

MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

**CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO EM UMA POPULAÇÃO DO
DISTRITO FEDERAL – ANÁLISE DE INFILTRADOS LINFOCITÁRIOS
TUMORAIS E SUAS CORRELAÇÕES COM FENÓTIPOS CLÍNICOS E
EXPRESSÃO TECIDUAL DO BIOMARCADOR MICRORNA miR-155**

BRASÍLIA 2025

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

**CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO EM UMA POPULAÇÃO
DO DISTRITO FEDERAL – ANÁLISE DE INFILTRADOS LINFOCITÁRIOS
TUMORAIS E SUAS CORRELAÇÕES COM FENÓTIPOS CLÍNICOS E
EXPRESSÃO TECIDUAL DO BIOMARCADOR MICRORNA miR-155**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Titze de Almeida
Coorientador: Prof. Dr. João Nunes Matos Neto

BRASÍLIA
2025

MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

**CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO EM UMA POPULAÇÃO
DO DISTRITO FEDERAL – ANÁLISE DE INFILTRADOS LINFOCITÁRIOS
TUMORAIS E SUAS CORRELAÇÕES COM FENÓTIPOS CLÍNICOS E
EXPRESSÃO TECIDUAL DO BIOMARCADOR MICRORNA miR-155**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 16 de setembro de 2025

BANCA EXAMINADORA

Dr. RICARDO TITZE DE ALMEIDA, UnB
Presidente

Dr. FABRICIO TAVARES MENDONÇA, HBDF
Examinador Externo à Instituição

Dra. MARIA DE FATIMA BRITO VOGT, OUTROS
Examinadora Externa à Instituição

Dr. DIEGO MADUREIRA DE OLIVEIRA, UnB
Examinador Interno

Dr. RAPHAEL SEVERINO BONADIO, UnB
Examinador Externo à Instituição

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente as minhas queridas pacientes, que me confiaram suas vidas para tratamento e estudo.

Aos meus pais Lais e William, razão de tudo ser possível, que de maneira altruísta tantas vezes abdicaram dos próprios sonhos para que eu pudesse viver os meus.

Aos meus irmãos Liliane e Flávio, companheiros de toda vida e de todas as jornadas.

Ao meu marido Rafael, que se dedicou todos esses anos á nossa família para que pudesse aprimorar meus estudos.

Aos meus filhos Gustavo e Fernando, que são a razão da minha vida.

Às colegas Franciele e Sabrina pela ajuda e contribuições indispensáveis.

Ao amigo Thiago Davi e ao Laboratório Diagnose pelas contribuições na análise das amostras.

Ao meu Orientador, professor Ricardo Titze, pelo acolhimento e direcionamento em todas as etapas.

Ao meu coorientador e amigo, Dr João Nunes, pela generosidade nessa jornada.

À Banca examinadora pela disponibilidade e contribuição para enriquecimento da tese.

À Deus, sempre!

RESUMO

Diversos fatores de risco ambientais e genéticos estão associados ao desenvolvimento do câncer de mama, cuja detecção depende de fatores clínicos, imagem e da avaliação histopatológica. O tumor de mama triplo negativo (TNBC) é caracterizado pela ausência de expressão de receptores hormonais e HER2. A quimioterapia neoadjuvante é a abordagem preferencial para tumores localmente avançados, e a presença de infiltrados linfocitários tumorais (TILs) superexpressos é relacionada a melhores desfechos, atuando como marcadores de bom prognóstico. O microRNA miR-155 tem sido identificado como um marcador biológico elevado em casos de carcinoma ductal de mama, e entender sua relação com TILs é essencial para associá-lo a potenciais alvos terapêuticos.

Este estudo, de desenho transversal, utilizou amostras de biópsias e de tecidos mamários cirúrgicos após quimioterapia neoadjuvante em 37 pacientes com TNBC no Distrito Federal. Foram realizadas análises para identificar associações entre a expressão de TILs e a resposta ao tratamento clínico neoadjuvante, assim como a associação com expressão de outros marcadores teciduais tumorais como CD3 e miR-155. Dados clínicos foram coletados, análises moleculares realizadas por RT-qPCR e a expressão de marcadores foi avaliada via imuno-histoquímica. Testes de regressão logística e curvas ROC foram aplicados, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.

Os resultados mostraram que 44,1% das pacientes alcançaram resposta patológica completa (pCR). A expressão de CD3 foi identificada como um preditor significativo da expressão de TILs, especialmente em conjunto com miR-155. Amostras foram classificadas em TILs baixos e altos, revelando que a expressão de miR-155 foi maior em tumores com alto grau de TILs (2,655 vs. 1,310; $P=0,0379$). A acurácia de miR-155 como biomarcador para identificar tumores com alta infiltração linfocitária foi de 81% (AUC 0,81; $P=0,0357$). Quando combinado com o marcador CD3, a acurácia aumentou para 98% (AUC 0,98; $P=0,0011$), apresentando 100% de sensibilidade e 87,5% de especificidade. Esses resultados indicam que a combinação miR-155 e CD3 é promissora para diagnóstico e prognóstico em câncer de mama triplo negativo, orientando tratamentos personalizados. No entanto, são necessários novos estudos com um número maior de amostras em coortes independentes para validar os achados.

Palavras-chave: Câncer de mama triplo negativo; TILs; biomarcadores; microRNA; miR-155

ABSTRACT

Various environmental and genetic risk factors are associated with the development of breast cancer, the detection of which depends on clinical, imaging, and histopathological factors. Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of expression of hormone receptors and HER2. Neoadjuvant chemotherapy is the preferred approach for locally advanced tumors, and the presence of overexpressed tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) is related to better outcomes, serving as markers of favorable prognosis. MicroRNA miR-155 has been identified as a biological marker elevated in cases of ductal carcinoma of the breast and understanding its relationship with TILs is essential for associating it with potential therapeutic targets.

This cross-sectional study utilized biopsy and surgical breast tissue samples following neoadjuvant chemotherapy in 37 patients with TNBC in the Federal District. Analysis was performed to identify associations between TIL expression and response to neoadjuvant clinical treatment, as well as the association with expression of other tumor tissue markers such as CD3 and miR-155. Clinical data were collected, molecular analyses were performed via RT-qPCR, and marker expression was assessed by immunohistochemistry. Logistic regression tests and ROC curves were applied, with a significance level set at $p < 0.05$.

The results showed that 44.1% of patients achieved a complete pathological response (pCR). The expression of CD3 was identified as a significant predictor of TIL expression, particularly in conjunction with miR-155. Samples were classified as having low TILs and high TILs, revealing that miR-155 expression was higher in tumors with a high grade of TILs (2.655 vs. 1.310; $P=0.0379$). The accuracy of miR-155 as a biomarker for identifying tumors with high lymphocytic infiltration was 81% (AUC 0.81; $P=0.0357$). When combined with the marker CD3, the accuracy increased to 98% (AUC 0.98; $P=0.0011$), demonstrating 100% sensitivity and 87.5% specificity. These results indicate that the combination of miR-155 and CD3 is promising for diagnosis and prognosis in triple-negative breast cancer, guiding personalized treatments. However, further studies with a larger number of samples in independent cohorts are necessary to validate the findings.

Keywords: Triple-negative breast cancer; TILs; biomarkers; microRNA; miR-15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Surgimento do câncer – modificado de National Cancer	14
Figura 2. Figura que ilustra a tabela de incidência dos tipos de cânceres no mundo e no Brasil, incluindo tumores femininos e tumores masculinos.....	15
Figura 3. Representação esquemática da mama	16
Figura 4. A - Carcinoma Ductal Infiltrante; B - Carcinoma Lobular	18
Figura 5. Explicação do grau nuclear do câncer de mama	18
Figura 6. Estadiamento do câncer de mama	25
Figura 7. Quantidade de TILs no estroma tumoral	49
Figura 8. Fluxograma do número de pacientes selecionadas para o estudo	54
Figura 9. Valores de TILs em amostras de biopsias com pCR.....	61
Figura 10. Comparação da mediana dos valores de expressão de TILs em amostras com pCR e amostras sem pCR.....	61
Figura 11. Expressão de TILs correlacionada com Resposta patológica completa	62
Figura 12. Expressão de miR-155 de acordo com o grau de infiltração linfocitária	64
Figura 13. Análise da acurácia da expressão de miR-155 em identificar indivíduos com alta infiltração linfocitária	64
Figura 14. Expressão de miR-155 e CD3 de acordo com o grau de infiltração linfocitária	65
Figura 15. Análise da acurácia da expressão de miR-155 e de CD3 em identificar indivíduos com alta infiltração linfocitária	66
Figura 16. Classificação 2 de estadiamento de acordo com AJCC UICC 8th edição....	96
Figura 17. Classificação 3 de estadiamento de acordo com AJCC UICC 8th edição....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Idade das pacientes estudadas	55
Tabela 2. Caracterização do perfil demográfico das pacientes estudadas.....	55
Tabela 3. Características clínicas ao diagnóstico	56
Tabela 4. Características patológicas pós-quimioterapia neoadjuvante.....	57
Tabela 5. Índice Ki67	58
Tabela 6. Caracterização do tratamento	58
Tabela 7. Características de tratamento	58
Tabela 8. Caracterização da resposta ao tratamento sistêmico	59
Tabela 9. Estatísticas descritivas da biologia tumoral	59
Tabela 10. Resultado da análise de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP, e VPN com a TILs, CD3, CD4/CD8 e FoxP3 para a Biopsia e Peça cirúrgica	60
Tabela 11. Resultado da comparação de qualquer resposta patológica com as variáveis linfocitárias em tecidos de biopsia e peça cirúrgica	60
Tabela 12: Proporção de indivíduos de acordo com a presença ou ausência de resposta patológica completa (pCR) e com o padrão de expressão de TILs, alto ou baixo	62
Tabela 13. Análise comparativa dos níveis de resposta patológica de acordo com as variáveis linfocitárias	63
Tabela 14. Resultado da análise de regressão linear múltipla entre o TILs e as variáveis preditoras CD3, CD4/CD8 e FoxP3 para tecido de biópsia e peça cirúrgica	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Antraciclina e Ciclofosfamida

