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in pre-treated tumor tissue samples and the likelihood of achieving pCR. Despite this, the relationship between systemic immune response and the tumor microenvironment is unclear. In this prospective study we determined the systemic plasma immune profile of TNBC patients before treatment using a panel of 27 immune mediators and measured the percentage of TILs from the same patients. Patients that went on to demonstrate pCR had significantly higher levels of the systemic factors, GM-CSF, FGF-basic, VEGF, IL-2, and IL-5, than the non-responders. Moreover, responders displayed a strong positive correlation between the cytokines IFN- γ and IL-7 with the percentage of TILs, while non-responders had a negative or no correlation. Finally, systemic immune mediator levels before treatment like FGF-basic, IL-5 and GM-CSF predict pCR (AUC range 0.64 - 0.71), and the combination of immune mediators and TILs improved pCR prediction (AUC 0.71 - 0.82). In conclusion, increased systemic immune mediators reflect increased TILs percentage, and act as potential predictive biomarkers of pCR for TNBC patients submitted to neoadjuvant chemotherapy.

Keywords: Triple negative breast neoplasm; immunology; neoadjuvant therapy; cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fases da imunoedição do câncer.....	5
Figura 2	Linfócitos infiltrados na região estromal e intratumoral do tumor.....	8
Figura 3	Pacientes recrutadas e analisadas no estudo	11
Figura 4	Delineamento experimental do estudo.....	12
Figura 5	Concentração das citocinas FGF-basic, VEGF e GM-CSF no plasma de pacientes com CMTN.....	17
Figura 6	Concentração das citocinas IL-2, IL-5, IL-13 e IL-15 no plasma de pacientes com CMTN.....	18
Figura 7	Porcentagem de TILs Total, Estromais e Intratumorais em pacientes Respondedores e Não-Respondedores.....	19
Figura 8	Correlação de citocinas com TILs totais, estromais e intratumorais em pacientes CMTN.....	20
Figura 9	Matriz de correlação TILs totais e estromais com citocinas e quimiocinas inflamatórias	21
Figura 10	Matriz de correlação entre TILs e citocinas/quimiocinas.....	22
Figura 11	Curva ROC dos TILs.....	24
Figura 12	Curva ROC	25
Figura 13	Forest Plot representando a razão da probabilidade de obter uma resposta patológica completa de acordo com os níveis plasmáticos das citocinas	27

Figura 14	Estimado de Kaplan-Meier. Expressão de citocinas relacionadas com sobrevida livre de recorrência (relapse free-survival) em pacientes com CMTN.....	28
------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização clínica e demográfica das pacientes com CMTN	16
Tabela 2	Análise univariada dos níveis de TILs nas regiões do tumor	23
Tabela 3	Análise univariada e multivariada das citocinas com TILs	24
Tabela 4	Análise univariada e multivariada das citocinas com TILs ou Grau Histológico	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
BLBC	Câncer de mama “ <i>Basal-like</i> ”
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CI	Intervalo de confiança
cm	centímetros
CTL	Linfócito T citotóxico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF-basic	Fator de crescimento de fibroblastos
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
HE	Hematoxilina e Eosina
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
IFN-g	Interferon Gama
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KS	Kolmogorov-Smirnoff
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MDSC	Células supressoras de origem mieloides
MHC-I	Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade I
Min	Minuto
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP-1β	Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta
Não-pCR	Não resposta patológica completa
NK	Células “ <i>natural killer</i> ”
NKT	Linfócitos T “ <i>natural killer</i> ”
NR	Não- Respondedoras

OR	<i>“Odds Ratio”</i>
PARP	Polimerase poli ADP-ribose
pCR	Resposta patológica completa
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDGF- β	Fator de crescimento derivado de plaquetas beta
PD-L1	Ligante da proteína de morte celular programada 1
pg/mL	Picograma por mililitro
R	Respondedoras
RCB	<i>“Residual Cancer Burden”</i>
RE	Receptor de estrógeno
RFS	Sobrevida livre de
RP	Receptor de progesterona
SA-PE	Streptavidina- α Ficoeritina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
Th	Linfócitos T auxiliaries <i>“helper”</i>
Th1	Linfócitos T <i>“helper” 1</i>
Th17	Linfócitos T <i>“helper” 17</i>
Th2	Linfócitos T <i>“helper” 2</i>
TILs	Linfócitos infiltrados no tumor
TLS	Estrutura linfoide terciária
CMTN	Câncer de mama triplo negativo
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócitos T reguladores
T$\gamma\delta$	Linfócitos T gama delta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WHO	Organização Mundial da Saúde
μm	micrómetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de mama triplo negativo	2
1.2	Defesa anti-tumoral	4
1.2.1	Perfil Imunológico Solúvel.....	6
1.2.2	Microambiente Tumoral	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo Geral	9
2.2	Objetivo Específico	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1	Recrutamento de pacientes	10
3.2	Tratamento.....	11
3.3	Coleta de plasma.....	11
3.4	Avaliação de citocinas	12
3.5	Análise do infiltrado tumoral.....	13
3.6	Resposta ao tratamento	14
3.7	Avaliação estatística	14
4	RESULTADOS	15
4.1	Caracterização clinicopatológica das pacientes.....	15
4.2	Análise de citocinas circulantes.....	16
4.3	Avaliação de linfócitos infiltrados no tumor	18
4.4	Correlação das citocinas circulantes com TILs	19
4.5	Avaliação do poder de predição de resposta das citocinas circulantes.....	23
4.6	Análise in sílico	27
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO.....	34

7	REFERÊNCIAS.....	35
----------	-------------------------	-----------

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação celular acelerada devido a falhas no controle dessa proliferação ¹. É responsável por aproximadamente 8 milhões de óbitos por ano em todo mundo, sendo a segunda maior causa de morte em toda a população. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de mama é o mais prevalente na população feminina brasileira com o surgimento de mais de 59 mil novos casos no ano de 2018, enquanto mundialmente afeta cerca de 2 milhões de mulheres por ano, sendo um dos responsáveis por 15% das mortes relacionadas ao câncer segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO).

O câncer de mama é conhecido como uma doença heterogênea e complexa devido à existência de subtipos com características distintas, inclusive em relação aos padrões de respostas às múltiplas terapias existentes e nos desfechos clínicos ².

A subclassificação molecular dos tumores de mama se baseou no perfil de expressão gênica, sendo a partir dessa estabelecidos os subtipos intrínsecos. A subclassificação em subtipos intrínsecos foi inicialmente proposta por Perou et al., em 2000 e 2011, que avaliaram as características moleculares dos tumores mamários e subdividiram os tumores de mama em 05 subgrupos: luminal A, luminal B, superexpressores do gene *ERBB2*, basal e *normal-like* ^{3,4}.

Os tumores basais expressam genes característicos de células basais ou mioepiteliais e normalmente envolvidos com regulação de proliferação, invasão, migração e inibição de apoptose. 8-20% dos tumores de mama são basais. São tumores que acometem mais frequentemente indivíduos jovens, têm alto grau histológico, elevado pleomorfismo celular, alta relação núcleo-citoplasmática, alto índice mitótico, células apoptóticas frequentes, ausência de formação de túbulos, estroma escasso, invasão do tipo “pushing border” e necrose do tipo comedo ou geográfica central ^{5,6}

Entretanto, o uso de classificadores baseados em expressão gênica não é de fácil acesso, dessa forma, como maneira de criar uma aproximação dessa classificação em subtipos intrínsecos, usando tecnologias mais ampla e facilmente disponíveis, foi elaborada baseada na expressão de marcadores de imuno-histoquímica (RE - receptor de estrógeno, RP – receptor de progesterona, HER2 e Ki67), mais utilizada na prática clínica, que é periodicamente revisada pelo Conselho Internacional de Especialistas de Saint Gallen ⁷. Empregando a classificação

baseada em imuno-histoquímica são definidos 4 grupos: luminal A, luminal B, hiperexpressores de HER2 e triplo-negativo (CMTN).

Os tumores luminais A são os mais comuns entre os cânceres de mama, e são caracterizados pela expressão de ambos receptores hormonais (RE e RP) e pela ausência de expressão do fator de crescimento epidérmico humano HER2, ou da ausência de amplificação do gene *ERBB2*. Possuem baixa proliferação celular refletido pela baixa expressão de Ki-67. Esse subtipo possui melhor prognóstico e, devido, à expressão de receptores hormonais têm boa resposta aos tratamentos hormonais ⁸.

Os tumores luminais B, por sua vez, expressam RE e RP, semelhantemente ao subtipo anteriormente descrito, entretanto, as células apresentam maior taxa de proliferação celular, refletida na expressão mais elevada de Ki-67, ou apresentam superexpressão do HER2 ou amplificação do gene *ERBB2*. Os tumores luminais B apresentam desfechos clínicos piores quando comparado ao luminal A, com maior risco de disseminação à distância ⁹.

Os tumores HER2 positivos puros recebem essa denominação devido a superexpressão desse proto-oncogene que resulta em um crescimento celular acelerado, por essa razão possuem um comportamento mais agressivo ¹⁰. Além disso, esses tumores não apresentam expressão dos receptores de estrógeno e progesterona. Esse é um subgrupo associado com elevado risco de disseminação metastática, que apresentou uma melhora importante da evolução clínica depois da introdução das terapias anti-HER2, como o trastuzumabe (anticorpo monoclonal anti-HER2) ¹¹.

O subtipo triplo-negativo não expressa receptores de estrógeno e de progesterona, nem expressam HER2 ou apresentam amplificação do gene *ERBB2*. Esses tumores possuem um comportamento mais agressivo, com elevado potencial metastático e associado com menor tempo de sobrevida ¹². O subtipo triplo-negativo, como baseado em imuno-histoquímica, é uma aproximação do subtipo intrínseco basal, baseado em expressão gênica, no entanto esses dois grupos não são completamente superponíveis. 15-45% dos tumores basais expressam RE, RP ou HER2 e apenas 85% dos tumores triplo-negativos são do subtipo intrínseco basal ^{5,6}.

1.1 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

Descrito pela primeira vez em 2005 ¹³, o CMTN representa cerca de 15 a 25% dos tumores de mama e sua prevalência é maior em mulheres afro-americanas com idade inferior a 40 anos.

A maioria dos CMTN (80%) são considerados tumores “basal-like” (CMTN) devido à expressão gênica das citoqueratinas 5, 14 e 17 e do receptor EGFR, além de se assemelharem às células basais e mioepiteliais ¹⁴. Porém, não é apropriado considerar o câncer de mama triplo negativo como sinônimo de tumor basal pois as características genéticas que divergem entre eles mostram que aproximadamente 30% desse grupo não são tumores do tipo basal ¹⁵.

Dentre os fatores de risco relacionados à ocorrência de CMTN podemos citar:

- Mutações do gene BRCA: Sabe-se que a maioria dos pacientes com CMTN possuem relação com a mutação germinativa do gene BRCA. O desenvolvimento de CMTN é observado em aproximadamente 60% das mutações no gene BRCA1, porém essa relação não é vista em relação ao gene BRCA2 ^{16,17}.
- Status pré-menopausa: O desenvolvimento de tumores de mama triplo-negativos é mais incidente nas mulheres na pré-menopausa ¹⁸.
- Obesidade: Estudos mostram que mulheres com obesidade possuem um alto risco (40% à 80%) de desenvolver câncer de mama triplo negativo quando se encontram na pré-menopausa ^{12,19}.
- Além desses, outros fatores influenciam na ocorrência desse tumor e sua prevalência é maior em mulheres afro-americanas e com alta paridade.

É considerado um tumor de alto grau com mau 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 ¹⁰.

O tratamento para o CMTN é baseado em sua maioria, na administração de quimioterápicos distintos no regime de neoadjuvância e as classes de fármacos que compõem o tratamento são: antraciclinas, ciclofosfamidás, taxanos e carboplatinas. Esses fármacos atuam principalmente na ativação da morte celular, mas também possuem mecanismos que ativam a resposta imunológica e inibem a imunossupressão causada pelas células tumorais ^{20,21}.

É visto que 40 à 60% das pacientes com CMTN que recebem a quimioterapia neoadjuvante alcançam a resposta patológica completa (pCR), e assim possuem menor risco de recorrência e maior sobrevida global ²². Contudo, a maioria das pacientes que não respondem ao tratamento desenvolvem metástase, levando ao pior desfecho clínico ²³.