AJCC – American Joint Committee on Cancer

ASCO – American Society of Clinical Oncology

ASO – Oligonucleotídeo Antisense

AUC – Área Sob a Curva

B7-H4 ou **VTCN1** – V-set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1

BCL-2 – B-cell Lymphoma 2

Bi-RADS – Breast Imaging Reporting and Data System (Sistema de Relatório de Dados sobre Imagem da Mama)

BTLA – B and T Lymphocyte Attenuator

CD4+ – Células T Auxiliares

CD8+ – Células T Citotóxicas

CDI – Carcinoma Ductal Infiltrante

CERB – Cytokine-Inducible Emitter Receptor Beta

CISH – Hibridização In Situ Cromogênica

CLAUS – Cluster of Differentiation

CLIS – Carcinoma Lobular In Situ

CTLA-4 – Antígeno 4 de Células T Citotóxicas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

ECCTCG – The Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group

EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico

ER – Receptor de Estrogênio

EUA – Estados Unidos da América

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio Imuno-Sorvente Ligado a Enzimas)

FDA – Food and Drug Administration

FFPE – Fixados em Formol e Embebidos em Parafina

FISH – Hibridização In Situ Fluorescente

FOXP3 – Forkhead Box P3

FR – Fator de Risco

FSH – Hormônio Folículo-Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

Gy – Gray

HBOC – Hereditary Breast and Ovarian Cancer

HDA – Hiperplasia Ductal Atípica

HE – Hematoxilina e Eosina

HER2 – Receptor de Crescimento Epidérmico Humano 2

HER2/CEP17 – Receptor de Crescimento Epidérmico Humano 2 / Probe Centromérica para Cromossomo 17

HLA – Hiperplasia Lobular Atípica

HR – Hazard Ratio

IHQ – Imuno-Histoquímica

IL – Interleucina

IMC – Índice de Massa Corporal

ISH – Hibridização In Situ

KD – Killer Differentiation

MMG – Mamografia

miR – Micro-RNA

NCCN – National Comprehensive Cancer Network

NGS – Sequenciamento de Próxima Geração

NK – Natural Killers

PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina

PARP – Poli(ADP-ribose) Polimerase

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pCR – Resposta Patológica Completa

PD-1 – Programmed Cell Death 1 (Proteína de Morte Celular Programada 1)

PD-L1 – Programmed-Death Ligand 1 (Ligante de Morte Programada 1)

PR – Receptor de Progesterona

RNA – Ácido Ribonucleico

SEER – Surveillance, Epidemiology and End Results Program

SERMS – Selective Estrogen Receptor Modulators

SERDS – Selective Estrogen Receptor Downregulators

SG – Sobrevida Global

SISH – Hibridização In Situ Realçada por Prata

SLD – Sobrevida Livre de Doença

SLF – Síndrome de Li-Fraumeni

SLP – Sobrevida Livre de Progressão

SLR – Sobrevida Livre de Recorrência

SOE – Sem Outra Especificação

STAT3 – Signal Transducers and Activators of Transcription 3

sTILs – Infiltrado Linfocitário em Estroma Tumoral

TCR – Receptor de Células T

TDM-1 – Trastuzumabe-entansene

TDX-D – Trastuzumabe-deruxtecano

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador Beta

Th – Linfócitos T Auxiliares

TILs – Infiltrados Linfocitários Tumorais

TNBC – Câncer de Mama Triplo NegativoTDM-1 – Trastuzumabe - emtansina

TNM – Tumor, Nódulos e Metástases

Treg – Linfócitos T Reguladores

TROP-2 – Antígeno de Superfície de Células Trofoblásticas 2

UICC – International Union for Cancer Control

USPSTF – United States Preventive Services Task Force

VAB – Biópsia Assistida à Vácuo

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

WHI – Women's Health Initiative

SUMÁRIO

I. Introdução	14
1. Definição do câncer de mama	14
2. Epidemiologia	14
3. Biologia do câncer de mama	16
3.1. Anatomia da mama	16
3.2. Tipos Histológicos	17
3.3. Classificação imuno-histoquímica do câncer de mama	19
3.3.1. Tumores Receptores Hormonais positivo	19
3.3.2. Tumores com superexpressão de HER2	20
3.3.3. Tumores Triplo negativos (Vide item 7)	20
4. Fatores de risco para câncer de mama	20
5. Diagnóstico e rastreamento do câncer de mama	22
5.1. Exame clínico	22
5.2. Métodos de imagem	23
5.3. Biopsia de lesões mamárias suspeitas	24
5.4. Estadiamento	25
6. Tratamento do câncer de mama	26
7. Câncer de mama Triplo negativo	31
8. Biomarcadores	35
8.1. Infiltrados Linfocitários Tumoriais (TILs)	36
8.2. MicroRNAs (miRNA)	39
8.2.1. Biologia e expressão de microRNAs em tumores mamários	39
8.2.2. MicroRNA 155 (miR155) e oncologia mamária	42
II. Objetivos	46
1. Objetivo geral	46
2. Objetivos específicos	46
III. Metodologia	47
1. Critérios de inclusão e exclusão	47
2. Coleta de dados	47
3. Análise Imuno-histoquímica e molecular	48
3.1. Análise imuno-histoquímica para TILs, CD3, CD4, CD8 e FOXP3	48
3.2. Análise molecular da expressão de miR-155 e controle endógenos	50

4. Análise estatística	51
5. Viabilidade técnica da execução do projeto	53
IV. Resultados	54
V. Discussão	67
VI. Conclusões e perspectivas	77
VII. Referências bibliográficas	78
VIII. Anexos	96
Anexo 1: Figuras 17 e 18	96
Anexo 2: Parecer de CEP	101
Anexo 3: Termo de consentimento instituição privada	102
Anexo 4: Termo de consentimento instituição pública	103
Anexo 5: Extração de RNA de amostras fixadas em formol	104
Anexo 6: Quantificação de RNA e miRNA por fluorimetria - Qubit 2.0.....	104
Anexo 7: Protocolo TaqMan miRNA Advanced Assay	105

I. INTRODUÇÃO

1. Definição de Câncer

As células humanas crescem e se multiplicam por um processo de divisão celular rigorosamente controlado, assim formando novas células conforme as necessidades fisiológicas de cada tecido do organismo (1). Quando as células envelhecem ou são danificadas, elas morrem e novas células ocupam seu lugar. Às vezes, esse processo ordenado falha por mutação na estrutura do DNA e esse dano é perpetuado em células anormais que crescem e se multiplicam formando tumores que podem ser cancerígenos ou não cancerígenos (benignos) (2). Essa é uma doença que pode surgir praticamente em qualquer órgão do corpo humano, que é composto por trilhões de células (3).

O câncer é uma doença genética caracterizada por mutações no DNA, que podem ser induzidas por substâncias ambientais nocivas, como os produtos químicos presentes na fumaça do tabaco e a radiação ultravioleta do sol, ou podem ser herdadas dos pais. A combinação única dessas alterações resulta na formação de tumores malignos (4).



Figura 1. Surgimento do câncer – modificado de National Cancer Institute (5)

2. Epidemiologia

Estima-se que uma em cada quatro pessoas desenvolverá câncer em algum momento da vida. Essa doença é a principal ou a segunda causa de morte prematura em muitos países, com óbitos ocorrendo antes dos 70 anos. Na população feminina, a incidência e a mortalidade por câncer de mama estão aumentando rapidamente em todo o mundo, com uma em cada cinco mulheres tendo diagnóstico de câncer de mama ao longo da vida.

Tumores Femininos		
Tipo de Câncer	Incidência (6) (Dados Mundiais) (7)	Incidência (Dados Brasil) (8)
Câncer de mama	2,3 milhões (24,5%)	73.610 mil (30,1%)
Câncer de cólon e reto	865 mil (9,4%)	23.660 mil (9,7%)
Câncer de pulmão	771 mil (8,4%)	14.540 mil (6%)
Câncer de colo de útero	604 mil (6,5%)	17.010 mil (7%)

Tumores Masculinos		
Tipo de Câncer	Incidência (novos casos) (7)	Incidência (Dados Brasil) (8)
Câncer de pulmão	1,4 milhão (14,3%)	18.020 mil (7,5%)
Câncer de próstata	1,3 milhão (14,1%)	71.730 mil (30%)
Câncer de cólon e reto	1 milhão (10,6%)	21.970 mil (9,2%)
Câncer de estômago	719 mil (7,1%)	13.340 mil (5,6%)

Figura 2. Figura que ilustra a tabela de incidência dos tipos de cânceres no mundo e no Brasil, incluindo tumores femininos e tumores masculinos (7) (8).

A estimativa de 2023 foi de 43.170 mortes por câncer de mama no mundo (9) e aproximadamente 18.000 mortes no Brasil (8).

Compreender a biologia tumoral é fundamental para elucidar as razões por trás da alta incidência de câncer no mundo, especialmente o câncer de mama. A análise detalhada da fisiopatologia tumoral permite identificar os processos celulares e moleculares que contribuem para o desenvolvimento e a progressão do câncer (4). Além disso, esse conhecimento é crucial para a identificação de marcadores biológicos que podem influenciar a formação do câncer, possibilitando a formulação de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficazes. Ao investigar os fatores que desencadeiam e sustentam o crescimento tumoral, podemos não apenas entender as nuances do câncer, mas também desenvolver intervenções direcionadas que visem melhorar os desfechos clínicos e aumentar a sobrevida das pacientes (10).

3. Biologia do Câncer de mama

3.1 Anatomia da mama

As mamas são órgãos pares superficiais derivadas de glândulas sudoríparas modificadas e situam-se entre a segunda e a sexta costela. Possui pele fina com folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A camada subcutânea possui tecido adiposo, vasos venosos, arteriais e linfáticos e nervos (11).

A glândula mamária é dividida em 15 a 20 lobos, sendo que cada lobo é drenado por um ducto coletor correspondente convergindo até a papila em arranjo radial. Cada uma contém 20 a 40 lóbulos, que por sua vez consistem em 10 a 100 alvéolos. A fáscia peitoral superficial envolve toda a mama (12).

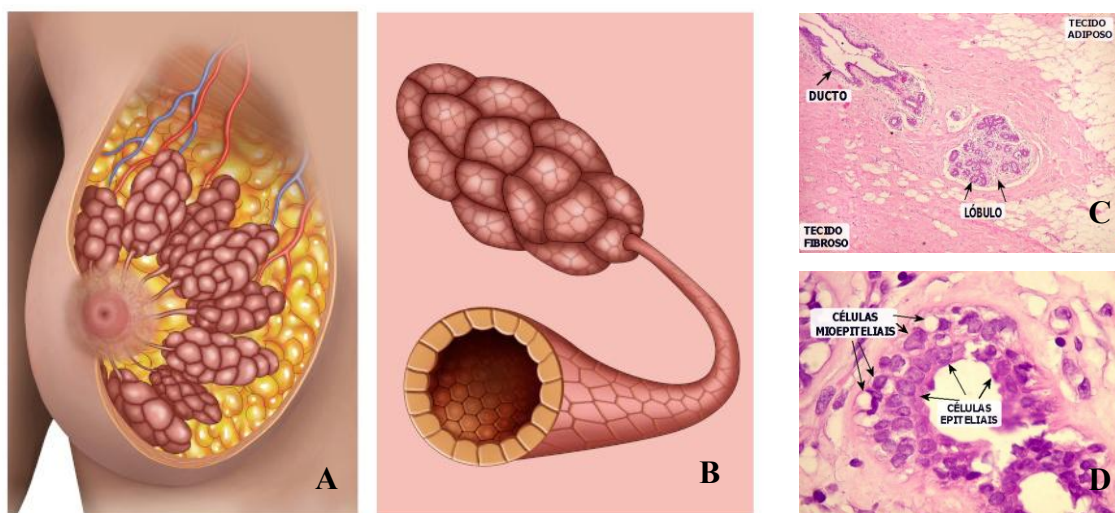


Figura 3. Representação esquemática da mama. A. Mama com lóbulos, ductos, vasos e tecido conjuntivo. B. Sistema lóbulo-ductal. C e D. Representação histológica do tecido mamário. Modificado de <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/mamas.htm> e <https://anatpat.unicamp.br/lamgin21.html>

O parênquima da mama é composto pelo epitélio ductal disposto em duas camadas: epitelial luminal, com células cuboídes ou colunares, e a camada basal com células mioepiteliais contráteis. O estroma é composto por tecido conjuntivo, vaso e nervos (12).

A sustentação mamária ocorre pelos ligamentos suspensórios de Cooper e a irrigação arterial ocorre predominantemente pelas artérias mamárias interna e externa. A drenagem linfática é direcionada em 97% para linfonodos em axila ipsilateral e 3% para mamária interna (12,13).

Os linfonodos axilares, estão divididos com base em sua localização, sendo classificados em níveis I, II e III de Berg. Já os linfonodos da mama interna repousam em espaços intercostais em região para esternal (11).

3.2 Tipos Histológicos

Embora existam tumores de origem não epitelial, como sarcomas ou tumores de pele, esses casos são raros e não são o foco deste estudo, pois não se classificam como câncer de mama, apesar de sua apresentação nessa localidade (14).

Na avaliação patológica macroscópica, essas lesões manifestam-se como massas duras, branco-acinzentadas e arenosas, que invadem o tecido circundante de maneira aleatória, resultando em uma forma irregular e estrelada característica. Microscopicamente, as lesões apresentam cordões e ninhos de células tumorais com características citológicas que variam de brandas a altamente malignas. À medida que as células malignas se infiltram no estroma mamário e no tecido adiposo, induzem uma resposta fibrosa, muitas vezes resultando em massa clinicamente palpável, com densidade radiológica e características ultrassonográficas sólidas típicas dos carcinomas invasivos (15) (16).

O tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal infiltrante, representando 40 a 70% dos casos. Outros tipos incluem o carcinoma lobular infiltrante (5 a 15%), carcinoma apócrino (4%), carcinoma mucinoso (2%), carcinoma tubular (1,6%), carcinoma micropapilar (0,9 a 2%), carcinoma metaplásico (0,2 a 1%) e carcinoma cribriforme (0,4%). O carcinoma ductal infiltrante também é conhecido como carcinoma infiltrante de nenhum tipo especial ou carcinoma infiltrante não especificado de outra forma (SOE) (17).

Alguns carcinomas lobulares infiltrantes apresentam uma aparência macroscópica semelhante à dos carcinomas ductais infiltrantes. Por essa razão, é necessário investigar a presença da proteína E-caderina, responsável pela adesão das células epiteliais, através de imuno-histoquímica. Essa proteína está presente nos tumores ductais e ausente nos lobulares (18).

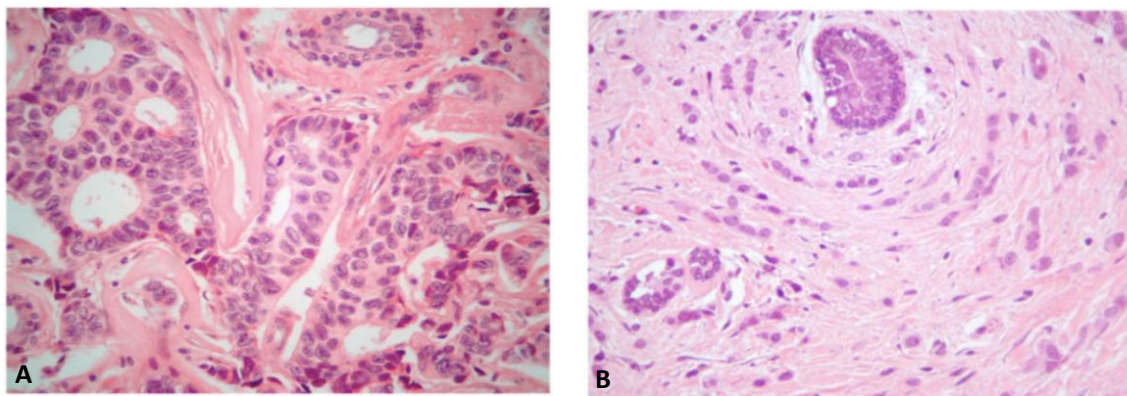


Figura 4. A - Carcinoma Ductal Infiltrante; B - Carcinoma Lobular Infiltrante (19)

Os carcinomas infiltrantes são classificados em três graus, com base em uma combinação de características arquiteturais e citológicas, geralmente avaliadas por um sistema de pontuação que considera três parâmetros (20):

Grau 1	Bem diferenciado	Células que infiltram o estroma como ninhos sólidos de glândulas. Os núcleos são relativamente uniformes com pouca ou nenhuma evidência de atividade mitótica
Grau 2	Moderadamente diferenciado	Células que infiltram como ninhos sólidos com alguma diferenciação glandular. Há algum pleomorfismo nuclear e uma taxa mitótica moderada
Grau 3	Pouco diferenciado	Compostos de ninhos sólidos de células neoplásicas sem evidência de formação de glândulas. Há atipia nuclear acentuada e atividade mitótica considerável

Figura 5. Explicação do grau nuclear do câncer de mama (20).

A definição histológica do câncer de mama é fundamental para a caracterização do tumor. Além disso, marcadores moleculares também desempenham um papel crucial na orientação do tratamento adequado. A análise imuno-histoquímica proposta por Perou no início dos anos 2000 permanece amplamente reconhecida e utilizada na prática clínica (21).

3.3. Classificação imuno-histoquímica do câncer de mama

As variadas formas de câncer de mama incluem subtipos que apresentam características específicas, as quais orientam as estratégias de tratamento. Portanto, todos os cânceres de mama recém-diagnosticados devem ser avaliados por meio de imuno-histoquímica, um procedimento baseado em reações químicas entre proteínas das células tumorais e anticorpos marcados que identificam a expressão dos receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Essas informações são fundamentais para fins prognósticos e terapêuticos (21).

Um tumor é considerado positivo para ER e PR quando esses receptores estão presentes em mais de 1% das células tumorais, representando aproximadamente 80% dos casos de câncer de mama (14). A superexpressão do HER2 ocorre em 15 a 20% dos pacientes, detectada por coloração intensa da membrana em mais de 10% das células tumorais invasivas (IHC 3+) ou pela amplificação do gene HER2 por hibridização *in situ* fluorescente, com proporção de HER2/CEP17 (sonda centromérica do cromossomo 17) $\geq 2,0$ e ≥ 4 sinais de cópia de HER2 por célula. Tumores que não expressam nenhum desses fatores são classificados como triplo negativos, correspondendo a 10 a 15% dos casos (22).