Tratamentos com diferentes abordagens estão sendo estudados, como por exemplo os inibidores de PARP (polimerase poli ADP-ribose). PARP são enzimas nucleares envolvidas na regulação de mecanismos de reparo de DNA, estabilidade genômica e regulação da sobrevivência das células ²⁴. Os inibidores de PARP inibem a atividade catalítica desta proteína

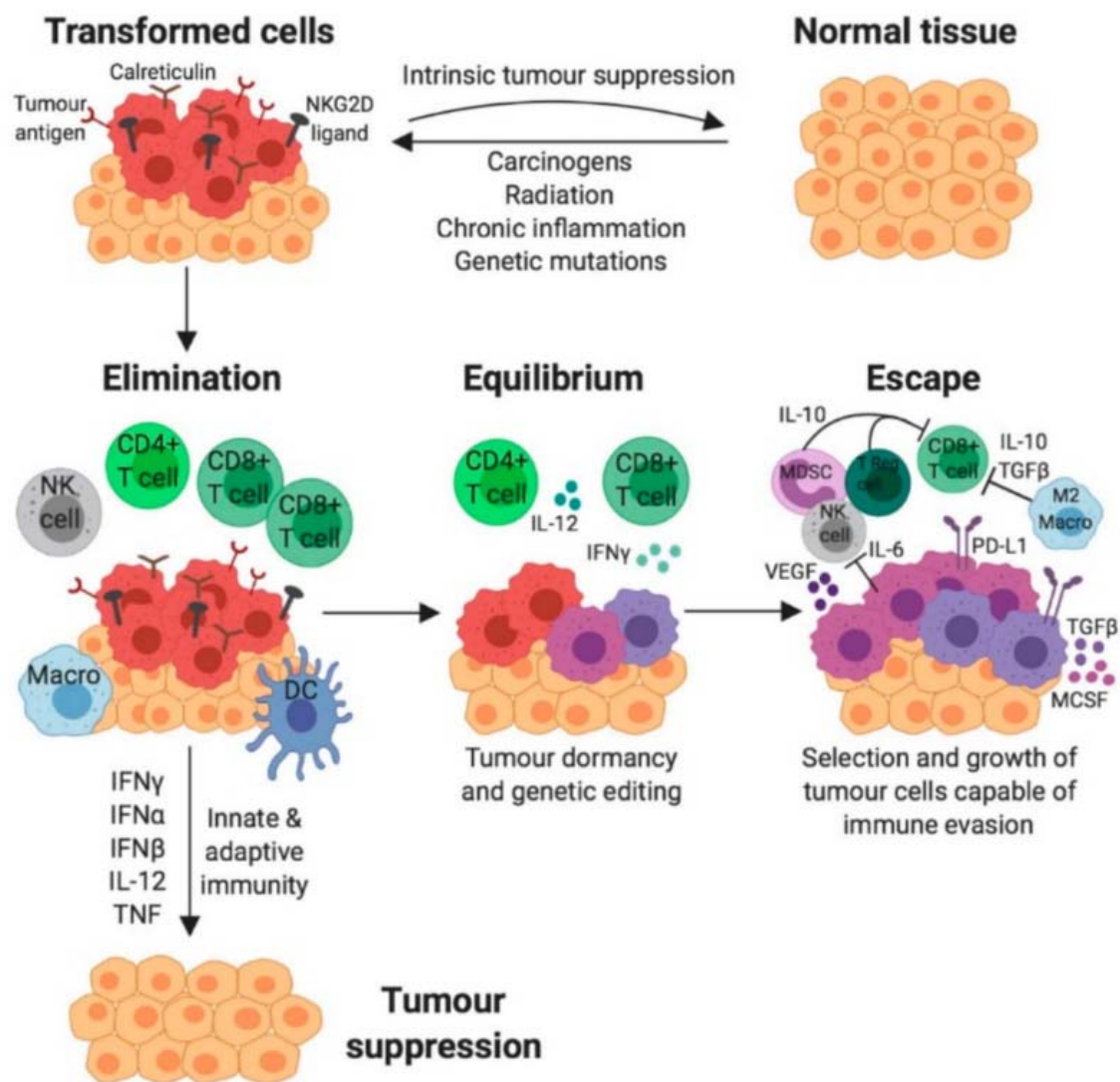
em pacientes com mutações dos genes BRCA1/2, sensibilizando células que serão afetadas pelos quimioterápicos e por radioterapia ²⁵.

Atualmente, a imunoterapia vem sendo descrita como um tratamento alternativo ou de primeira linha para diversos tipos de câncer, como pulmão e melanoma por exemplo. Em alguns casos, essa terapia baseia-se no bloqueio dos “checkpoints imunológicos” através de anticorpos monoclonais afim de reativarem o sistema imunológico para uma defesa anti-tumoral ²⁶.

Em pacientes com câncer de mama triplo negativo há uma maior expressão da molécula PD-L1 (receptor da molécula PD-1 expressa nos linfócitos e considerada um checkpoint imunológico) nas células tumorais, além de uma maior quantidade de linfócitos TCD8+ infiltrados²⁷. Contudo, estudos apontam que infiltrados de TILs com maior frequência de linfócitos citotóxicos esteja associado a um melhor prognóstico em tumores com fenótipos mais agressivos ²⁸. A partir desses fatos, a imunoterapia no CMTN metastático foi aprovada no início de 2019 pelo Food and Drugs Administration (FDA) após o estudo IMpassion130 que comprovou que as pacientes que receberam o imunoterápico anti-PD-L1 (Atezolizumab) associado ao taxano (Nab-Paclitaxel) desenvolveram maior taxa de resposta patológica completa (pCR = 7,1%) comparadas às pacientes que receberam apenas Nab-Paclitaxel (pCR = 1,6%) ²⁹.

1.2 DEFESA ANTI-TUMORAL

Nos últimos anos, muito se tem discutido sobre a importância do sistema imunológico na evolução tumoral e na resposta efetiva dos pacientes aos tratamentos. Até pouco tempo, não se sabiam muitos detalhes sobre o mecanismo de ativação do sistema imunológico pelos antígenos expressos pelas células tumorais bem como o momento em que esse reconhecimento era feito e como isso influenciava no crescimento tumoral. A partir das descobertas nessa área, denominaram esse processo de imunoedição, que é constituído pelas seguintes fases: eliminação, equilíbrio e escape ³⁰ (Figura 1).



Fonte: Retirado de Tower et al.³³

Figura 1- Fases da imunoedição do câncer.

A eliminação foi provada a partir da análise do desenvolvimento tumoral em dois grupos de camundongos, sendo o primeiro grupo imunocomprometido e com depleção de células imunes inatas e adaptativas. Nesse primeiro grupo foi observado um maior crescimento tumoral com tumores mais imunogênicos quando comparado ao segundo grupo de camundongos que eram os controles ou imunocompetentes³². Dessa maneira, pode-se comprovar que o sistema imunológico é capaz de eliminar células tumorais em sua fase inicial principalmente pela ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ através de vias de ativação celular por IFN-g, além de outros tipos celulares³³.

Contudo, o processo de eliminação descrito acima pode ser diminuído e um equilíbrio é mantido entre o crescimento do tumor e a resposta anti-tumoral. Estudos mostraram que em camundongos com indução de fibrosarcomas era possível observar um período longo de

homeostase e que os linfócitos T CD4⁺ com perfil Th1 possuíam um importante papel nesse processo, além de citocinas produzidas por essas células como IL-12 e IFN- γ ^{34,35}. Além disso, sabe-se que em tumores que mantêm esse período de dormência existe maior quantidade de linfócitos T CD8⁺, células natural killer (NK), entre outras células citotóxicas, e menor número de células com perfil regulador como células NKT, células supressoras mieloides (MDSC) e linfócitos T reguladores (Treg), comprovando que existe um balanço entre uma defesa anti-tumoral e um ambiente mais imunossupressor³⁶.

Diferentes mecanismos levam as células tumorais a proliferarem e driblarem o sistema imunológico, levando a terceira fase da imunoedição, o escape. Dentre esses mecanismos podemos citar a redução do reconhecimento do tumor pelas células imunes devido a ausência de antígenos tumorais, perda da expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC-I) e também moléculas co-estimulatórias. Também é observado um aumento de moléculas antiapoptóticas como bcl2, e relacionadas com a resistência como STAT3 conferindo um aumento da sobrevivência celular. Além disso, ocorre a criação de um ambiente imunossupressor devido a alta expressão de moléculas imunoreguladoras como IDO, PD-1, PD-L1, TIM3, LAG3 e de citocinas como TGF- β , VEGF, IL-6, M-CSF que proporcionam a angiogênese. Células como MDSCs, macrófagos M2 e DCs também podem expressar moléculas como arginase, INOS e IDO, e secretar citocinas como IL-10 que inibem a proliferação de linfócitos T citotóxicos e induzem linfócitos T reguladores^{30,37}.

1.2.1 Perfil imunológico solúvel

O sistema imunológico é modulado por proteínas sinalizadoras denominadas citocinas e quimiocinas, que são produzidas por diversos tipos de células, principalmente as pertencentes ao sistema imunológico, como macrófagos, monócitos, linfócitos, entre outras. Essas proteínas se encontram diretamente relacionadas com ativação ou inibição do sistema imunológico, bem como proliferação ou sinalização de morte celular³⁸.

Existem padrões de produção de citocinas, sendo melhores descritos os perfis Th1 e Th2. O padrão Th1 de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-12, entre outras) possui ação na resposta anti-tumoral e assim ativa células que ajudam no combate ao tumor. Por outro lado, o padrão Th2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13, entre outras) está relacionado com defesa contra helmintos e resposta a alérgenos, além de poder promover a progressão tumoral. Existem também citocinas com padrão Th17, como a IL-17, que também são responsáveis por combater infecções extracelulares. Em contrapartida, existem citocinas com caráter anti-inflamatório como IL-10 e TGF- β que são produzidas principalmente por linfócitos Treg³⁹.

O tumor é capaz de guiar o sistema imunológico através da expressão de citocinas com caracteres imunossupressores como IL-6 e IL-10, ou com perfil pró angiogênico, como o VEGF, que ao induzirem o recrutamento celular e mudança fenotípica de células derivadas de monócitos criam um ambiente imunodeficiente prejudicando a defesas anti-tumoral ⁴⁰.

1.2.2 Microambiente tumoral

A composição do microambiente tumoral é de extrema importância para guiar a resposta anti-tumoral e levar ao desfecho clínico. Dessa forma, classificam-se os tumores de acordo com a sua composição. Aqueles que possuem um maior infiltrado tumoral de células imunes, principalmente linfócitos T CD8+ (citotóxico – CTL), são considerados tumores quentes e altamente imunogênicos. Enquanto os tumores que são deficientes desses componentes são chamadas de tumores frios e pouco imunogênicos ⁴¹.

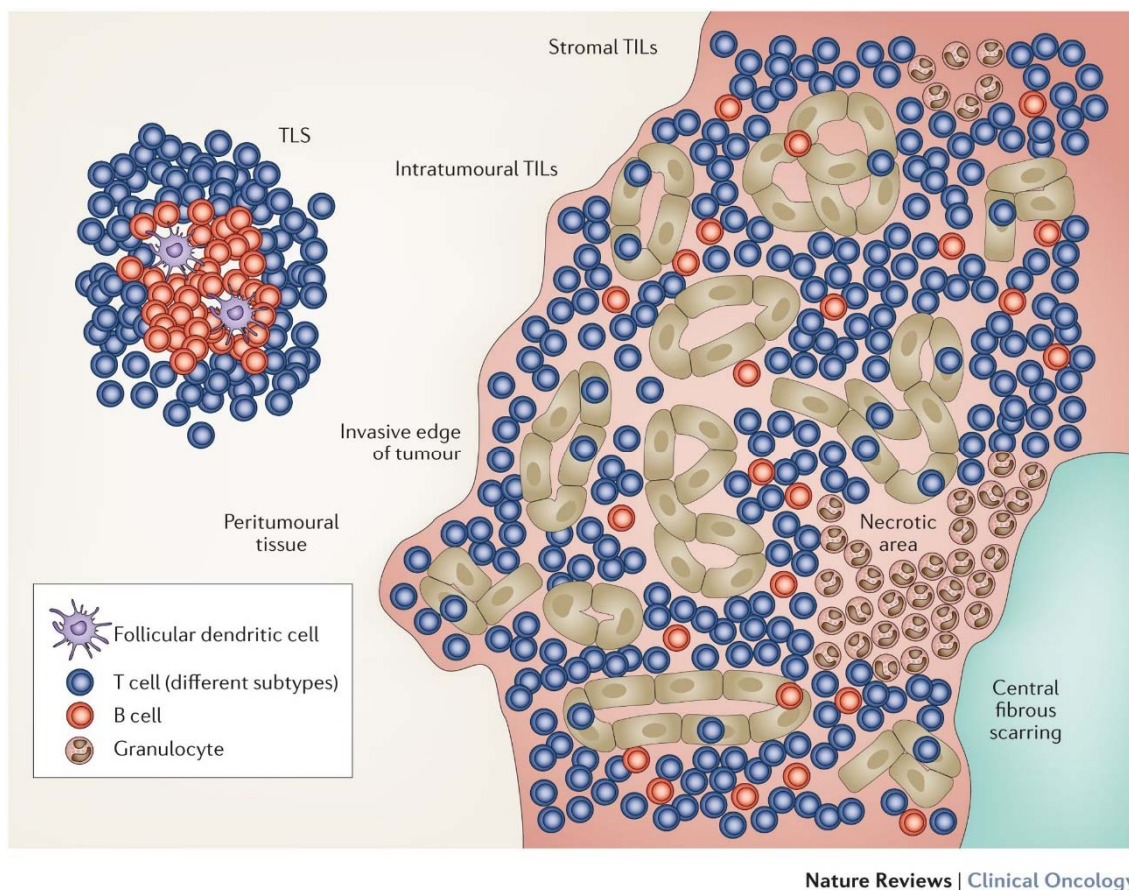
O câncer de mama não é considerado um tumor imunogênico como outros tumores que contém esse perfil imunológico, como melanoma e câncer de pulmão. Contudo, entre os subtipos de câncer de mama existe uma diferença entre a frequência de células imune observadas nos tumores, sendo os tumores HER2+ e CMTN considerados mais imunogênicos quando comparados aos luminais ⁴².

Como já mencionado, os linfócitos infiltrados nos tumores desempenham um papel importante no microambiente tumoral criando um ambiente inflamatório. Estudos mostraram que a taxa de pacientes com câncer de mama HER2+ e CMTN que possuem altos níveis de TILs (linfócitos infiltrantes do tumor) e atingiram resposta patológica completa ao tratamento era maior (50%) do que de pacientes com essas doenças que possuíam menores concentrações de TILs (31%) ⁴³. Também foi observado que o tempo de sobrevida livre de doença e o tempo de sobrevida global eram maiores em pacientes que possuíam um maior infiltrado de linfócitos no tumor ⁴⁴.

Dessa forma, a quantidade de linfócitos infiltrados nos tumores das pacientes com câncer de mama triplo negativo foi considerada fator preditivo de resposta à quimioterapia neoadjuvante, além de fator prognóstico ⁴⁵.

O tecido tumoral pode ser dividido em diferentes regiões. A região onde as células se encontram mais próximas entre si e os linfócitos fazem contato direto com as células do carcinoma é denominada de região intratumoral, enquanto a área estromal é aquela em que os linfócitos estão mais dispersos das células tumorais ⁴⁶. A região estromal é considerada mais heterogênea entre os tumores, apesar da sua correlação com a região intratumoral. Além disso

a quantidade de TILs nessa área vem sendo utilizada como fator prognóstico para resposta ao tratamento como já mencionado anteriormente ⁴⁷ (Figura 2).



Fonte: Retirado de Savas et al. ⁴⁸

Figura 2 - Linfócitos infiltrados na região estromal e intratumoral do tumor.