3.3.1. Tumores Receptores Hormonais positivo

Esses tumores são classificados como luminais, conforme a publicação emblemática de Charles Perou (21). Os receptores estão localizados nas células-alvo e atuam como fatores de transcrição dependentes de ligante. Quando um estrogênio ou um análogo de estrogênio se liga ao receptor de estrogênio (ER) no núcleo celular, ocorre alteração na conformação do domínio de ligação, permitindo interações com coativadores se o ligante for um agonista e bloqueando essas interações se for um antagonista, afetando, assim, as taxas de transcrição de genes responsivos ao estrogênio (23).

Em 2020, passou a ser recomendado que os cânceres com 1 a 10 por cento das células com coloração para ER deveriam ser relatados como uma nova categoria, "ER baixo positivo". Os dados são limitados para apoiar a terapia endócrina nesse cenário, pois o comportamento desses tumores geralmente se assemelha mais ao dos tumores triplo negativos do que aos luminais (24).

3.3.2. Tumores com superexpressão de HER2

O oncogene HER2 pertence à família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que são fundamentais na ativação de vias de transdução de sinal responsáveis pelo crescimento e diferenciação de células epiteliais, além da angiogênese (25).

Níveis elevados de expressão de HER2 indicam que as pacientes se beneficiam de tratamentos direcionados a esse receptor. O HER2 pode ser identificado principalmente por meio de ensaios de Western blotting, ELISA (ensaio imunoenzimático) ou imunohistoquímica (IHC). Se o resultado for indeterminado, outras técnicas como hibridização in situ (ISH), hibridização in situ fluorescente (FISH), hibridização in situ cromogênica (CISH), hibridização in situ realçada por prata (SISH) ou PCR (reação em cadeia da polimerase) podem ser utilizadas (26).

A coloração por IHC é classificada da seguinte maneira: IHC 3+: coloração intensa da membrana em >10% das células tumorais (considerado HER2 positivo); IHC 2+: coloração incompleta ou moderada em >10% das células tumorais (considerado indeterminado); IHC 1+: coloração fraca em >10% das células tumorais (relatado como HER2 negativo); IHC 0: nenhuma coloração observada ou coloração muito fraca em <10% das células tumorais (também considerado HER2 negativo). Resultados IHC 2+/3+ geralmente requerem testes adicionais de ISH e FISH (27).

3.3.3. Tumores triplo negativos (Vide item 7)

Esses tumores não expressam receptores hormonais nem proteínas da família HER2 (21). Por ser o foco deste estudo, uma descrição mais detalhada será apresentada posteriormente

4. Fatores de risco para câncer de mama

Globalmente, o câncer de mama é a principal causa de mortalidade por causa oncológica na população feminina, representando 15,5% de todos os casos (28). Em 2021, o Brasil registrou 18.139 óbitos por câncer de mama feminina, correspondendo a um risco de 16,4%. Embora não seja o tipo mais agressivo, esses números refletem a alta

prevalência do tumor na população feminina, tornando essencial a prevenção e o diagnóstico precoce (29).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do câncer de mama, sendo o principal o sexo feminino, com uma incidência cem vezes maior em mulheres do que em homens (30).

O risco de câncer de mama aumenta com a idade. Dados do banco de dados *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) mostram que a probabilidade de uma mulher desenvolver câncer de mama é: 2,1% do nascimento aos 49 anos; 2,4% de 50 a 59 anos; 3,5% de 60 a 69 anos; e 7,0% para 70 anos ou mais, resultando numa probabilidade cumulativa de 12,9% do nascimento até a morte (31).

Fatores de risco relacionados à história reprodutiva da mulher incluem nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia e idade avançada ao ter o primeiro filho. A menopausa tardia está associada a um risco relativo elevado de 2,9% de câncer de mama para cada ano de atraso em relação à idade média da menopausa natural. A idade média da menopausa aumentou de aproximadamente 49 anos em 1908 para 51,4 anos atualmente (30), (32).

Ainda em relação a fatores não modificáveis, é importante ressaltar a história familiar. Ter um parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama é considerado um fator de risco, mesmo na ausência de alterações genéticas conhecidas (30). Estima-se que cerca de 5% a 10% dos tumores malignos mamários estejam associados a genes de predisposição hereditária (25, 26). Os principais genes envolvidos são BRCA1, BRCA2, PALB2, TP53, PTEN, CDH1, CHEK2 e ATM. Esses cânceres hereditários frequentemente apresentam mutações de alta penetrância, podendo ser transmitidos verticalmente por meio de um dos pais e, muitas vezes, estão associados a outros tipos de tumores (33), (34).

Lesões proliferativas com atipias, como hiperplasia ductal atípica (HDA), hiperplasia lobular atípica (HLA) e carcinoma lobular in situ (CLIS), também estão associadas ao aumento do risco de câncer de mama, podendo elevar a probabilidade em 11,3% em 10 anos (35).

Considerando os fatores de risco modificáveis, o sobrepeso e a obesidade demonstram um risco significativo para mulheres, especialmente após a menopausa. Uma meta-análise indicou um aumento de 82% no risco relativo de câncer de mama para os receptores hormonais positivos nesse contexto, quando comparadas a pacientes com baixo índice de massa corporal (IMC) (36).

O consumo excessivo de álcool está associado a um aumento do risco de câncer de mama, possivelmente devido aos efeitos carcinogênicos dos metabólitos do álcool e à interferência no metabolismo do estrogênio, além de possíveis déficits nutricionais. O NCCN recomenda limitar o consumo de álcool a no máximo uma dose por dia e sugere a suplementação com ácido fólico para essas pacientes (30).

Com o aumento da expectativa de vida, a terapia de reposição hormonal mulheres na pós-menopausa passou a ser um grande aliado na qualidade de vida. No entanto, a exposição prolongada ao estrogênio e à progesterona está diretamente relacionada a um maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. O estudo WHI, que acompanhou os pacientes por 20 anos, constatou um aumento de 28% no risco entre usuárias de terapia hormonal combinada a longo prazo, mas sem impacto na mortalidade por câncer de mama (37).

Entre outros hábitos de vida, a prática regular de atividade física é considerada um fator protetor, evidenciando menores taxas de câncer de mama em mulheres ativas em comparação às sedentárias (38). A amamentação também entra nessa lista de atividades que diminuem a chance de desenvolver a doença, pois considerando a fisiologia celular mamária, as células só atingem o tipo IV após a mama se tornar lactante, sendo esse tipo celular o mais diferenciado e estável. Uma análise de 47 estudos epidemiológicos estimou que, para cada 12 meses de amamentação, o risco relativo para câncer de mama diminuiu cerca de 4,3% (39).

Além disso, a ooforectomia realizada antes dos 45 anos demonstrou, em um estudo prospectivo, uma redução de 10% na probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama (40).

5. Diagnóstico e rastreamento do câncer de mama

5.1 Exame clínico

O diagnóstico do câncer de mama fundamenta-se em critérios clínicos, imaginológicos e histopatológicos. O autoexame é o exame das mamas para o autoconhecimento e deve ser realizado pela própria mulher e deve ser incentivado preferencialmente do primeiro ao sétimo dia do ciclo menstrual. Apesar de não ter um impacto real na mortalidade pode, em alguns casos, detectar o câncer de mama (41).

A anamnese da paciente deve incluir a história clínica, comorbidades, cirurgias mamárias prévias, uso de medicamentos além da história familiar. O exame físico deve ser realizado por profissionais capacitados e abrange a inspeção estática e dinâmica, bem como palpação das mamas e das cadeias ganglionares adjacentes, incluindo supraclaviculares, infraclaviculares, mama interna e axilares (42), (43).

5.2 Métodos de imagem

O exame de imagem é o principal aliado no diagnóstico do câncer de mama. A mamografia é o método mais eficaz na detecção do câncer, com impacto significativo na redução da mortalidade, permitindo identificar a doença de um a quatro anos antes de se tornar clinicamente evidente. Por essa razão é utilizada como método de rastreamento, apresentando sensibilidade de 84,4% e especificidade de 90,8% (44). A mamografia digital com tomossíntese aumenta as taxas de detecção de câncer e o valor preditivo positivo do exame (45).

O ultrassom deve ser utilizado como um exame complementar e não como método de rastreamento, pois pode elevar o número de falsos positivos quando aplicado dessa forma (46). Quanto à ressonância magnética, não há evidências que justifiquem seu uso em pacientes de baixo risco. A adição desse exame ao rastreamento por mamografia aumenta a sensibilidade, mas reduz a especificidade, e deve ser reservado para pacientes de alto risco bem estabelecido (47).

O Brasil, assim como ocorre em outros países em desenvolvimento, apresenta incidência de câncer de mama em mulheres jovens entre 40 e 49 anos maior quando comparados com países desenvolvidos e o rastreamento nessa faixa etária pode reduzir mortalidade em até 25% (48), (49). Em relação à interrupção do rastreamento é fundamental considerar a expectativa de vida, doenças associadas e os riscos de mortalidade por câncer (50).