No câncer de mama ainda é pouco compreendido como as células do infiltrado inflamatório tumoral são capazes de criar um ambiente imunorregulador através da produção de citocinas. Recentemente, um estudo tentou estabelecer a correlação das citocinas com a quantidade do infiltrado tumoral presente em pacientes com câncer de mama para entender como essas proteínas podem influenciar na resposta anti-tumoral ⁴⁹.

Portanto, faz-se necessário entender como o infiltrado tumoral presente tanto no estroma quando na região intratumoral dos tumores de pacientes com câncer de mama triplo negativo relacionam com uma melhor resposta a quimioterapia neoadjuvante. Também é interessante compreender como as citocinas encontradas na circulação dessas pacientes podem fornecer informações sobre um perfil imunológico. Somado a isso, é essencial identificar se existe uma correlação dos níveis de TILs com as citocinas circulantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil imunológico das pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo no momento do diagnóstico afim de identificar possíveis biomarcadores para a resposta ao tratamento quimioterápico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar os níveis de citocinas e quimiocinas presentes no plasma destas pacientes antes do tratamento.
- 2 Determinar o nível do infiltrado tumoral linfocitário no estroma e no tumor destas pacientes no momento do diagnóstico.
- 3 Associar os perfis imunológicos intratumorais e sistêmicos, relacionando os níveis de citocinas e quimiocinas circulantes com o nível do infiltrado inflamatório e com a resposta ao tratamento.

3 METODOLOGIA

3.1 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.

Foram recrutadas pacientes diagnosticadas com tumor mamário triplo negativo e submetidas à quimioterapia neoadjuvante baseada em antraciclinas e taxanos no A.C.Camargo Cancer Center. Essas pacientes são acompanhadas pelo Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima, do departamento de Oncologia Clínica e pela Dra Fabiana Baroni Makdissi, do departamento de Mastologia.

Nesse estudo, tivemos o recrutamento de 73 pacientes, porém apenas 67 foram incluídas. Dentre essas pacientes, nosso trabalho contou com a análise de 39 pacientes nas quais foram medidas as concentrações de citocinas circulantes, e dentro desse grupo, foram avaliados os níveis de TILs de 37 pacientes. As 28 pacientes restantes possuem suas amostras armazenadas para análises posteriores (Figura 3).

Como critérios de inclusão tivemos:

- Pacientes que tenham sido submetidas à cirurgia na instituição A.C.Camargo Cancer Center com amostra de tecidos e amostras de sangue periférico armazenados no Biobanco da instituição;
- Pacientes que não tenham histórico de tratamento quimioterápico.

Foram excluídas do estudo:

- Pacientes que só tenham submetido à biópsia;
- Amostras que não possuíam células epiteliais;
- Pacientes com doença ou tratamento imunossupressor;
- Pacientes com tumor primário não-triplo negativo

A inclusão das pacientes neste trabalho foi condicionada à assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center, sob protocolo nº 1746/13H. (Anexo 1).

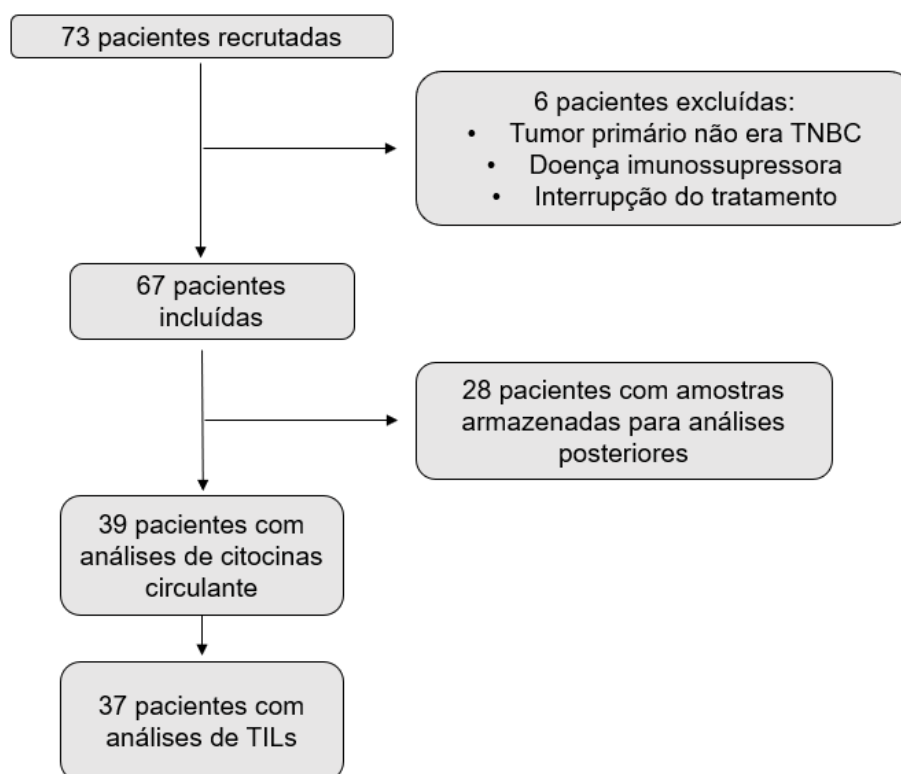


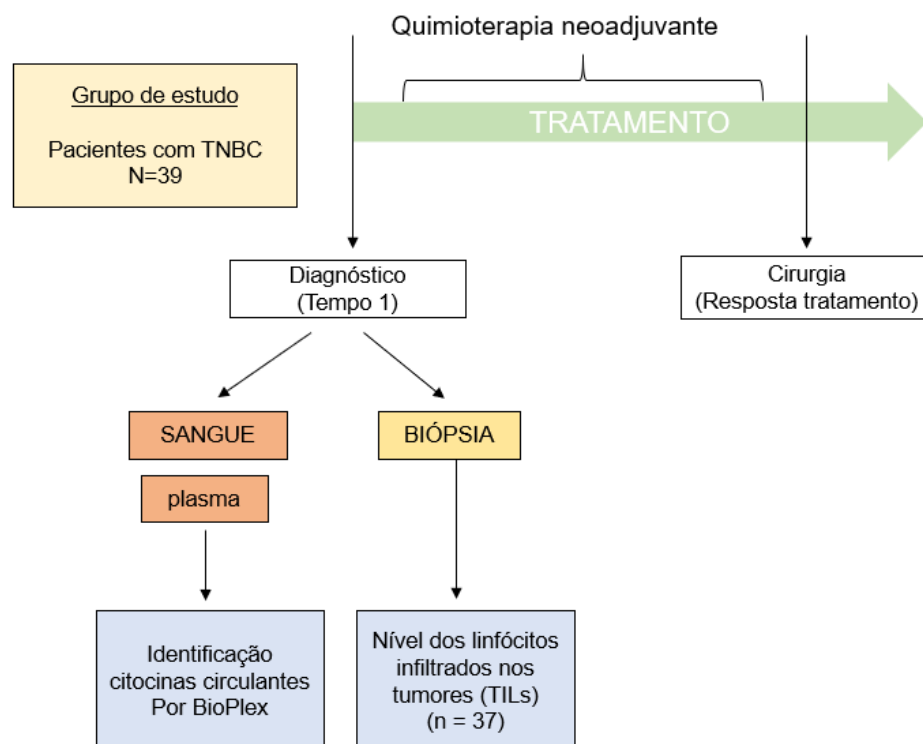
Figura 3 - Pacientes recrutadas e analisadas no estudo.

3.2 TRATAMENTO

Em nosso trabalho, as pacientes avaliadas foram submetidas à quimioterapia após o diagnóstico. Esse tratamento consistia, em sua maioria, na administração de blocos de fármacos como a ciclofosfamida e antraciclina em 4 ciclos, seguidos pela administração de até 12 ciclos de carboplatina e taxol. Os ciclos poderiam ser interrompidos de acordo com a avaliação da toxicidade gerada nas pacientes. A cirurgia para remoção do tumor era realizada após o tratamento com os fármacos.

3.3 COLETA DO PLASMA

As amostras de sangue periférico foram coletadas no momento de diagnóstico, antes do início do tratamento (tempo “1”) com o auxílio da enfermeira de pesquisa Carla Curi e do Dr Rafael Canfield Brianese (Figura 4). As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de EDTA 4 mL que foram centrifugadas no limite de duas horas após a coleta. A centrifugação para separação dos componentes do sangue foi realizada a 400 g por 5 min. Após a centrifugação, o plasma foi coletado e congelado à -80°C para análises posteriores.



Legenda: Delineamento experimental para as amostras coletadas no tempo 1, equivalente ao momento do diagnóstico das pacientes. O grupo de estudo foi composto por 39 pacientes que tiveram a avaliação a partir do sangue periférico onde foi separado o plasma para identificação de citocinas, quimiocinas e fatores solúveis através da técnica do BioPlex. Dentro deste grupo, biópsias de 37 paciente pré-tratamento foram avaliadas para a quantificação dos infiltrados de linfócitos no tumor nas regiões estromais e intratumorais através da coloração por hematoxilina e eosina (HE).

Figura 4 - Delineamento experimental do estudo.

3.4 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS SOLÚVEIS

A identificação e quantificação das citocinas solúveis presentes no plasma foram realizadas utilizando o sistema de suspensão Bio-Plex (BioRad), que permite a verificação de múltiplos analitos através de um conjunto de beads de cores distintas criadas por meio da mistura de dois corantes fluorescentes.

Esta tecnologia baseia-se na ligação de anticorpos a um conjunto de esferas (beads) de mesma cor, e essas beads se associam a analitos específicos. Seu método, similar ao ELISA, permite um ensaio em sanduíche, onde um segundo anticorpo é utilizado para quantificar o analito, funcionando como um anticorpo de detecção. Quando utilizadas beads de cores distintas, é possível a detecção simultânea de diversos analitos em uma única amostra.

De maneira mais específica, as esferas que estão acopladas ao anticorpo de captura foram incubadas com a amostra de interesse. Após lavagens para a remoção do material que não foi capturado, as amostras foram incubadas com o anticorpo de detecção biotinado. Após nova lavagem, amostras foram incubadas com um conjugado de streptavidina-ficoeritina (SA-PE). Após retirar o excesso de SA-PE, a leitura foi realizada no equipamento.

Para a realização da leitura na plataforma Bio-Plex, as beads foram alinhadas e excitadas individualmente. O laser vermelho permite a identificação das beads (analitos específicos) e o laser verde permite a quantificação de cada analito capturado. Os sinais fluorescentes gerados foram identificados e analisados com o auxílio do software xponente. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, utilizando o kit “Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex Panel” da BioRad, que permitiu quantificar as seguintes citocinas/ quimiocinas: FGF-basic, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17a, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-B, Rantes, TNF- α e VEGF.

3.5 ANÁLISE DO INFILTRADO TUMORAL

As análises do infiltrado linfocitário tumoral (do inglês, *tumor-infiltrating lymphocytes* - TILs) foram realizadas por dois médicos Patologistas (MDBA e CABTO) do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. As biópsias foram avaliadas antes do início do tratamento. Nestas amostras de tumor, a porcentagem dos TILs foi determinada nas seguintes regiões: a região do estroma tumoral (região onde os linfócitos encontram-se distribuídos entre as células tumorais, sem contato direto com as mesmas) e a região intratumoral (onde os linfócitos estão em contato direto com células tumorais). As duas categorias representam TILs verdadeiros, uma vez que ambas estão localizadas na região tumoral. As avaliações das biópsias foram realizadas através de cortes histológicos dos blocos de parafina com espessura entre 4-5 μ m, 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, ou aqueles em torno de carcinoma *in situ*, ou fora da borda do tumor invasivo. A determinação do nível dos TILs é avaliada em parâmetro contínuo e representada em porcentagem, indicando o nível de infiltrado na região avaliada ⁴⁶.

3.6 RESPOSTA AO TRATAMENTO

Para avaliar se as pacientes respondiam ou não à quimioterapia neoadjuvante, avaliamos o score feito pelos patologistas no momento da cirurgia que apontava se havia doença residual, “*residual cancer burden*” (RCB). As pacientes que possuem $RCB = 0$ foram consideradas pacientes com resposta patológica completa (pCR) e foram classificadas como respondedoras. Por outro lado, as pacientes que possuem $RCB > 0$ foram classificadas como não-respondedoras ao tratamento.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos *softwares* GraphPad Prism e SPSS, com a colaboração do estatístico Dr. Vinicius Calsavara.

As associações entre as variáveis qualitativas foram avaliadas através do teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para comparar os níveis de citocinas entre os grupos de pacientes respondedores e não respondedores foram realizados primeiramente os testes de normalidade Kolmogorov-smirnov (KS) e Shapiro Wilk para verificar a distribuição dos valores entre os grupos. Dessa maneira, para as análises que tiveram os valores de $p < 0,05$, os dados foram classificados como de distribuição normal. Posteriormente, foi utilizado o teste t de Student para dados com distribuição normal e o teste Mann-Whitney para dados sem distribuição normal.

Para a correlação dos níveis de citocinas com a quantidade de linfócitos tumorais infiltrados também foi realizado um teste de distribuição normal para posteriormente seguirmos com os testes de correlações. Como todos os dados não apresentaram distribuição normal, seguimos com a realização do teste de correlação de Spearman.

Na intenção de avaliar a relação das citocinas com o desfecho de interesse (pCR), foi realizada a regressão logística simples para determinar os valores de odds ratio (OR) no intervalo de confiança de 95%. Também foi realizada a regressão logística múltipla considerando as citocinas, os níveis de TILs e grau histológicos como valores independentes. O desempenho desse modelo em sua capacidade de discriminação dos eventos foi avaliado através das curvas de operação do receptor (ROC) e da estatística C, que representa a área sob a curva ROC (AUC).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA DAS PACIENTES

Como mencionado, esse trabalho contou com a avaliação do perfil imunológico de 39 pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo não metastático. Além disso, o recrutamento de 28 novas pacientes foi realizado e as amostras foram armazenadas para avaliações posteriores.