Para pacientes de baixo risco o rastreamento deve ser anual com mamografia a partir dos 40 anos. Para mulheres de alto risco recomenda-se iniciar 10 anos antes do membro mais jovem da família com diagnóstico de câncer de mama (ou aos 40 anos, se ocorrer primeiro) e, caso haja mutação em genes de alta penetrância comprovada, iniciar antes dos 30 anos, com rastreamento a cada 6 meses, intercalando mamografia (preferencialmente com tomossíntese) e ressonância magnética das mamas com

contraste. Se a combinação de métodos de alta complexidade não for viável o ultrassom deve ser considerado (51).

Os exames de imagem devem ser classificados conforme as categorias do BI-RADS: Categoria 0: Mamografia incompleta; necessita de avaliação adicional de imagem; Categoria 1: Negativa; Categoria 2: Benigna; Categoria 3: Provavelmente benigna; Categoria 4: Suspeita (4A: Baixa suspeita de malignidade, até 10% de chance de câncer; 4B: Moderada suspeita, 10-50% de chance; 4C: Alta suspeita, 50-90% de chance); Categoria 5: Altamente sugestiva de malignidade (maior que 95% de chance de câncer de mama); Categoria 6: Malignidade conhecida, comprovada por biópsia (52).

5.3 Biópsia de lesões mamária suspeitas

Quando uma lesão suspeita é identificada o próximo passo é realizar uma biópsia percutânea, que deve ser feita ambulatorialmente. A biópsia cirúrgica só deve ser considerada se houver impedimentos técnicos ou se resultados inconclusivos forem obtidos anteriormente (53).

Existem três tipos de biópsia: punção aspirativa por agulha fina (PAAF), biópsia por agulha grossa (core biopsy) e biópsia assistida a vácuo (VAB). A PAAF tem como objetivo a obtenção de material celular para exame citológico (54).

O Sistema IAC Yokohama classifica as lesões em cinco categorias, estratificadas de acordo com o risco de malignidade: insuficiente/inadequado, benigno, atípico, suspeito de malignidade e maligno (55). Quando o resultado indica algo diferente de benigno, a paciente deve ser submetida a uma investigação adicional, incluindo biópsia por agulha grossa. Porém, este método mantém sua relevância, pois a avaliação imediata proporciona um diagnóstico provisório, auxiliando na discussão com a paciente e contribuindo para redução da ansiedade (56).

O diagnóstico histopatológico é realizado a partir do material obtido por biópsia por agulha grossa, seja core biopsy ou biópsia assistida a vácuo (57). Geralmente é colocado um clipe metálico no local da coleta para marcar a área e facilitar um planejamento cirúrgico futuro (58).

Após a coleta o espécime é enviado para avaliação do patologista, que definirá o diagnóstico histopatológico e o perfil molecular do câncer de mama conforme descrito nas seções anteriores (59).

5.4. Estadiamento

O estadiamento no momento do diagnóstico é essencial para o planejamento do tratamento e para a estimativa do prognóstico da paciente. A ferramenta mais utilizada para estadiamento é a classificação TNM, desenvolvida pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) e pelo International Union for Cancer Control (UICC). Essa classificação avalia o tamanho do tumor primário (T), o comprometimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástases à distância (M) (Figura 6) (60).

Breast carcinoma TNM anatomic stage group AJCC UICC 8th edition

T (Tamanho)	N (Linfonodos)	M (Metástases)	Estadiamento
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Qualquer T	N3	M0	IIIC
Qualquer T	Qualquer N	M1	IV

Figura 6. Estadiamento no câncer de mama com base no tamanho do tumor, comprometimento linfonodal e status de comprometimento sistêmico (metástases) (60)

Além dessa classificação anatômica, o perfil imuno-histoquímico (21), o grau do tumor e testes de análise molecular também foram incorporados para melhorar o estadiamento clínico e patológico, aprimorando o prognóstico e direcionando de maneira mais assertiva o tratamento (anexo1: Figuras 17 e 18) (60).

6. Tratamento do câncer de mama

As pacientes com tumores em estadiamentos iniciais geralmente são tratados com cirurgia como primeira linha terapêutica, e o tratamento adjuvante é definido após o estadiamento patológico (pT pN). Mesmo em casos de tumores localmente avançados submetidos à quimioterapia neoadjuvante, o estadiamento patológico (ypT ypN) é importante para guiar a adjuvância após o tratamento cirúrgico. Essa classificação segue os mesmos critérios do estadiamento clínico (61).

Para pacientes com tumores com receptores hormonais positivos e HER2 negativos, a assinatura genômica do tumor pode ser utilizada para determinar a necessidade de quimioterapia adjuvante após a cirurgia. O Oncotype DX®, um painel de 21 genes analisados por RT-PCR no tecido tumoral classifica pacientes com um resultado do *recurrence score* (RS) abaixo de 11 como de baixo risco, não beneficiando a adjuvância quimioterápica, com taxa de sobrevida livre de recorrência de 99,3% em 5 anos para essas pacientes submetidas apenas à terapia endócrina adjuvante (62).

Outros painéis multigênicos, como MammaPrint, EndoPredict, PAM50 e Breast Cancer Index, devem ser utilizados de maneira individualizada para determinar a necessidade de adjuvância nesse contexto (63), (64).

Para pacientes com tumores HER2 positivos está estabelecido que aqueles com menos de 2 cm e axila negativa devem ser encaminhados para tratamento cirúrgico, seguidos de quimioterapia associada à terapia alvo, exceção feita aos tumores muito pequenos, com menos de 0,5 cm, que não requerem quimioterapia (65).

Para tumores maiores ou com comprometimento axilar a paciente deve receber quimioterapia neoadjuvante e o estadiamento patológico deve ser reavaliado após a terapia para determinar o esquema adjuvante adequado, uma vez que a resposta completa permite o uso exclusivo das drogas-alvo aplicadas na neoadjuvância, enquanto a falta de resposta pode indicar a necessidade de alteração do esquema até completar um ano de tratamento (66).

O ponto de corte para a indicação de cirurgia como primeira linha de tratamento é ainda mais restrito nos tumores triplo negativos. Para esses tumores, diâmetro superior a 1 cm, direciona a paciente para quimioterapia neoadjuvante, e o tratamento adjuvante subsequente será determinado com base na resposta obtida após a reavaliação pelo novo estadiamento patológico do tumor (67).

A abordagem cirúrgica é essencial no tratamento do câncer de mama não metastático. Inicialmente descrita em 1894 por William Halsted, a mastectomia radical demonstrou eficácia na redução das taxas de recorrência local (68). Com o tempo surgiram alternativas menos invasivas tanto na abordagem da mama quanto na axila. Em 1981 foi provado que a cirurgia conservadora, quando realizada com margens negativas e combinada com radioterapia na mama remanescente e linfadenectomia axilar, oferece resultados oncológicos equivalentes aos da mastectomia radical para tumores iniciais (69).

Essa abordagem é segura mesmo em tumores com característica molecular desfavorável, como os triplo negativos, permitindo a preservação mamária sempre que viável (70). A cirurgia conservadora deve ser a primeira opção cirúrgica, exceto em casos de contraindicações, como carcinoma inflamatório de mama, doença multicêntrica sem resultados estéticos satisfatórios após duas cirurgias conservadoras, microcalcificações malignas difusas, histórico prévio de radioterapia e primeiro trimestre gestacional (71).

A quimioterapia neoadjuvante é indicada para reduzir o tamanho dos tumores e aumentar as taxas de cirurgia conservadora, mesmo em tumores maiores (72). Estudos demonstraram que é possível realizar biópsia do linfonodo sentinela sem necessidade de linfadenectomia, inicialmente em pacientes com axila clinicamente negativa e, posteriormente, em pacientes com axila positiva que se tornaram negativas após a quimioterapia neoadjuvante (73), (74).

É importante destacar que, embora numerosos estudos tenham investigado os potenciais benefícios do tratamento cirúrgico em casos de câncer metastático, até o presente momento, não existem evidências científicas que sustentem essa abordagem terapêutica nesse contexto (75).

Para pacientes com perfil luminal a hormonioterapia adjuvante é imprescindível, com indicações baseadas no status hormonal da paciente. Para as de baixo risco o tamoxifeno isolado é a terapêutica indicada para mulheres com ciclos menstruais regulares, sem mostrar benefícios em relação à supressão ovariana (76), (77), (78). Para as que entram na menopausa durante o tratamento, com níveis elevados de FSH, recomenda-se a troca do tamoxifeno por inibidores de aromatase após dois anos de terapia (79). O tratamento para pacientes de baixo risco deve durar cinco anos, enquanto para pacientes de alto risco, é recomendado estender para sete a dez anos, independentemente do esquema utilizado (80), (81).

Nas pacientes na pós-menopausa os inibidores de aromatase mostraram ser mais eficazes do que o tamoxifeno, pois suprimem os níveis de estrogênio plasmático ao inibir a enzima aromatase, responsável pela conversão periférica de andrógenos em estrogênios (82).

Recentemente inibidores de ciclinas (CD4/6) foram introduzidos para pacientes selecionadas com tumores luminais de alto risco, no estudo MonarchE, independentemente do status hormonal da paciente, pré ou pós-menopausa, pacientes com quatro ou mais linfonodos positivos, ou um a três linfonodos positivos acompanhados de outros fatores, como doença de grau 3, tamanho do tumor ≥ 5 cm ou pontuação Ki-67 $\geq 20\%$ usaram abemaciclib com ganho de sobrevida (83).

O estudo Natalee, que usou como inibidor de ciclina o ribociclib na adjuvância dessas pacientes luminais, teve ganho de sobrevida livre de progressão, reafirmando que essa nova classe de medicamento é bastante promissora nas pacientes com receptores hormonais positivo (84).

O uso de trastuzumabe em pacientes com superexpressão de HER2 está associado a uma redução de 50% nas taxas de recorrência e de 30% na mortalidade, tornando sua inclusão obrigatória como terapia adjuvante ou neoadjuvante para esse subtipo tumoral (85).

Compreendendo os benefícios da resposta patológica completa (pCR) após quimioterapia neoadjuvante, estudos recentes buscaram associar terapias-alvo, como trastuzumabe e trastuzumabe com pertuzumabe, a esquemas de quimioterapia para otimizar os níveis de resposta (86), (87). Em casos de tumor residual após terapias-alvo, o uso de TDM-1 (trastuzumabe-entansine) pode reduzir a chance de recidiva à distância (66).

O trastuzumabe-deruxtecano (TDX-D) é um medicamento anticorpo-fármaco conjugado que combina um anticorpo monoclonal humanizado dirigido ao HER2 (trastuzumabe) com um potente inibidor da topoisomerase I, utilizado como agente citotóxico (payload). Este medicamento demonstrou atividade antitumoral promissora em uma população de pacientes que recebera múltiplos tratamentos no cenário metastático (88). Além disso, se tornou a escolha preferencial para pacientes em estadiamento IV com tumores HER 2 low (1+ ou 2+ com FISH negativo) que já foram tratadas com terapias convencionais e apresentaram progressão da doença após o tratamento (89).

Em relação ao tratamento clínico sistêmico a maioria dos protocolos inclui antraciclina e taxano (67). Antraciclina e ciclofosfamida (AC) são geralmente

administradas em um regime de "dose densa", a cada duas semanas, embora a aplicação a cada três semanas seja uma alternativa viável. É padrão que toda a quimioterapia planejada seja administrada antes da cirurgia definitiva, desde que não haja evidência de progressão da doença durante o tratamento (90), (91). A adição de um taxano está associada a maiores taxas de resposta, sendo o paclitaxel a escolha preferida entre os autores (92).

A radioterapia é uma ferramenta essencial no tratamento do câncer de mama. Os benefícios dessa terapia adjuvante foram demonstrados em vários estudos prospectivos e randomizados, os quais mostraram que não há diferença na sobrevida geral entre pacientes submetidas à cirurgia conservadora com radioterapia adjuvante e aquelas que realizaram mastectomia (93). Comparando pacientes que receberam radioterapia após cirurgia conservadora com aquelas que não a receberam, houve uma redução de até 50% nas taxas de recidiva local entre as pacientes que se submeteram a esse tratamento (94).

As doses de radioterapia variam de acordo com o tipo de tumor, características individuais de cada paciente e tipo de cirurgia. Tradicionalmente, utilizam-se de 25 a 33 frações diárias de 1,8 a 2 Gy; no entanto, esquemas de hipofracionamento, com doses de 2,6 a 6 Gy/dia em 15-16 frações, demonstraram resultados oncológicos e de toxicidade semelhantes, além do benefício de um tratamento mais curto (95), (96).

Recentemente o estudo FAST apresentou a discussão sobre um fracionamento ultrarrápido, demonstrando que esquemas de 50 Gy em 5 frações não foram inferiores aos esquemas convencionais em pacientes com tumores iniciais (97).

Outra abordagem envolve a radioterapia parcial da mama, fundamentada na observação de que a maioria das recorrências locais ocorre no quadrante afetado inicialmente. Isso pode ser realizado através de braquiterapia ou radioterapia intraoperatória. Mulheres com mais de 50 anos, tumores de até 2 cm e sem comprometimento linfonodal, além de receptor hormonal positivo, são elegíveis para essa modalidade (98).

Em pacientes submetidas à mastectomia é indicada a radioterapia em estadiamento localmente avançado, seja devido ao tamanho tumoral ou ao comprometimento axilar, abrangendo a área do plastrão e as regiões de drenagem linfática nodal (fossas supra e infraclavicular, mamária interna e axila) (94).

Fatores que indicam maior agressividade tumoral devem ser considerados na decisão sobre a radioterapia pós-mastectomia. A invasão vaso-linfática, a presença de carcinoma ductal *in situ* extenso, tumores com receptores hormonais negativos e/ou

HER2 positivo em 3+, grau indiferenciado, comprometimento linfonodal e pacientes na pré-menopausa devem ser avaliados individualmente para discutir os possíveis benefícios da radioterapia na redução do risco de recidiva locorregional (99).

Quando há comprometimento linfonodal, recomenda-se a radioterapia nas cadeias ganglionares se quatro ou mais linfonodos estiverem comprometidos, assim como em pacientes submetidas à cirurgia conservadora com qualquer comprometimento macroscópico dos linfonodos axilares (100) (101).

Para pacientes que passaram por quimioterapia neoadjuvante considera-se o estadiamento inicial para a indicação de radioterapia, exceto para aquelas que tiveram resposta patológica completa, que podem ser poupadas dessa terapia (102).

O tratamento eficaz do câncer de mama possibilita uma sobrevida prolongada com taxas que podem chegar a 90% em cinco anos, especialmente em estágios iniciais (103). Entretanto, muitas sobreviventes permanecem com risco de complicações decorrentes do tratamento prévio e de recidiva da doença, tanto local quanto sistêmica. Pacientes com doença axilar apresentam taxas de recidiva anual superior em comparação àquelas sem comprometimento nodal (104).

Qualquer estratégia de acompanhamento pós-tratamento do câncer de mama deve incluir a vigilância para recidivas, bem como a identificação e o manejo de sintomas físicos e psicológicos resultantes do tratamento e da doença. Além disso é fundamental promover um estilo de vida saudável. O seguimento clínico deve ser adaptado às necessidades individuais de cada paciente. As diretrizes da ASCO recomendam que a história clínica e o exame físico sejam realizados a cada três a seis meses durante os primeiros três anos após a terapia primária, a cada seis a doze meses nos dois anos seguintes e anualmente após cinco anos (105).

A mamografia deve ser realizada anualmente, tanto para a mama que passou por cirurgia conservadora pelo menos 6 meses após o término da radioterapia, quanto para a mama contralateral. Exames de imagem de rotina não são recomendados para mamas reconstruídas e a ressonância magnética deve ser utilizada apenas como exame adicional de investigação ou quando houver critérios de alto risco para novos tumores (105).

Não é aconselhável realizar rastreamento de metástases à distância por meio de exames laboratoriais ou de imagem em mulheres assintomáticas após o tratamento. As pacientes devem ser incentivadas a manter a vigilância e a terapia adjuvante prescrita, além de adotar um estilo de vida saudável que inclua atividade física regular, manutenção de um peso adequado e uma alimentação balanceada (106).

7. Câncer de Mama Triplo Negativo

Este estudo investigou biomarcadores moleculares no câncer de mama triplo-negativo (TNBC) e, portanto, será realizada uma revisão aprofundada deste tipo de tumor. TNBC refere-se a cânceres que não expressam o receptor de estrogênio (ER) e receptor de progesterona (PR), com índices inferiores a 1% na imuno-histoquímica, e não apresentam a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), exibindo expressão de 0 a 1+ ou hibridização negativa (FISH) para expressões de 2+ (107).

Esse tipo de câncer tende a ser mais agressivo do que outros e não possui tratamentos direcionados específicos, como a hormonioterapia para tumores luminais ou terapia anti-HER para aqueles que expressam HER2 3+. O TNBC representa aproximadamente 15% dos casos diagnosticados de câncer de mama em todo o mundo, sendo frequentemente observado em mulheres com menos de 40 anos (108).

Os fatores de risco associados ao TNBC incluem a mutação BRCA, presente em até 20% das pacientes, e um risco maior em mulheres afro-americanas em comparação com mulheres brancas (109), (110). A pré-menopausa também é um fator de risco relevante (108).

Clinicamente os tumores triplo-negativos apresentam crescimento rápido e se tornam palpáveis ao contrário dos tumores luminais, que são frequentemente diagnosticados por mamografia de rastreamento (111). O carcinoma medular, embora raro, é frequentemente triplo-negativo, mas o ductal infiltrante é a forma histológica mais comum, apresentando necrose tumoral, invasão vaso-linfática e resposta linfocitária (112). O estadiamento clínico no TNBC segue as mesmas diretrizes que os outros tipos de câncer de mama (60).

Devido à sua heterogeneidade patológica o fenótipo molecular basal (basal-like) é frequentemente usado para representá-lo, correspondendo a 77% dos casos (113). Outros subtipos incluem o receptor de andrógeno luminal, mesenquimal, imunossuprimido basal e imunoativado basal (114). Para compreender o TNBC basal, é importante conhecer seu "cluster" único de genes, que inclui o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, ou HER1), citoqueratinas basais 5/6, c-Kit, um cluster de proliferação e baixa expressão dos genes relacionados aos receptores hormonais e HER2 (112).

Essas características contribuem para o comportamento geralmente agressivo do TNBC, razão pela qual a terapia sistêmica com quimioterapia é recomendada em quase todos os estágios, exceto para o tumor T1a e T1b, cuja indicação deve ser discutida individualmente. Tumores com diâmetro $\leq 1,0$ cm têm prognóstico favorável, de forma que o benefício da quimioterapia frequentemente não supera os riscos na maioria dos casos (115).

As opções de quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante para pacientes com TNBC são semelhantes às abordagens utilizadas em outros fenótipos de câncer de mama, incluindo princípios para o tratamento cirúrgico e opções de radioterapia. Contudo, existem particularidades que podem impactar significativamente o manejo clínico (116).