Todas as pacientes foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante seguida de mastectomia. Após a cirurgia, foi realizada a avaliação de resposta patológica separando as pacientes em dois grupos: respondedoras (resposta patológica completa – pCR), composto por 18 pacientes, e não-respondedoras (não resposta patológica completa – não-pCR), com 21 pacientes.

Foram realizadas as caracterizações demográficas e clínicas das pacientes. A idade mediana do grupo analisado foi de 41 anos, sem diferença entre os grupos de respondedores e não-respondedores. A população avaliada era em sua maioria composta por pacientes de cor branca (74%). A maioria das pacientes (72%) não se encontravam no estado da menopausa no momento do diagnóstico. Em relação às características clínicas avaliadas, incluindo tamanho do tumor, estágio do tamanho tumoral (T), estágio de comprometimento linfonodal (N) e grau histológico, pode-se observar que as pacientes com resposta patológica completa possuíam um estadiamento indicando tamanhos tumorais menores em relação às pacientes que não responderam ao tratamento. Avaliamos a presença de mutação germinativa no gene BRCA1 em nossas pacientes do estudo, mas esse fator não foi relacionado com resposta (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização clínica e demográfica das pacientes com CMTN.

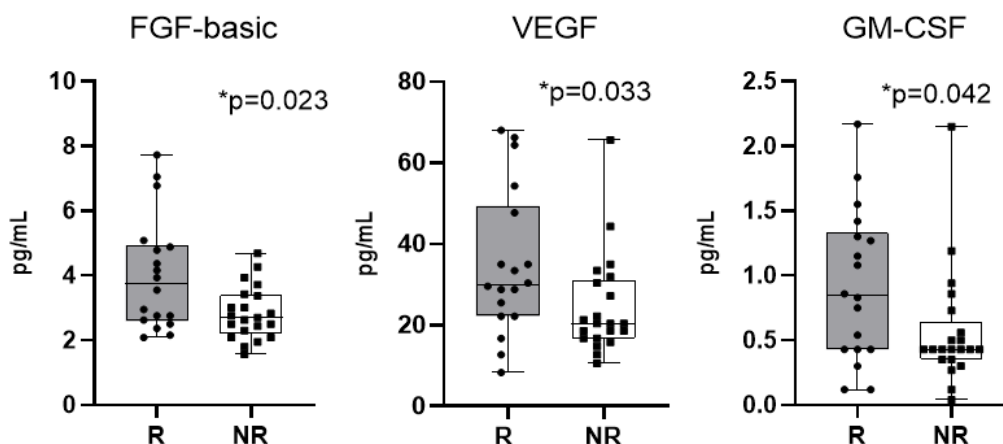
Características	Total (n=39)	pCR (n=18)	Não-pCR (n=21)	Valor p
Idade, mediana (min;max)				0.345
	41 (28;73)	44 (33;65)	39 (28;73)	
Raça				0.023*
Branca	30 (77%)	17 (94%)	13 (62%)	
Negra	9 (23%)	1 (6%)	8 (38%)	
Menopausa				0.762
Sim	11 (28%)	5 (28%)	6 (29%)	
Não	28 (72%)	13 (72%)	15 (71%)	
Tamanho tumoral (cm), mediana				0.543
	2.6 (0.6;18)	2.25 (1.3;18)	2.6 (0.6;5.7)	
Estadiamento T, n (%)				0.013*
T1	5 (13%)	4 (22%)	1 (5%)	
T2	22 (56%)	13 (72%)	9 (43%)	
T3	10 (26%)	1 (6%)	9 (43%)	
T4	2 (5%)	0 (0%)	2 (9%)	
Estadiamento N, n (%)				0.795
N0	16 (41%)	7 (39%)	9 (43%)	
N1	18 (46%)	9 (50%)	9 (43%)	
N2	4 (10%)	2 (11%)	2 (9%)	
N3	1 (3%)	0 (0%)	1 (5%)	
Grau histológico, n (%)				0.260
II	12 (31%)	4 (22%)	8 (38%)	
III	25 (64%)	12 (67%)	13 (62%)	
Não avaliável	2 (9%)	2 (11%)	0 (0%)	
Mutação BRCA1				0.999
Sim	5 (13%)	2 (11%)	3 (14%)	
não	34 (87%)	16 (89%)	18 (86%)	

Legenda: PCR= resposta patológica completa; Não-PCR= não resposta patológica completa. (*) indicando $p < 0,05$

4.2 ANÁLISE DAS CITOCINAS CIRCULANTES

A identificação das citocinas e quimocinas foi realizada através da tecnologia do Bio-plex/Luminex, como descrito anteriormente, utilizando o plasma de 39 pacientes.

Ao comparar os níveis de citocinas e quimiocinas circulantes entre os grupos de pacientes respondedoras (R) e não-respondedoras (NR), pudemos observar que fatores de crescimento celular e pró-angiogênicos, como FGF-basic ($p=0,023$), VEGF ($p=0,033$) e GM-CSF ($p=0,042$) estavam presentes em maiores concentrações no momento do diagnóstico em pacientes respondedoras (Figura 5).

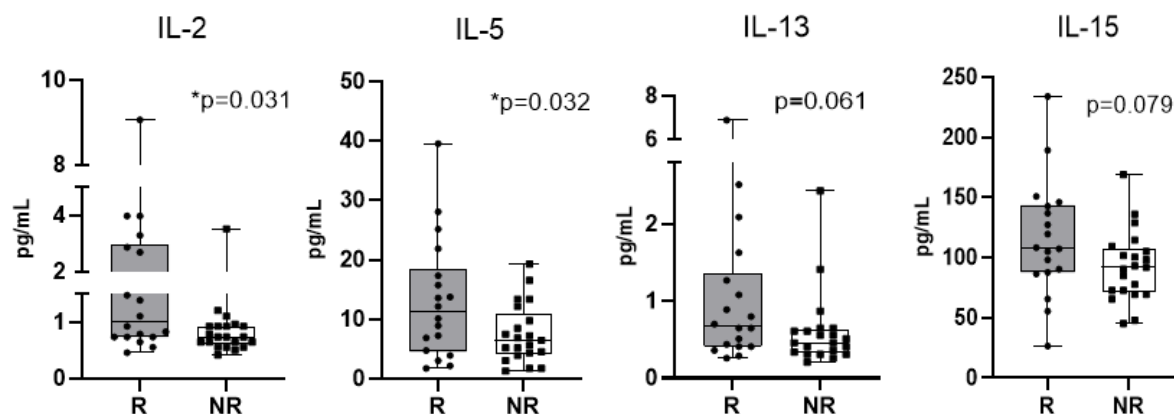


Legenda: Concentração das citocinas circulantes em pg/mL nos grupos de pacientes que responderam (R) (n=18) e pacientes que não responderam (NR) (n=21) ao tratamento através do ensaio Bioplex. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (*) indica $p < 0,05$.

Figura 5 - Concentração das citocinas FGF-basic, VEGF e GM-CSF no plasma de pacientes com CMTN.

Também foi observado que a citocina pró-inflamatória IL-2 ($p=0,031$) estava significativamente mais elevada no grupo de pacientes respondedoras assim como a IL-5 ($p=0,032$). Juntamente com a IL-5, a citocina IL-13 estão envolvidas na caracterização do fenótipo de linfócitos Th2. Essa molécula mostrou um aumento em seus níveis no grupo de respondedoras em relação às não-respondedoras, mas essa análise não foi estatisticamente significativa ($p=0,061$). Além disso, a citocina IL-15 envolvida na proliferação de células NK também se encontra em maiores concentrações em pacientes respondedoras, apesar do seu valor de $p < 0,05$ ($p=0,079$) (Figura 6).

Através desses resultados, é possível indicar que o perfil imunológico solúvel se relaciona com a resposta terapêutica através de maiores níveis de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento.



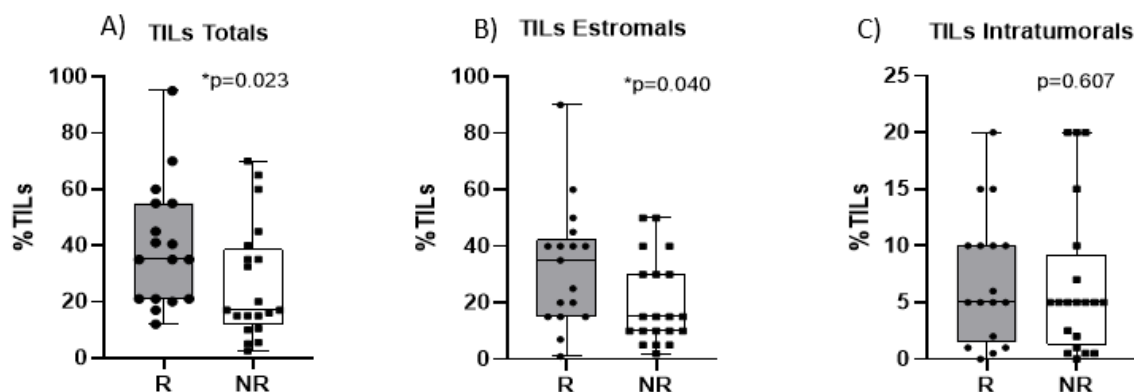
Legenda: Concentração das citocinas circulantes em pg/mL nos grupos de pacientes que responderam (R) (n=18) e pacientes que não responderam (NR) (n=21) ao tratamento através do ensaio Bioplex. As avaliações estatísticas foram realizadas através do teste de Mann-Whitney (IL-2 e IL-13) ou teste T de Student (IL-5 e IL-15) (*) indica $p < 0,05$.

Figura 6 – Concentração das citocinas IL-2, IL-5, IL-13 e IL-15 no plasma de pacientes com CMTN

4.3 AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS INFILTRADOS NO TUMOR

Os linfócitos infiltrados nos tumores foram avaliados pelas patologistas Dra Marina de Brot e Dra Cynthia Aparecida Bueno de Toledo Osorio, por meio da análise morfológica de biópsias coradas com hematoxilina e eosina. Foram avaliados os infiltrados de linfócitos nas regiões estromais e intratumorais, bem como na soma das duas regiões (a soma da região estromal e intratumoral) de 37 pacientes, sendo 17 respondedoras e 20 não-respondedoras.

A fim de entender o papel dos TILs na resposta ter o papel dos TILs na resposta terapêutica das pacientes que se submeteram ao tratamento neoadjuvante, comparamos os níveis de infiltrado na área total avaliada, e também em cada área tumoral separadamente. Observamos maiores níveis de TILs totais nas pacientes que responderam ao tratamento quando comparadas às não-respondedoras (Figura 7A) ($p=0,023$). O mesmo resultado foi observado em relação às porcentagens de TILs estromais ao comparar esses grupos de pacientes ($p=0,040$) (Figura 7B). Nenhuma diferença foi encontrada em relação à quantidade de TILs intratumorais ($p=0,607$) (Figura 7C).



Legenda: Frequência de linfócitos infiltrados nos tumores (TILs) em toda a região (Total) e também nas regiões estromal e intratumoral dos tumores de pacientes que responderam (R) (n=17) e não responderam (NR) (n=20) ao tratamento. As avaliações foram realizadas através da análise morfológica das biópsias em lâminas H&E obtidas antes do tratamento. As análises estatísticas foram realizadas através do teste Mann-Whitney. (*) indica $p < 0,05$.

Figura 7 - Porcentagem de TILs Totais, Estromais e Intratumorais em pacientes Respondedores e Não-Respondedores.

Deste modo, é possível indicar que a presença de linfócitos infiltrados nos tumores, principalmente na região estromal, esteja relacionado com uma melhor resposta à quimioterapia neoadjuvante.

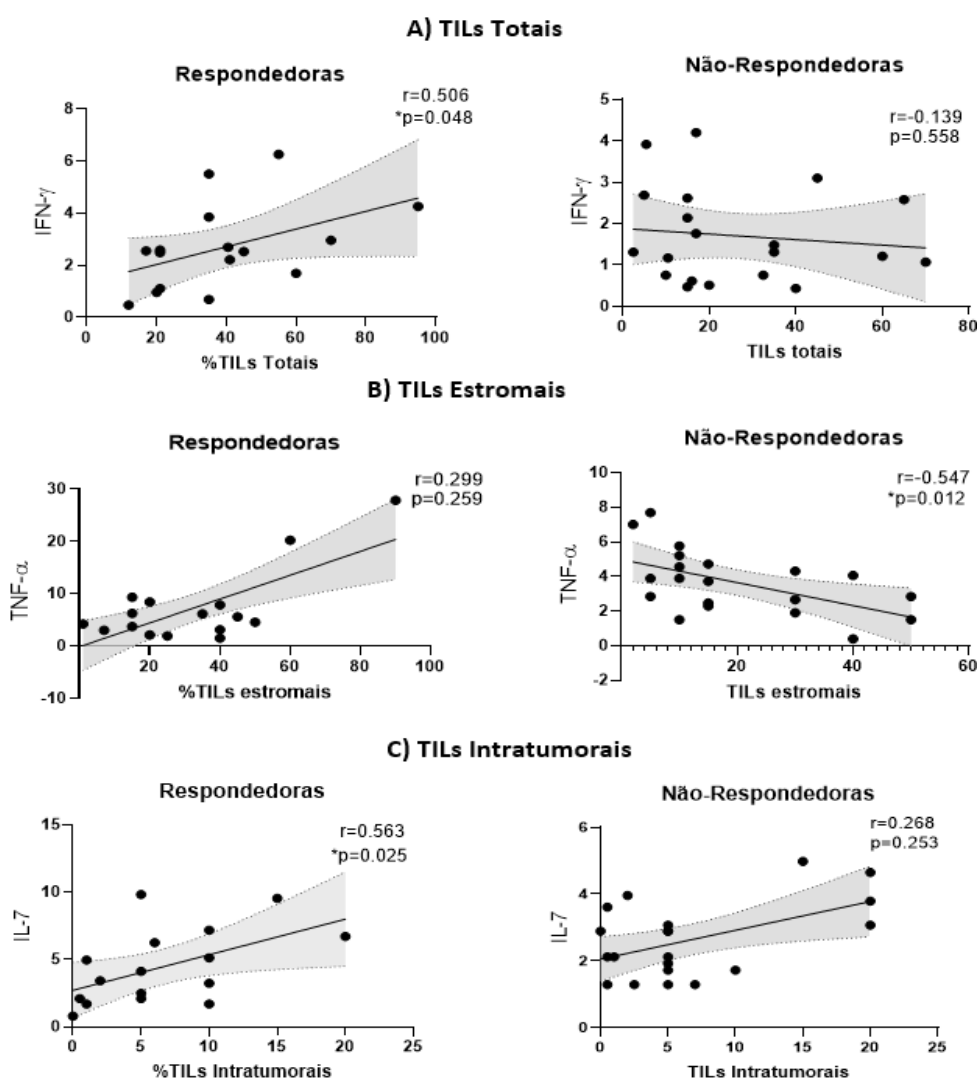
4.4 CORRELAÇÃO DE CITOCINAS CIRCULANTES COM TILS

Para entender se as citocinas circulantes podem influenciar ou refletir os níveis de linfócitos infiltrados nas regiões estromais e intratumorais, correlacionamos as concentrações de cada citocina identificada previamente com as porcentagens de TILs presentes no tumor.

Esses parâmetros foram correlacionados em 36 pacientes e dessas, 16 foram classificadas como respondedoras e 20 como não-respondedoras. Os dados não seguiram uma distribuição normal e, por essa razão, foi realizada a correlação de Spearman, onde o valor de r próximo a 1 indica maior força dessa correlação e os sinais de positivo ou negativo guiam para uma correlação positiva ou negativa, respectivamente. Somado a essas referências, o valor de $p < 0,05$ indica que a força da correlação é estatisticamente significativa.

Quando correlacionamos a porcentagem de TILs totais com a quantidade de cada uma das 27 citocinas das pacientes com CMTN foi possível identificar uma correlação positiva moderada entre os níveis da citocina IFN- γ com a porcentagem de TILs nas pacientes respondedoras, enquanto nas pacientes não-respondedoras essa correlação não foi observada ($r=0,506$ e $p=0,048$) (Figura 8A). Em relação aos níveis de TILs presentes na região estromal,

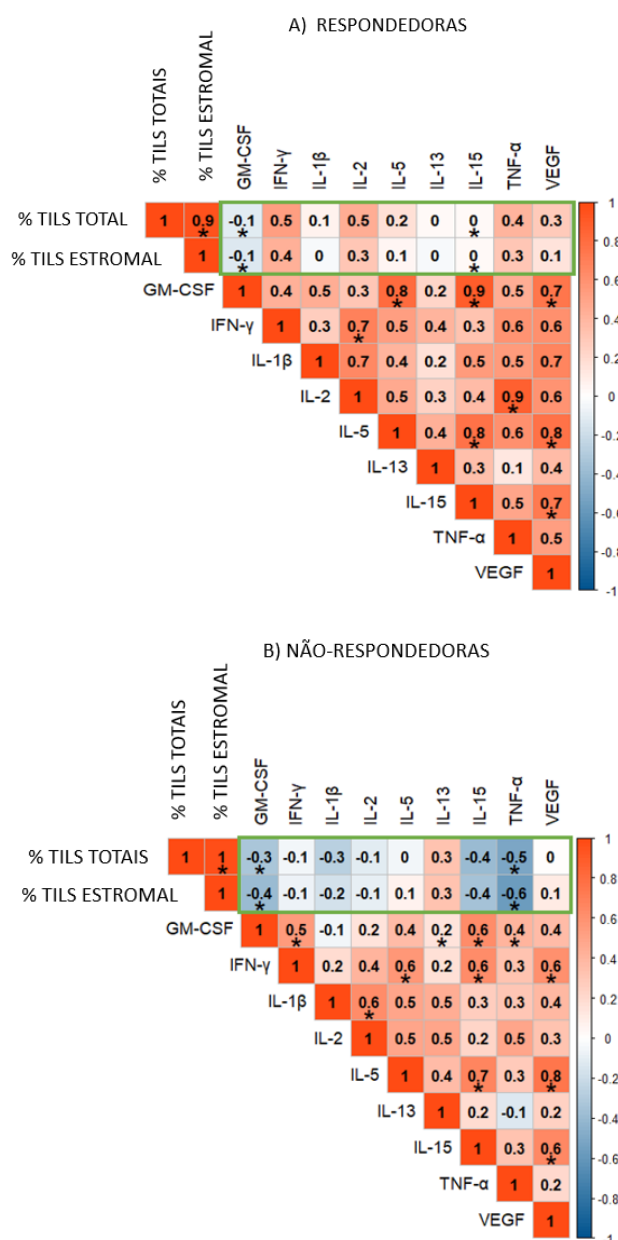
há uma correlação negativa moderada com a citocina TNF- α nas pacientes que não responderam ao tratamento ($r=0.547$ $p=0.012$) (figura 8B). Por fim, uma correlação positiva moderada é vista entre os níveis de TILs intratumorais e a citocina IL-7 nas pacientes com resposta positiva à quimioterapia neoadjuvante, mas não nas pacientes que não responderam ao tratamento ($r=0.563$ $p=0.025$) (Figura 8C). A correlação das 27 citocinas circulantes também foi realizada com o tamanho tumoral (cm) das pacientes do estudo, contudo nenhuma correlação foi observada.



Legenda: Correlação entre a porcentagem de TILs totais, estromais e intratumorais com as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-7 respectivamente, nos grupos de pacientes respondedoras ($n=16$) e não-respondedoras ($n=20$). As análises estatísticas foram realizadas através do teste de correlação de Spearman. (*) indica $p < 0,05$.

Figura 8 - Correlação de citocinas com TILs totais, estromais e intratumorais em pacientes CMTN.

Para melhor compreender como os TILs (totais e estromais) e as citocinas/quimiocinas inflamatórias se relacionam realizamos uma matriz de correlação nos grupos de pacientes. Nessa análise é evidente que em pacientes classificadas como respondedoras (Figura 9A) a correlação desses fatores se apresenta de maneira mais forte e positiva, enquanto no grupo de não-respondedoras as correlações não apresentam o mesmo comportamento (Figura 9B).



Legenda: (A) Matriz de correlação no grupo de pacientes respondedoras. (B) Matriz de correlação no grupo de pacientes não-respondedoras (*) indica $p < 0,05$.

Figura 9 - Matriz de correlação TILs totais e estromais com citocinas e quimiocinas inflamatórias.

Também foi realizada uma matriz de correlação entre as 27 citocinas e os TILs (totais, estromais e intratumorais) nos dois grupos de pacientes (Figura 10). Essa análise mostrou um comportamento semelhante a análise anterior (Figura 9).

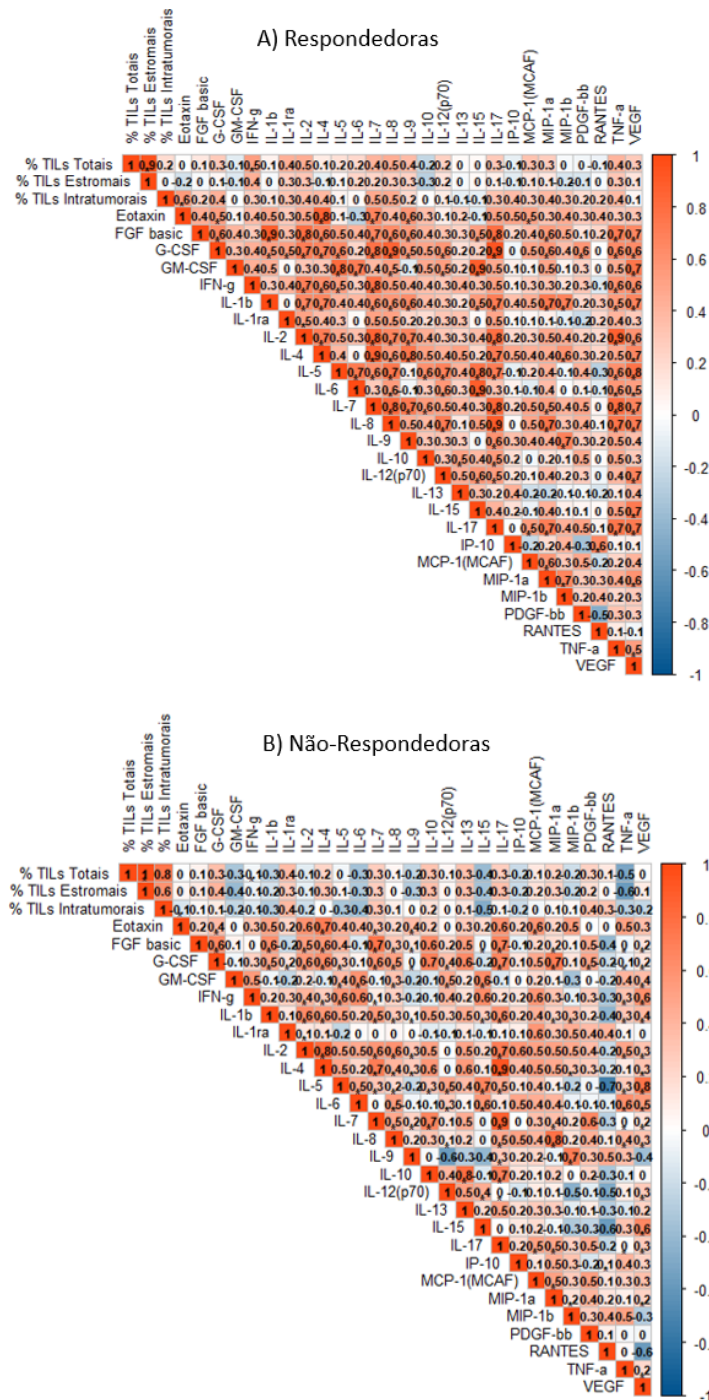


Figura 10 - Matriz de correlação entre TILs e citocinas/quimiocinas.

A partir desses resultados, percebemos que pacientes com sucesso terapêutico possuem maiores correlações entre citocinas, quimiocinas e TILs, refletindo uma resposta imunológica com perfil pró-inflamatório nesse grupo de pacientes. Por outro lado, as pacientes que não respondem ao tratamento possuem correlações mais fracas entre os fatores avaliados, indicando uma resposta imune mais fraca ou desregulada.

4.5 AVALIAÇÃO DO PODER DE PREDIÇÃO DE RESPOSTA DAS CITOCINAS DETECTADAS NO PLASMA

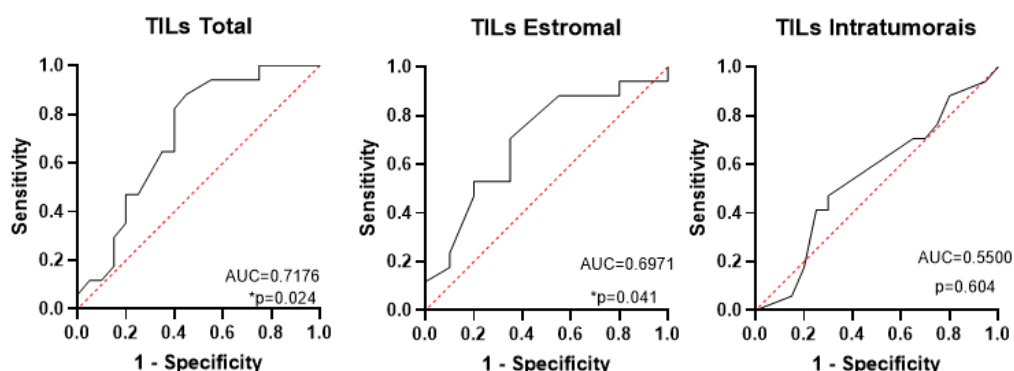
Já é estabelecido que a presença de altos níveis de TILs em pacientes com CMTN se relaciona com melhor sucesso terapêutico. Com o objetivo de aumentar o poder de predição de resposta por esse fator e também permitir uma avaliação menos invasiva, nosso próximo passo foi avaliar como as citocinas detectadas no plasma poderiam funcionar como biomarcadores preditores de desfecho clínico de maneira isolada, ou somada à presença de TILs.

Primeiramente avaliamos por regressão logística univariada como os TILs total, estromal e intratumoral poderiam indiciar a chance de um melhor desfecho clínico. Foi possível observar que os níveis de TILs na região estromal são capazes predizerem um desfecho clínico nessas pacientes de maneira significativa (Tabela 2). Contudo, as curvas ROC referentes à essas análises nos mostram que os nossos valores não possuem uma boa performance na capacidade discriminativa da especificidade e sensibilidade desses fatores (Figura 11)

Tabela 2 - Análise univariada dos níveis de TILs nas regiões do tumor.

Análise univariada - níveis de TILs (%)			
	OR	95%CI	p
TILs Total	1.03	0.99 até 1.07	NS
TILs Estromal	1.04	1.00 até 1.09	.035
TILs Intratumoral	1.01	0.91 até 1.12	NS

Legenda: OR= odds ratio; 95%CI = intervalo de confiança; NS= não significativo (p<0.05).



Legenda: área sobre a curva (AUC) foi calculada através da regressão logística univariada dos valores de TILs total, estromal e intratumoral (* $p < 0.05$).