A quimioterapia neoadjuvante é a abordagem preferencial para pacientes com tumores triplo negativos (TNBC) localmente avançados, uma vez que as pacientes que atingem a resposta patológica completa (pCR) apresentam melhorias na sobrevida livre de doença. Além de reduzir o risco de recorrência à distância, essa estratégia fornece informações valiosas sobre a resposta ao tratamento e pode facilitar uma abordagem cirúrgica menos invasiva (117).

Para os estadiamentos II e III, as diretrizes do estudo KEYNOTE-522 sugerem a administração de paclitaxel, carboplatina e pembrolizumabe, seguidos por antraciclina e ciclofosfamida com pembrolizumabe (118) (119). Neste estudo 1.174 pacientes com TNBC em estágios II e III, que não haviam sido tratados anteriormente, receberam paclitaxel semanal em combinação com carboplatina, seguidas de esquema de AC (a frequência de administração de carboplatina e a escolha da antraciclina ficaram a critério do médico). As pacientes foram randomizadas para receber pembrolizumabe ou placebo simultaneamente com a quimioterapia neoadjuvante, e, após a cirurgia, continuaram o tratamento designado por mais nove ciclos (27 semanas). A sobrevida livre de eventos em 36 meses foi de 84,5% no grupo pembrolizumabe-quimioterapia e 76,8% no grupo placebo-quimioterapia (120).

A incidência de eventos adversos de grau >3 foi ligeiramente maior no grupo tratado com pembrolizumabe em comparação ao grupo placebo (82% versus 79%). Com base nesses resultados, a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA aprovou o uso de pembrolizumabe como tratamento neoadjuvante para TNBC em julho de 2021 (121).

Pacientes que iniciaram o tratamento com pembrolizumabe na fase neoadjuvante devem continuar a terapia no cenário adjuvante, independentemente de terem alcançado

a pCR. No entanto, o medicamento não deve ser oferecido a pacientes que completaram a quimioterapia neoadjuvante sem pembrolizumabe (122), (123).

Dados atualizados do KEYNOTE-522 demonstraram ganho de sobrevida global de 86,6% x 81,7% em 60 meses favorecendo o uso de pembrolizumabe em pacientes com câncer de mama triplo-negativo em estadiamento inicial, dado importante para o avanço das perspectivas de tratamento nesse cenário (124).

Para pacientes com contraindicação a antraciclina, os resultados do estudo NeoPACT indicam o uso de um taxano em combinação com carboplatina e pembrolizumabe (125). Conforme mencionado, a carboplatina deve ser utilizada na neoadjuvância para esses estadiamentos, pois melhora as taxas de pCR e SLD. Pacientes portadoras de mutações no gene BRCA apresentam um benefício ainda maior (126), (127).

No cenário adjuvante, paciente com variantes patogênicas de BRCA apresentam respostas favoráveis ao tratamento com inibidores da enzima da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), como o olaparibe. A administração oral desse fármaco, duas vezes ao dia durante um ano, resultou em uma sobrevida livre de doença de 85% em comparação a 77% no grupo placebo ao longo de três anos (128). Por outro lado, em pacientes sem mutações genéticas, o uso de capecitabina após quimioterapia neoadjuvante, nos casos que não houve pCR, resultou em um aumento na sobrevida livre de doença de 74% em comparação a 67% no grupo placebo, além de um ganho na sobrevida global de 89% contra 83%, conforme evidenciado no estudo CREATE-X (129).

Para elaborar o prognóstico desses tumores é fundamental reconhecer que o risco de recorrência à distância e de mortalidade atinge seu ápice cerca de três anos após o diagnóstico, diminuindo rapidamente em seguida (117). Quando ocorre recidiva, preferencialmente é locorregional; se ocorrer à distância, os locais mais comuns são órgãos viscerais como fígado e pulmão, ao contrário dos tumores luminais, que geralmente recidivam em tecidos ósseos (130). A recidiva no sistema nervoso central acontece mais frequentemente em comparação a outros subtipos tumorais apresentando, nesses casos, uma sobrevida mediana inferior a seis meses (131).

O seguimento das pacientes deve se assemelhar ao de outros subtipos moleculares de câncer de mama, com a realização de história clínica e exame físico a cada três a seis meses nos primeiros três anos, seguido por avaliações a cada seis a doze meses (132). A mamografia deve ser realizada anualmente, tanto para detectar recorrências locais em

mulheres que passaram por cirurgia conservadora quanto para rastrear lesões na mama contralateral, sendo descontinuada apenas quando a expectativa de vida for inferior a cinco a dez anos (133), (134).

A inclusão de outros exames de imagem deve ser individualizada e é fundamental que essa abordagem seja discutida entre a equipe médica e o paciente, a fim de garantir que as melhores alternativas sejam escolhidas para cada caso específico. A inclusão da ultrassonografia na avaliação pode proporcionar benefícios limitados, especialmente em relação ao aumento da taxa de falsos positivos (135). A ressonância magnética da mama deve ser recomendada para mulheres que se submeteram a terapia conservadora e que apresentam alto risco de desenvolver um segundo tumor primário, definido como risco vitalício $> 20\%$. Isso é particularmente aplicável em casos de mutações genéticas conhecidas associadas ao câncer de mama; ou quando os resultados exames menos complexos se mostraram inconclusivos (136).

Para pacientes com doença metastática a quimioterapia é o tratamento principal para tumores triplo negativos, sendo essencial realizar biópsia do sítio para verificar possível discordância nos marcadores entre a doença primária e a metástase (137). Todas as pacientes devem ser testadas para mutações genéticas uma vez que o tratamento depende dessas informações no cenário metastático. Se não houver mutação de BRCA a pontuação de PD-L1 deve ser avaliada; se for menor que 10 (<10) a quimioterapia deve ser preferencialmente baseada em platina (138). Para pontuações de PD-L1 igual ou superior a 10 (≥ 10), deve-se associar pembrolizumabe à quimioterapia, preferencialmente na primeira linha de tratamento. O estudo KEYNOTE 355 demonstrou uma melhora na sobrevida livre de progressão (SLP) de 9,7 meses em comparação a 5,6 meses sem o uso do medicamento (139).

Em pacientes com mutação de BRCA da linha germinativa que já foram expostas à quimioterapia previamente o uso de inibidores de PARP se destaca. No estudo OlympiAD essas pacientes que usaram olaparibe apresentaram 57% mais benefício em sobrevida livre de progressão (SLP) em comparação às que receberam apenas quimioterapia (140). Similarmente, o estudo EMBRAC evidenciou uma redução de 46% no risco de progressão com talazoparib, oferecendo mais uma opção de tratamento dentro dessa classe de medicamentos (141). Esses medicamentos inibem a PARP-1, o membro mais abundante da família PARP, levando à quebra da fita dupla do DNA, que normalmente é reparada pela recombinação homóloga dependente da via BRCA (142).

Recentemente a investigação da presença da proteína HER2 em tumores metastáticos, mesmo em quantidades mínimas (1+ ou 2+ com FISH negativo), tornou-se essencial em tumores anteriormente considerados HER2 negativos, para identificar a variação denominada “HER2 Low.”. Essa variação se beneficia do tratamento com o anticorpo-droga conjugado trastuzumab-deruxtecano (TDX-D), mostrando melhorias na sobrevida livre de progressão, com taxas de 10,1 meses em comparação a 5,4 meses no grupo que não utilizou essa estratégia (89).

Outra inovação recente é o uso de medicamentos que se ligam à proteína TROP-2. O sacituzumab-govitecan foi aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes com TNBC metastático que já haviam recebido pelo menos duas terapias anteriores, alcançando uma sobrevida global de 12,1 meses em comparação a 6,7 meses em pacientes que utilizaram outras terapias (143).

Considerando a complexidade e a diversidade dos subtipos de tumor de mama, bem como o impacto significativo dessa variação no diagnóstico, prognóstico e planejamento terapêutico, a utilização de biomarcadores tumorais tem ganhado notável relevância no campo da oncologia mamária. Esses biomarcadores não apenas permitem uma caracterização mais precisa das neoplasias, mas também orientam decisões clínicas, possibilitando abordagens terapêuticas mais personalizadas e eficazes para os paciente (10).

8. Biomarcadores

Quanto aos biomarcadores aplicados ao tumor mamário, o presente estudo se concentrou em um grupo já bem estabelecido: os infiltrados tumorais linfocitários (TILs). É fundamental esclarecer as técnicas laboratoriais utilizadas para a identificação de TILs nas amostras tumorais, bem como a busca por outras moléculas inovadoras que possam informar sobre a presença de TILs nessas mesmas amostras de câncer de mama. De forma sintética, os TILs desempenham um papel crítico no diagnóstico e tratamento dos tumores mamários triplo-negativos, servindo como indicadores relevantes da resposta imunológica do organismo ao tumor (144).

A presença elevada de TILs está associada a um prognóstico mais favorável e a uma maior taxa de resposta a tratamentos imunoterápicos e quimioterápicos, refletindo uma atividade imune antitumoral mais robusta. Assim, a análise dos TILs pode contribuir para a estratificação de pacientes, auxiliando na tomada de decisões terapêuticas mais

eficazes e personalizadas e servindo também como um potencial biomarcador prognóstico no gerenciamento desses cânceres agressivos (145).

8.1 Infiltrados Linfocitários Tumorais (TILs)

O comportamento biológico do tumor é influenciado tanto por suas características intrínsecas quanto pelo microambiente tumoral, que interage com a neoplasia. Esse ambiente é composto por diversas estruturas e substâncias, como vasos, fibroblastos, miofibroblastos e células inflamatórias (146).