Figura 11- Curva ROC dos TILs

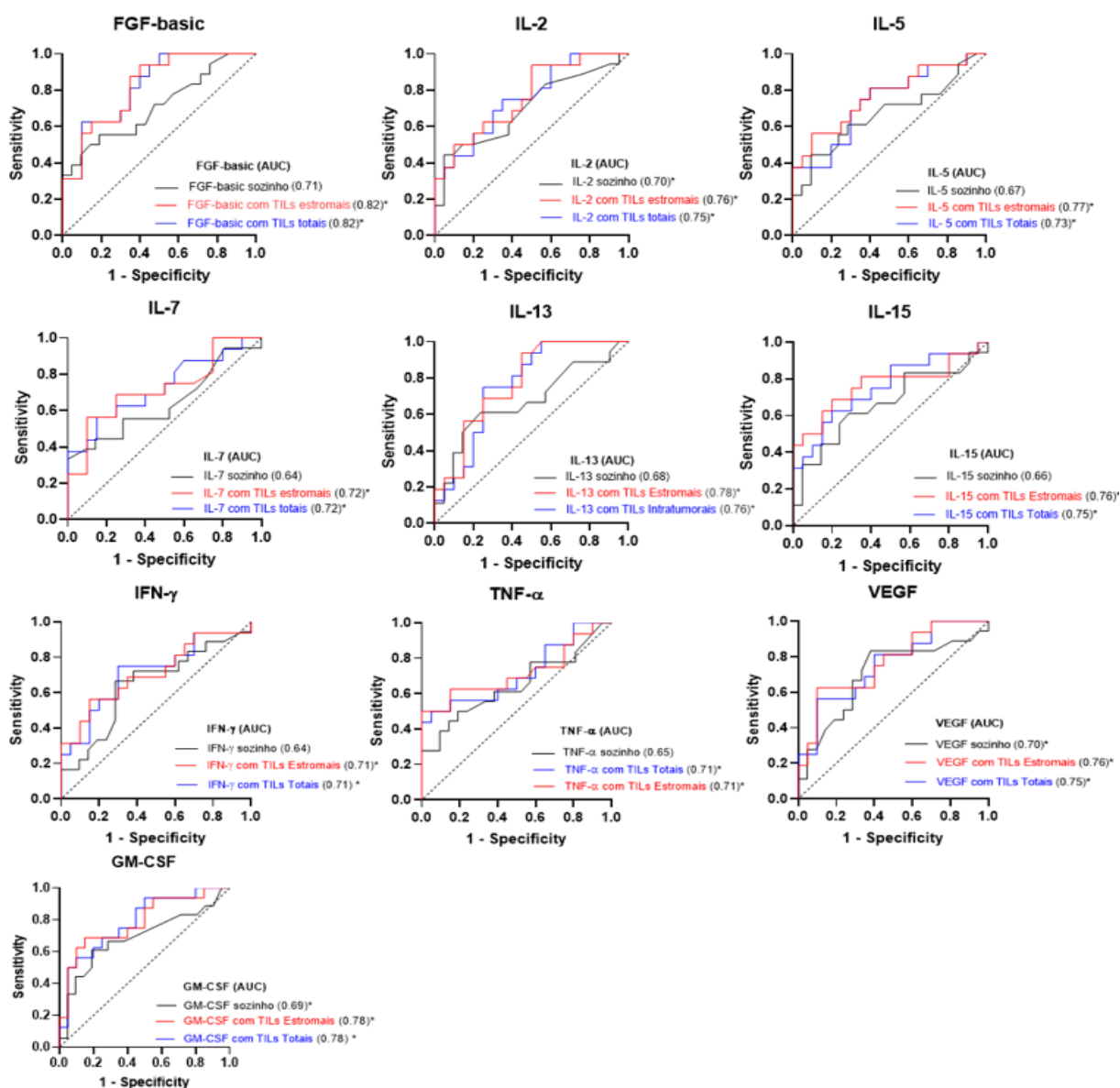
A partir desses resultados, avaliamos por regressão logística multivariada como os TILs poderiam aumentar o poder das citocinas em prever um desfecho clínico. Foi possível observar que não só na análise das citocinas somada aos TILs totais como também na análise somada aos TILs estromais, há um aumento do poder de predição de uma resposta terapêutica quando comparados à avaliação de citocinas isoladas (Tabela 3). Na avaliação multivariada, todas as análises foram significativas ($p < 0,05$). Também foram avaliadas as citocinas em combinação com TIL intratumorais, porém os resultados não foram significativos.

Tabela 3 - Análise univariada e multivariada das citocinas com TILs.

CITOCINA	ANÁLISE MULTIVARIADA								
	ANÁLISE UNIVARIADA			TILs Total			TILs Estromal		
	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>	OR	95% CI	<i>p</i>
FGF-b	2.16	1.22 até 4.63	.006	2.22	1.20 até 5.00	.027	2.24	1.20 até 5.04	.025
IL-5	1.11	1.01 até 1.25	.024	1.15	1.02 até 1.33	.037	1.14	1.02 até 1.33	.039
GM-CSF	4.02	1.10 até 20.00	.035	6.73	1.53 até 47.66	.026	7.07	1.58 até 52.9	.025
TNF-α	1.26	1.02 até 1.76	.027	1.38	1.02 até 2.06	.021	1.41	1.03 até 2.12	.067
IL-2	2.38	1.17 até 7.47	.009	2.50	1.14 até 8.53	.059	2.57	1.13 até 8.76	.060
IL-7	1.44	1.03 até 2.20	.031	1.54	1.02 até 2.65	.068	1.52	1.03 até 2.53	.060
VEGF	1.05	1.00 até 1.11	.035	1.06	1.01 até 1.13	.078	1.06	1.00 até 1.13	.053
IFN-γ	1.61	1.00 até 2.86	.048	1.59	0.94 até 2.99	NS	1.55	0.91 até 2.91	NS
IL-15	1.02	1.00 até 1.04	.068	1.02	1.00 até 1.05	.057	1.02	1.00 até 1.05	.061
IL-13	2.50	1.00 até 11.13	NS	2.55	0.95 até 13.9	NS	2.43	0.95 até 13.6	NS

Legenda: OR= odds ratio, 95% CI= Intervalo de confiança 95%, NS= não significativo ($p < 0.05$).

Ao realizarmos a regressão logística univariada das citocinas, notamos que as moléculas FGF-basic, IL-2, IL-5, IL-7, TNF- α , VEGF, IFN- γ e GM-CSF são capazes de prever uma resposta terapêutica efetiva, uma vez que os valores de OR dessas moléculas indicam uma maior chance de sucesso terapêutico em nosso grupo de estudo ($p>0,05$) (Tabela 3). Ao avaliarmos o desempenho da curva ROC para as citocinas nas análises univariadas e multivariadas, notamos um impacto positivo dos TILs totais e estromais (Figura 12).



Legenda: A área sobre a curva (AUC) foi calculada para cada citocina (linha preta) (análise univariada), em combinação com TILs na região estromal (linha vermelha) e em combinação com TILs total (linha azul) (análises multivariadas). (*) indica $p<0,05$.

Figura 12 - Curva ROC

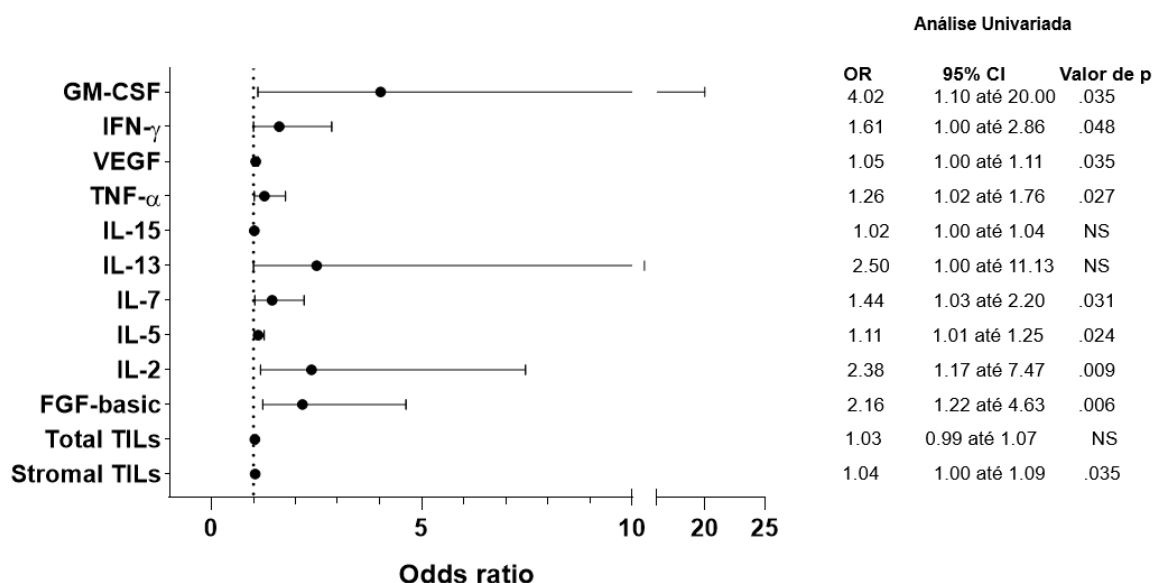
Também avaliamos como as citocinas em combinação com a classificação histológica poderiam prever a resposta patológica completa através da análise multivariada; as análises de TILs em combinação com o grau histológico também foram realizadas. Em relação a classificação histológica, os graus utilizados foram os graus II e III por serem os presentes em nosso grupo de estudo. As avaliações de TILs correspondiam aquelas da região estromal e total do tumor. A partir dessa análise foi possível notar que algumas citocinas perdiam o poder em prever o desfecho clínico na avaliação combinada com o grau histológico, enquanto outras como o GM-CSF tinham o seu poder aumentado. O mesmo resultado foi observado quando os TILs foram adicionados à análise (Tabela 4). Essa mesma análise foi realizada considerando o estadiamento T para avaliar um aumento do poder de predição de resposta das citocinas ou TILs, mas essa análise não mostrou poder significativo.

Tabela 4 - Análise univariada e multivariada das citocinas com TIL ou Grau Histológico

CITOCINA	Análise Univariada			Grau Histológico			Análise Multivariada			Grau Histológico e TILs			Grau Histológico e TILs Estromal		
	OR	95% CI	p	OR	95%CI	p	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p	OR	95%CI	p
FGF-b	2.16	1.22 até 4.63	.006	2.32	1.30 até 5.07	.013	2.35	1.27 até 5.31	.016	2.35	1.26 até 5.28	.017			
IL-5	1.11	1.01 até 1.25	.024	1.15	1.04 até 1.32	.022	1.16	1.07 até 1.36	.024	1.16	1.03 até 1.35	.027			
GM-CSF	4.02	1.10 até 20.00	.035	6.23	1.51 até 37.44	.022	8.51	1.80 até 12.51	.017	8.32	1.78 até 65.73	.017			
VEGF	1.05	1.00 até 1.11	.035	1.05	1.00 até 1.11	.064	1.06	1.01 até 1.14	.036	1.06	1.01 até 1.14	.043			
IL-2	2.38	1.17 até 7.47	.009	2.37	1.10 até 7.48	.059	2.48	1.08 até 8.56	NS	2.50	1.08 até 8.77	.064			
IL-7	1.44	1.03 até 2.20	.031	1.44	1.02 até 2.24	.062	1.55	1.02 até 2.65	.065	1.51	1.02 até 2.57	.065			
TNF-α	1.26	1.02 até 1.76	.027	1.24	1.00 até 1.74	NS	1.38	1.00 até 2.06	.082	1.40	1.01 até 2.11	.069			
IFN-γ	1.61	1.00 até 2.86	.048	1.53	0.95 até 2.71	NS	1.56	0.92 até 2.92	NS	1.52	0.90 até 2.85	NS			
IL-15	1.02	1.00 até 1.04	NS	1.02	1.00 até 1.04	.077	1.02	1.00 até 1.05	.055	1.02	1.00 até 1.05	.059			
IL-13	2.50	1.00 até 11.13	NS	2.90	1.05 até 13.95	NS	2.75	0.98 até 14.89	NS	2.59	0.97 até 14.49	NS			

Legenda: OR= odds ratio, 95% CI= Intervalo de confiança 95%, NS= não significativo (p<0.05).

Após as análises apresentadas, podemos indicar que as citocinas quando avaliadas individualmente possuem o poder de prever um desfecho clínico favorável, assim como os níveis de TILs na região estromal do tumor (Figura 13). Contudo, é importante ressaltar que ao analisar as citocinas em combinação com os TILs, o poder de predição para a resposta patológica completa se tornou maior.

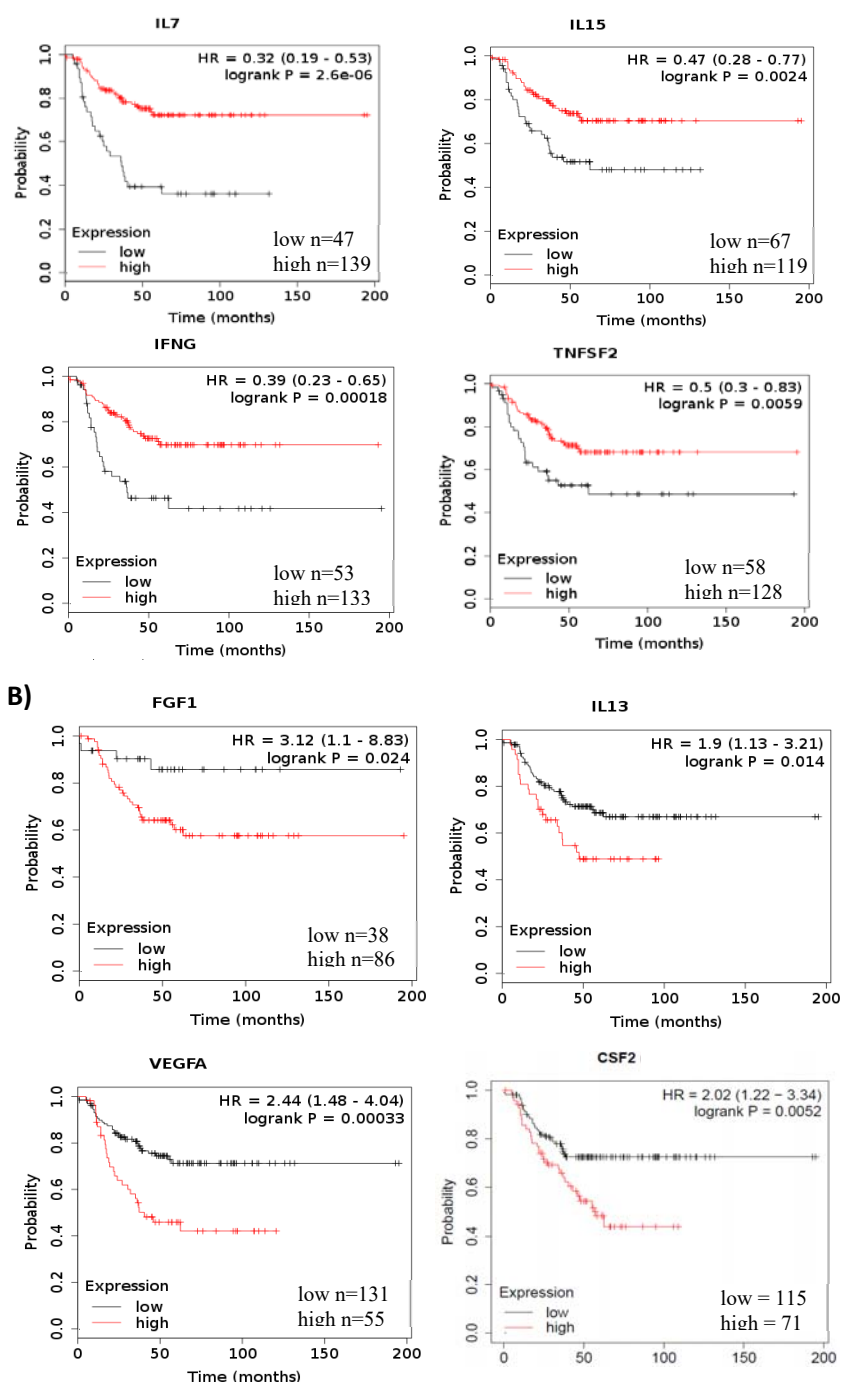


Legenda: A análise utilizou um modelo de regressão logística para estimar a probabilidade de obter uma resposta patológica completa de acordo com a concentração plasmática das citocinas GM-CSF, IFN- γ , VEGF, TNF- α , IL-15, IL-13, IL-7, IL-5, IL-2, FGF-basic e dos TILs total e estromal. Odds Ratio (ORs); Intervalos de confiança de 95% (IC 95%). (* $p > 0.05$).

Figura 13 - Forest Plot representando a razão da probabilidade de obter uma resposta patológica completa de acordo com os níveis plasmáticos das citocinas.

4.6 ANÁLISES *IN SILICO*

Com o objetivo de comprovação dos nossos dados experimentais que apontam algumas citocinas como preditoras de melhor prognóstico, analisamos o banco de dados do TCGA que nos forneceu informações a partir de dados de transcriptoma do microambiente tumoral. Dessa maneira, foram utilizadas as análises de expressão gênica das moléculas de interesse em pacientes com CMTN e pode-se observar que pacientes com altas expressões de IL-7, IL-15, TNF- α e IFN- γ atingiram maior tempo de sobrevida livre de recorrência (relapse free-survival – RFS), comparadas ao grupo de pacientes que tinham baixas expressões gênicas dessas citocinas (Figura 14A). Por outro lado, pacientes com maior expressão de VEGF, IL-13, FGF-basic e GM-CSF (CSF2) apresentaram menor RFS (Figura 14B).



Legenda: Análises realizadas através do banco de dados do TCGA. A expressão gênica das citocinas foi determinada através do transcriptoma do microambiente tumoral de pacientes com CMTN e foram classificadas em baixas (low) e altas (high) no número de pacientes (n) distinto para citocina. (A) A expressão gênica das citocinas IL-7, IL-15, TNF- α (TNFSF2) e IFN- γ foram realizadas. (B) A expressão gênica das citocinas FGF-basic (FGF-1), IL-13, VEGF (VEGFA) e GM-CSF (CSF2) foram realizadas. $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 14 - Estimado de Kaplan-Meier. Expressão de citocinas relacionadas com sobrevida livre de recorrência (relapse free-survival) em pacientes com CMTN.

Pudemos notar que as citocinas IL-7, IL-15, TNF- α e IFN- γ seguem associadas à um melhor prognóstico em pacientes com CMTN nas análises *in silico* por estarem mais expressas em pacientes com maior sobrevida livre de recorrência. Por outro lado, as citocinas FGF-basic, IL-13, VEGF e GM-CSF são encontradas com maior expressão em pacientes com menor sobrevida livre de recorrência nas análises *in silico*.

5 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho avaliamos citocinas e quimiocinas circulantes em pacientes com CMTN no momento do diagnóstico afim de identificar biomarcadores preditores de resposta ao tratamento neoadjuvante. Também avaliamos os níveis de TILs e suas relações com as citocinas. A partir de nossas análises, conseguimos apontar correlações entre as citocinas e o aumento dos linfócitos infiltrados nos tumores no grupo de pacientes respondedoras, indicando um perfil imunológico pró-inflamatório nessas pacientes.

É sabido que as citocinas e as quimiocinas são moléculas essenciais para a ativação ou inibição da resposta imunológica sistêmica e no microambiente tumoral ⁵⁰. As células tumorais também são capazes de produzir essas moléculas modulando o sistema imunológico para um ambiente imunossupressor favorável ao crescimento tumoral ⁵¹. Por essa razão, as citocinas presentes no plasma de pacientes com CMTN poderiam funcionar como marcadores do perfil de ativação do sistema imune e predictoras de resposta ao tratamento e desfecho clínico.

Nossos resultados mostram que pacientes respondedores possuíam maiores concentrações plasmáticas de fatores de crescimento e moléculas associadas com formação vascular como GM-CSF, FGF-basic e VEGF. Utilizando regressão logística, também conseguimos mostrar que o aumento dessas moléculas em pacientes com CMTN poderiam indicar uma resposta patológica completa de maneira individual, ou quando analisadas em conjunto com maiores níveis de TILs.

Por outro lado, nossas análises *in sílico* mostraram um resultado contraditório em relação à expressão gênica de FGF-basic e VEGF que se encontravam maiores em pacientes com menor sobrevida livre de recorrência. É importante ressaltar que essas análises foram realizadas através de dados do transcriptoma onde as expressões gênicas dessas citocinas foram avaliadas no tecido tumoral e desfecho avaliado foi o tempo livre de recorrência, enquanto nosso ensaio avaliou os níveis de citocinas relacionados com resposta terapêutica. O aumento da expressão de FGF-basic por células tumorais foi observado em um estudo em pacientes com câncer de mama, relacionando com a maior diferenciação de osteoclastos e contribuição para formação de metástase óssea ⁵².

O VEGF é uma molécula responsável pelo crescimento de vasos e por consequência, é um fator pró angiogênico associado com a invasão tumoral e formação de metástase ^{53,54}. No panorama do câncer de mama, Linderholm et al. (2009) notou que os níveis intratumorais dessa

citocina eram maiores no subtipo CMTN ao analisarem a sua concentração em outros subtipos de câncer mamário. Em outro trabalho, onde avaliaram as citocinas presentes nos fluidos intersticiais de tumores mamários comparados com amostras derivadas de doadores saudáveis, notaram que o VEGF estava mais presente nas pacientes, assim como IL-7, IL-10, FGF-2, IL-13, IFN- γ , IP-10, IL-1RA, PDGF- β , RANTES e IL-12, além disso, uma maior expressão de VEGF se relacionou com TILs ⁴⁹. É importante ressaltar que esses estudos avaliaram os níveis de citocinas em cultura celular ou no microambiente tumoral e também associaram com os subtipos de carcinoma mamário, enquanto nós analisamos os níveis solúveis dessas moléculas e suas correlações com a resposta terapêutica.

Em nossos resultados, notamos que em pacientes com resposta patológica completa há maior concentração da citocina IL-2 comparado às pacientes não respondedoras. Além disso, observamos que há um aumento de correlações de citocinas pró-inflamatórias entre si em pacientes respondedores bem como uma maior correlação de IL-7 e IFN- γ com os níveis de TILs no mesmo grupo de pacientes.

A IL-2 é uma citocina produzida pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e é a principal citocina responsável pela ativação, maturação e proliferação de linfócitos, bem como ativação de células dendríticas e estimulação da apresentação de antígenos ^{50,56}. No trabalho de Egelston et al. (2018) ao investigarem os linfócitos T CD8⁺ nos TILs de pacientes com câncer de mama, identificaram que apesar da maioria dessas células possuírem um fenótipo de memória efetora, a capacidade de produção das citocinas IL-2 e IFN- γ se mantinha. Um estudo realizado no Japão avaliou a expressão de citocinas em pacientes com câncer de mama utilizando a mesma metodologia do nosso estudo e observaram que o aumento das citocinas IL-2 e IL-1 β estavam associados ao aumento dos TILs, bem como a baixa concentração de eotaxina ⁵⁸.

A citocina IL-7 tem como principal função estimular a proliferação de linfócitos, especialmente de memória, além de atuar na defesa anti-tumoral sinergicamente ao IFN- γ em alguns tipos tumorais e aumentar a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α por monócitos ⁵⁹. Por outro lado, alguns estudos apontam uma possível ação da IL-7 na proliferação de células tumorais de mama. Boesch et al. (2018) mostrou que fibroblastos presentes no microambiente tumoral de modelos murinos de câncer de mama expressavam maiores níveis de IL-7 capazes de induzir o crescimento de células tumorais. Similarmente, outro estudo utilizando cultura de células mamárias triplo negativas indicou que a IL-7 era capaz de induzir o crescimento dessas células em meio de cultura ⁶¹.

O IFN- γ é uma importante citocina na defesa anti-tumoral por atuar na estimulação da resposta imunológica e promover o reconhecimento do tumor e sua eliminação. Essa citocina é

produzida principalmente pelos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$, células NK e APCs, além de sofrer influência de outras citocinas como IL-12 e IL-15 que auxiliam na inibição do crescimento tumoral ⁶².

Além dessas citocinas, notamos que o TNF- α se correlacionava negativamente com os TILs estromais em pacientes não-respondedores. Sabemos que o TNF- α possui atividade anti-tumoral por vários mecanismos. Entre eles podemos citar a indução da apoptose celular através da ligação ao seu receptor nas células tumorais, ativação de macrófagos e células NK, recrutamento e estimulação de neutrófilos e monócitos para o microambiente tumoral, além do bloqueio células T regs com função imunossupressora ⁶³. Entretanto, o TNF- α também pode estimular a produção de quimiocinas como CXCL12 e CCL8 auxiliando na proliferação tumoral e aumento da invasão celular ⁶⁴.

Também observamos que a citocinas IL-15 estava presente em maior quantidade em pacientes que responderam ao tratamento, quando comparada ao grupo de não respondedoras. Além disso, em nossa análise *in silico* observamos que a maior expressão gênica da IL-15 estava presente no grupo com maior sobrevida livre de recorrência. A citocina IL-15 é responsável pela ativação e proliferação de células NK que possuem uma função citotóxica e anti-tumoral. No desenvolvimento do tumor, é observado que ocorre uma diminuição dessa molécula e consequentemente uma redução do número de células NK ⁶⁵. Em modelos murinos de câncer de mama, foi visto que o aumento de IL-15 está relacionada com uma destruição tumoral e redução de metástases por mecanismo dependentes de células NK ⁶⁶.

Citocinas relacionadas ao perfil de resposta Th2 como a IL-5 e IL-13 também foram identificadas em maiores concentrações nas pacientes que alcançaram a resposta terapêutica. Existem trabalhos na literatura que indicam que altos níveis de moléculas do padrão Th2 estejam associadas com pior prognóstico em pacientes com câncer de mama ^{49,67}. Por outro lado, acreditamos que em nosso estudo, a presença aumentada de moléculas características do perfil Th2 nas pacientes respondedoras possam atuar como um contrabalanço para uma resposta inflamatória, uma vez que mediadores inflamatórios são relacionados com progressão tumoral e desenvolvimento de metástase em alguns tumores sólidos ^{51,68,69}.

Em relação aos TILs, é sabido que a sua presença é de extrema importância para a criação de um ambiente anti-tumoral ⁷⁰. Nos pacientes com CMTN, altos níveis do infiltrado vem sendo considerado um fator prognóstico favorável para resposta à quimioterapia neoadjuvante ^{43,71,72}.

Em nosso estudo, observamos altos níveis de TILs total e estromal nas pacientes respondedoras em comparação às não-respondedoras. Também observamos a correlação

positiva desses fatores com citocinas inflamatórias como IFN- γ e IL-7, além do aumento do poder de predizer resposta quando avaliadas em conjunto com os TILs (total ou estromal).

Acreditamos que se faz necessária a inclusão de mais pacientes afim de aumentar o poder de discriminação dos nossos resultados, bem como melhor compreender o mecanismo de resposta anti-tumoral. Contudo, o perfil imunológico solúvel de pacientes com CMTN ainda é pouco estabelecido na literatura e até o momento, estudos sobre o microambiente tumoral nos apontam que pacientes com maiores níveis de TILs possuem melhor prognóstico, e assim essa característica vem sendo considerado um biomarcador de resposta para esse subtipo de carcinoma mamário. Portanto, faz-se necessário estudos que caracterizem a resposta imunológica sistêmica e sua relação com o sucesso terapêutico, além da identificação novos biomarcadores menos invasivos.

Acreditamos que os resultados encontrados no nosso trabalho somado com os dados apresentados da literatura são de extrema importância para melhor compreensão do perfil imunológico e sua relação com a resposta à quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama triplo negativo.

6 CONCLUSÃO

Concluindo, nosso estudo demonstrou que as citocinas circulantes com caráter pró-inflamatório, especialmente IL-2, GM-CSF, IL-5, IL-13, IL-15 estão associadas com a pCR em pacientes com CMTN tratados com quimioterapia neoadjuvante. Também observamos a capacidade da predição de resposta dessas citocinas, além das moléculas IL-7, IFN- γ e TNF- α e um aumento desses valores quando avaliadas em conjunto com os TILs. Dessa forma, acreditamos que a avaliação de citocinas circulantes pré-tratamento possa atuar como biomarcadores para predizer um desfecho clínico positivo.

7 REFERÊNCIAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
2. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017; 26:444–57.
3. 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.
4. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5(1):5–23.
5. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008;26(15):2568–81.
6. Tan DSP, Marchió C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111(1):27–44.
7. 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. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736–47.
8. 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. *J Clin Oncol*. 2018;36(20):2105–22.
9. 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.
10. 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;34(5):1178–95.
11. Blier L, Sarrazin JF, Thibault B, Rivard L, Gula L, Sit PL, et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1273–83.
12. Malorni L, Shetty PB, De Angelis C, Hilsenbeck S, Rimawi MF, Elledge R, et al. Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;136(3):795–804.

12. Brenton JD, Carey LA, Ahmed A, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005;26:7350–60.
14. 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.
15. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(11):674–90.
16. Shi Y, Jin J, Ji W, Guan X. Therapeutic landscape in mutational triple negative breast cancer. *Mol Cancer*; 2018;17:1–11.
17. Lips EH, Mulder L, Oonk A, Kolk LE Van Der, Hogervorst FBL, Imholz ALT, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. 2013;108(10):2172–7.
18. Agurs-Collins T, Ross SA, Dunn BK. The many faces of obesity and its influence on breast cancer risk. *Front Oncol*. 2019;9:1–14.
19. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(5):378–97.
20. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res*. 2011;71(14):4821–33.
21. Saji S. Evolving approaches to metastatic breast cancer patients pre-treated with anthracycline and taxane. *BioDrugs*. 2013;27:469–78.
22. 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. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1796–804.
23. 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.
24. Turk AA, Wisinski KB. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside. *Cancer*. 2018;124(12):2498–506.
25. D’Andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair*. Elsevier; 2018;71:172–6.

26. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016;17(12):e542–51.
27. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget.* 2015;6(7):5449–64.
28. Kitano A, Ono M, Yoshida M, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. *ESMO Open.* 2017;2(2):1–8.
29. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(22):2108–21.
30. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27(1):16–25.
31. Tower, Ruppert, Britt. The immune microenvironment of breast cancer progression. *Cancers (Basel).* 2019 Sep 16;11(9):1375.
32. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011;331(6024):1565–70.
33. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011;29(1):235–71.
34. Teng MWL, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, et al. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res.* 2012;72(16):3987–96.
35. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007;450(7171):903–7.
36. 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.
37. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med.* 2016;375(9):819–29.
38. Candido J, Hagemann T. Cancer-Related Inflammation. *J Clin Immunol.* 2013;33(July 2012):S79–84.
39. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015;74(1):5–17.

40. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med.* 2006;203(7):1651–6.
41. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541–50.
42. 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.
43. 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;19(1):40–50.
44. 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. *Ecancermedicalscience.* 2017;11:1–10.
45. Bense RD, Sotiriou C, Piccart-Gebhart MJ, Haanen JBAG, Van Vugt MATM, De Vries EGE, et al. Relevance of tumor-infiltrating immune cell composition and functionality for disease outcome in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(1):1–9.
46. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259–71.
47. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Mu BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):105–13..
48. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: From TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(4):228–41.
49. Espinoza JA, Jabeen S, Batra R, Papaleo E, Wielenga VT, Talman MM, et al. Cytokine profiling of tumor interstitial fluid of the breast and its relationship with lymphocyte infiltration and clinicopathological characteristics. *Oncoimmunology.* 2016;5(12):e1248015.
50. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):e218–28.

51. Garner H, de Visser KE. Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(8):483-97.
52. Aukes K, Forsman C, Brady NJ, Astleford K, Blixt N, Sachdev D, et al. Breast cancer cell-derived fibroblast growth factors enhance osteoclast activity and contribute to the formation of metastatic lesions. *PLoS One*. 2017;12(10):1–18.
53. Liu W, Xu J, Wang M, Wang Q, Bi Y, Han M. Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-A facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *Int J Oncol*. 2011;39(5):1213–20.
54. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(9):1745–70.
55. Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, Elmberger G, Skoog L, Lehtiö J, et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1639–46.
56. Nelson BH. IL-2, Regulatory T Cells, and Tolerance. *J Immunol*. 2004;172(7):3983-8.
57. Egelston CA, Avalos C, Tu TY, Simons DL, Jimenez G, Jung JY, et al. Human breast tumor-infiltrating CD8⁺ T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. *Nat Commun*. 2018;9(1):1–11.
58. Kawaguchi K, Sakurai M, Yamamoto Y, Suzuki E, Tsuda M, Kataoka TR, et al. Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–12.
59. Lin J, Zhu Z, Xiao H, Wakefield MR, Ding VA, Bai Q, et al. The role of il-7 in immunity and cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(3):963–7.
60. Boesch M, Onder L, Cheng H, Novkovic M, Mörbe U, Sopper S, et al. Interleukin 7-expressing fibroblasts promote breast cancer growth through sustenance of tumor cell stemness. *Oncoimmunology*. 2018;7(4):e1414129.
61. Al-Rawi MAA, Rmali K, Mansel RE, Jiang WG. Interleukin 7 induces the growth of breast cancer cells through a wortmannin-sensitive pathway. *Br J Surg*. 2004;91(1):61–8.
62. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Front Immunol*. 2018;9(5):1–19.
63. Josephs SF, Ichim TE, Prince SM, Kesari S, Marincola FM, Escobedo AR, et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J Transl Med*. 2018;16(1):1–8.
64. Balkwill F. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(3):409–16.

65. Santana Carrero RM, Beceren-Braun F, Rivas SC, Hegde SM, Gangadharan A, Plote D, et al. IL-15 is a component of the inflammatory milieu in the tumor microenvironment promoting antitumor responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(2):599–608.
66. Gillgrass AE, Chew M V., Krneta T, Ashkar AA. Overexpression of IL-15 promotes tumor destruction via NK1.1+ cells in a spontaneous breast cancer model. *BMC Cancer*. 2015;15(1):1–15.
67. Jabeen S, Espinoza JA, Torland LA, Zucknick M, Kumar S, Haakensen VD, et al. Noninvasive profiling of serum cytokines in breast cancer patients and clinicopathological characteristics. *Oncoimmunology*. 2019;8(2):1–11.
68. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99.
69. Aggarwal BB, Vijayalekshmi R V., Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res*. 2009;15(2):425–30.
70. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(3):151–67.
71. 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. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):983–91.
72. Althobiti M, Aleskandarany MA, Joseph C, Toss M, Mongan N, Diez-Rodriguez M, et al. Heterogeneity of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer and its prognostic significance. *Histopathology*. 2018;73(6):887–96.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

São Paulo, 28 de maio de 2018.

À Dra. Dirce Maria Carraro

Aluna: Ananda Domingues Lopes (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1746/13H

"Determinação de citocinas solúveis no plasma de pacientes com TNBC tratados com quimioterapia neoadjuvantes: Associação de perfis solúveis de citocinas com respostas à terapia e progressão da doença."

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **22/05/2018** **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado "Aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão do carcinoma ductal de mama: investigação da progressão do carcinoma in situ e do papel da mutação em BRCA1 no tumor triplo negativo", registrado neste CEP sob nº 1746/13. O projeto afiliado em referência será Mestrado da aluna Ananda Domingues Lopes, sob orientação da Dra. Dirce Maria Carraro.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO

PARTICIPANTE:

SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (....)

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: MEDICINA PERSONALIZADA APLICADA PARA O MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO PACIENTE ONCOLÓGICO

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Dirce Maria Carraro

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

CIPE:

- ☐ Dra. Giovana Tardin Torrezan
- ☐ Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen
- ☐ Dra Vilma Martins
- ☐ Dr. Tiago Goss dos Santos
- ☐ Dr. Kenneth John Gollob

Departamento Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center

- ☐ Dr. Helano C. Freitas
- ☐ Dr. Vladimir C. Cordeiro de Lima
- ☐ Dra. Solange Sanches
- ☐ Dra. Rachel Riechelmann
- ☐ Dra. Maria Nirvana da Cruz Formiga
- ☐ Dr. Celso Abdon Lopes de Mello

Departamento de Cirurgia Oncológica

- ☐ Dra. Fabiana Baroni Alves Makdissi
- ☐ Dr. Stenio Cássio Zequi
- ☐ Dr. Walter Henriques da Costa
- ☐ Dr. Samuel Aguiar Junior
- ☐ Dr. Luiz Paulo Kowalski
- ☐ Dr. Jefferson Gross

- ☐ Equipe de Enfermeiras de Pesquisa

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa (“Medicina Personalizada Aplicada para o Monitoramento Terapêutico do Paciente Oncológico”), que será realizada no A.C.Camargo Cancer Center.

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

O projeto pretende caracterizar as alterações exclusivas do material genético do tumor utilizando painéis de genes para análise desse material (por método de sequenciamento) e monitorar, usando como modelo as alterações exclusivas encontradas no tumor, a eficácia do tratamento pela avaliação em plasma e em determinados casos, em urina. Além disso, pretendemos investigar outros componentes de seu sangue como célula tumoral circulante (CTC), vesículas extracelulares (VE), células do sistema imune e marcadores imunológicos para estudar os mecanismos envolvidos na eficácia e resistência ao tratamento.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

Várias evidências científicas têm demonstrado que tumores sólidos liberam material genético e outros componentes, como células tumorais circulantes e vesículas extracelulares, na circulação sanguínea do paciente. Há atualmente vários grupos de pesquisa padronizando os procedimentos para detecção destes marcadores na corrente sanguínea do paciente. No entanto, apesar de ter tido grandes avanços, esses procedimentos ainda apresentam limitações para sua utilização na rotina clínica.

Assim, esse projeto tem o objetivo de investigar, por técnicas de sequenciamento, o material genético de parte de seu tumor, que será armazenado no nosso Biobanco, com sua devida autorização, para determinar as alterações específicas no DNA. Com esse procedimento, nós pretendemos desenvolver uma ferramenta para identificar no seu plasma e/ou urina a presença de DNA da célula tumoral. Além disso, para um subgrupo de pacientes, também iremos analisar outros componentes da biópsia líquida presentes no plasma, bem como investigar, em amostras de sangue periférico, as células do sistema imune e moléculas relacionadas. Como se trata de um projeto científico, sua aplicação na rotina não será imediata, uma vez que é um processo experimental.

Uma vez superado todos os desafios decorrentes desse projeto e estabelecido com segurança este procedimento, sua aplicação poderá ser bastante ampla na área da oncologia, tanto na detecção precoce de recidiva do tumor como para monitorar resposta à quimioterapia.

VI – DESENHO DA PESQUISA

O estudo a ser realizado será experimental, exploratório, longitudinal, prospectivo e envolverá também aspectos de pesquisa básica. Os tumores a serem avaliados incluem: carcinoma de pulmão nãopequenas células (CPNPC), adenocarcinoma de reto e colon, cancer de mama triplo negativo (CMTN), carcinomas renais (CR), melanoma e carcinomas de cabeça e pescoço (cavidade oral).

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se concordar em participar deste estudo, você será submetido a coletas de sangue (aproximadamente 8 mL), antes do início do tratamento (cirurgia ou quimioterapia/radioterapia), e em diferentes momentos, sendo que serão feitas em média 6 coletas ao longo da pesquisa. Caso haja necessidade, dependendo do tratamento e de seu consentimento, mais coletas de sangue serão realizadas.

Você não precisará vir ao hospital apenas para a coleta desta pesquisa. Contataremos você nas datas que você tiver exames e na maioria das vezes, aproveitaremos as punções venosas (coleta de sangue) dos exames no laboratório de rotina. Caso não tenha exames a ser realizados, contataremos você nos dias que tiver consulta ou outros procedimentos no hospital. Toda identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, e o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, mediante seu consentimento e após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo, uma vez que você não será submetido a nenhum procedimento adicional aqueles realizados durante o seu tratamento neste hospital.

No momento das coletas de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que

desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não haverá benefícios de qualquer espécie para os voluntários, apenas a importância de contribuir para uma pesquisa científica cujos dados obtidos poderão trazer benefícios para pessoas com câncer no futuro. A recusa em participar, não acarretará prejuízo em seu tratamento.

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica/pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Para se fazer pesquisas mais relevantes, é importante que os pesquisadores compartilhem informações obtidas de estudos com amostras humanas. Eles fazem isso depositando os resultados em um ou mais bancos de dados científicos, onde são armazenados junto com informações de outros estudos. Os pesquisadores podem então estudar as informações combinadas para aprender ainda mais sobre saúde e doenças. A deposição dos dados sempre é feita de forma anonimizada e seu nome e outras informações que poderiam identificá-lo diretamente nunca serão colocados em um banco de dados científicos. Se você concordar em participar do estudo, algumas de suas informações genéticas e de saúde podem ser colocadas em um ou mais bancos de dados científicos e publicadas em revistas científicas. Existem muitos tipos diferentes de bancos de dados científicos, que podem ser mantidos por instituições nacionais ou internacionais. Apesar de ser extremamente pequeno, há um risco de você poder ser identificado, uma vez que a sua composição genética é única. Por isso, o acesso de pesquisadores para estudarem as informações presentes nos bancos de dados é realizado de forma altamente controlada, através de uma autorização de acesso pelos responsáveis do banco de dados e da concordância com os termos de uso de cada banco, garantindo o compromisso de proteger sua privacidade e manter suas informações confidenciais.

Os pesquisadores comprometem-se a manter a confidencialidade dos dados do estudo e do paciente, porém há um risco mínimo de perda desta confidencialidade.

XI – ACHADOS INCIDENTAIS

A pesquisa da qual você irá participar pode identificar informações genéticas que não estavam sendo procuradas, mas que podem ter implicações na sua saúde e/ou na saúde de membros da sua família. Você pode escolher ser ou não ser informado sobre estes resultados por seu médico ou outro médico especialista no assunto. Para isso, assinale apenas uma das alternativas abaixo:

- ☐ Quero ser informado
- ☐ Não quero ser informado.

XII - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XIII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores e médicos se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** Dra. Dirce Maria Carraro – pesquisadora (011 2189-5023), Vilma Regina Martins – pesquisadora (011 2189 5000 – ramal 2979), Ludmilla Thomé Domingos Chinen (011 2189 500 – ramal 2936).

XIV. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha **uma** das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

- 1.() **Autorizo** o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.
- 2.() **Não autorizo** o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Se você escolheu a resposta do item 1, favor assinalar uma das seguintes opções:

- () **Quero receber** um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center.
- () **Não quero receber** um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.
- Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

- () Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

() Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XV. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Dirce Maria Carraro

Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramais 5023

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu, _____

declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____

Data

Assinatura do pesquisador responsável/ responsável pela aplicação do termo de consentimento

_____/_____/_____