Alterações genéticas que levam à malignidade são comuns em células somáticas, e o sistema imunológico desempenha um papel crucial na eliminação ou inativação dessas células. Estudos com camundongos demonstraram um aumento na incidência de neoplasias malignas em indivíduos imunodeficientes, evidenciando a importância da imunidade na prevenção do câncer (147).

Os infiltrados linfocitários tumorais (TILs) foram o foco central deste estudo e são usados para a classificação dos tumores. Esses linfócitos são agentes dinamicamente engajados nas interações entre o sistema imunológico e a neoplasia, desempenhando papéis que podem ser tanto favoráveis quanto prejudiciais ao tumor (148).

Os TILs são compostos por linfócitos B, linfócitos T e células natural Killer (NK), que ao reconhecer o tumor como antígeno migram para o estroma tumoral no intuito de combatê-lo (149). Esse processo se divide em três fases: eliminação, equilíbrio e evasão, que são os pontos chave da teoria de imunoedição e ampliam o conceito de imunovigilância (150).

A fase de eliminação ocorre quando antígenos tumorais são apresentados ao sistema imunológico. Nessa fase há predomínio do linfócitos T citotóxicos (CD8), linfócitos T reguladores (CD4), linfócitos TCD3, entre outras células T (151); células natural killers (NK) e macrófagos na identificação de antígenos. As células NK, em particular, visam células tumorais que conseguiram escapar do controle dos linfócitos citotóxicos (152).

A proteína FOXP3 desempenha um papel crítico na geração de células T CD4, que promovem a imunossupressão, resultando em tolerância imunológica. O aumento excessivo da expressão de FOXP3 está associado à proliferação desses Tregs (TCD4) e à imunodeficiência grave, enquanto a sua ausência pode levar à ativação do sistema imunológico. Por isso alguns estudos mostram que a FOXP3 também está envolvida em

mecanismos de escape imunológico, com impactos tanto na baixa sobrevida quanto na melhoria da sobrevida no câncer de mama (153).

Após essa infiltração abundante de linfócitos no estroma tumoral, ocorre a fase de equilíbrio, que quando acontece de maneira efetiva, o microambiente tumoral apresenta uma alta proporção de células citotóxicas e uma baixa proporção de células T reguladoras, devido à diminuição da proteína FOXP3, permitindo a progressão para a próxima fase (154).

A terceira etapa do processo é a evasão do sistema imune, que pode ocorrer por vários mecanismos: a redução do reconhecimento imunológico devido à perda de antígenos nas células neoplásicas; o aumento da resistência ou sobrevida celular, reduzindo a apoptose por meio da ativação de proteínas STAT3 ou BCL-2; e o desenvolvimento de um microambiente imunossupressor. Este último envolve a expressão de várias citocinas (VEGF, IL-10, TGF- β) e moléculas imunoreguladoras, incluindo a família B7 (PD-1/PD-L1, CTLA-4, VISTA, B7-H4, BTLA). Quando esse processo é concluído as células tumorais conseguem se proliferar, uma vez que as células do sistema imune não foram efetivas na apoptose desse antígeno (150).

No início do processo as células tumorais são apresentadas aos linfócitos T por células dendríticas, em combinação com moléculas de antígeno leucocitário humano para reconhecimento pelo receptor de células T (TCR) (sinal 1) (151). A ativação das células T requer a interação entre moléculas coestimuladoras de superfície, como B7 e CD28, em células apresentadoras de antígeno e células T, respectivamente (sinal 2). Para que a ativação ideal das células T ocorra é essencial a presença de ambos os sinais 1 e 2 (155). A estimulação por peptídeos antigênicos (sinal 1) sem a coestimulação (sinal 2) não promove a ativação completa das células T, resultando em tolerância e perpetuação da célula tumoral (156).

O grau de ativação das células T é determinado pelo equilíbrio entre coestimulação e cossupressão. O entendimento dos fenômenos associados à evasão imunológica, por meio da composição celular e da expressão das moléculas que regulam o sistema imunológico, amplia as possibilidades de avaliação prognóstica e de tratamentos imunoterápicos. O bloqueio da via PD-1/PD-L1 tem demonstrado benefícios em diversas neoplasias, incluindo carcinomas mamários triplo-negativos (139), (157).

Além da regulação intrínseca das células T, sua ativação pode ser influenciada por fatores extrínsecos. Citocinas como IL-2, liberadas pelas células T auxiliares CD4 (Th1 e Th17), desempenham um papel direto na promoção da ampliação das células T

específicas do câncer (158). No entanto, essas células reguladoras podem inibir a função das células T específicas, induzindo a imunossupressão e, consequentemente, reduzindo a eficácia da imunoterapia (159), (160).

A maioria dos TILs no câncer é do fenótipo de célula T, incluindo linfócitos CD4 (células auxiliares) e CD8 (células citotóxicas) e linfócitos TCD3. (161). Análises de microambiente tumoral com alta densidade de CD3 mostraram maior sobrevida global, implicando a essa célula T relação de bom prognóstico quando expressa em tumores de mama, principalmente no subtipo triplo negativo (162).

São considerados carcinomas mamários ricos em infiltrados inflamatórios aqueles que apresentam alta densidade de linfócitos no estroma tumoral, conforme orientações do TILs Working Group (163). Estudos mostram que, nesse contexto, os TNBC estão associados a uma maior sobrevida livre de progressão (SLP) e até mesmo a uma melhor sobrevida global (SG). Em uma meta-análise abrangente, que incluiu mais de 22.000 pacientes, a presença de linfócitos TCD8 correlacionou-se com prognóstico favorável, enquanto a expressão de FOXP3 foi associada a índices menores de sobrevida geral e livre de progressão (144).

Ao investigar tumores submetidos à quimioterapia neoadjuvante observou-se que uma alta quantidade de TILs favoreceu a obtenção de respostas patológicas completas (164). Um estudo envolvendo 3.771 pacientes com diferentes subtipos moleculares de câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante classificou a expressão de TILs em três categorias: baixos (0–10%), intermediários (11–59%) e altos (60–100%). Constatou-se que, entre as pacientes luminais, a pCR ocorreu em 45 (6%) de 759 pacientes com TILs baixos, 48 (11%) de 435 com TILs intermediários e 49 (28%) de 172 com TILs altos. No subtipo HER2-positivo, a pCR foi observada em 194 (32%) de 605 pacientes com TILs baixos, 198 (39%) de 512 com TILs intermediários e 127 (48%) de 262 com TILs altos. Os resultados foram ainda mais encorajadores entre as pacientes com TNBC, onde a pCR foi alcançada em 80 (31%) de 260 pacientes com TILs baixos, 117 (31%) de 373 com TILs intermediários e 136 (50%) de 273 com TILs altos ($p < 0,0001$). Em análise univariável, um aumento de 10% em TILs demonstrou uma razão de risco (HR) de 0,93 na sobrevida livre de doença (SLD) e de 0,92 na sobrevida global nos TNBC, apresentando resultados negativos em outros subtipos tumorais (165).

Um estudo bem recente com 1.966 pacientes com câncer de mama triplo negativo (TNBC) revelou uma taxa de 94% de sobrevida livre de recorrência (SLR) e 95% de sobrevida global (SG) em pacientes no estadiamento I com TILs igual ou superior a 50%.

Em contraste, entre as pacientes com TILs inferiores a 30%, as taxas de SLR e SG foram de 78% e 82%, respectivamente, em mulheres que não foram submetidas à terapia neoadjuvante. Esses resultados confirmam a abundância de TILs no tecido como um fator prognóstico significativo para pacientes com TNBC em estágios iniciais (166).

Dado que altas concentrações de TILs em tumores TNBC estão associadas a um melhor prognóstico, é crucial investigar os fatores que contribuem para essa situação em alguns tumores e não em outros (124). Perguntas permanecem: quais fatores podem indicar o enriquecimento de infiltrados inflamatórios no tumor? Existe uma associação direta ou inversa com determinados microRNAs? Existem lacunas na literatura que precisam ser exploradas, e é fundamental identificar marcadores que possam prever a presença de TILs no câncer de mama, especialmente em tumores mais agressivos, para prever possíveis respostas terapêuticas e avanços prognósticos.

8.2. MicroRNAs (miRNA)

8.2.1 Biologia e expressão de microRNAs em tumores mamários

A base genética do câncer é constituída por variantes específicas dentro dos genes e pelo DNA não codificante. Embora a maioria das sequências genéticas seja herdada, a expressão dos genes é desencadeada por interações com sinais ambientais, geralmente de maneira específica para o tipo celular e o momento, levando à síntese de proteínas específicas. O RNA mensageiro (mRNA) serve como a ponte funcional entre o DNA e as proteínas, e as alterações no mRNA podem atuar como marcadores da ativação (expressão) ou inibição (repressão) de genes específicos (167).

O mRNA representa aproximadamente 1% do RNA total em uma célula, sendo transcrito de cerca de 20.000 a 25.000 genes codificadores de proteínas no genoma humano (168). Em resposta a distúrbios celulares ocorrem mudanças na expressão gênica que podem influenciar o modo como uma doença se manifesta clinicamente em indivíduos predispostos, além de determinar como a doença responderá a tratamentos específicos (169).

Além do mRNA existem várias outras classes de RNA que não são traduzidas em proteínas, mas que desempenham funções celulares importantes. Os RNAs não codificantes (ncRNAs) tem funções regulatórias e podem assumir papéis críticos na patogênese de doenças humanas quando sua expressão está desregulada. Dentre esses

RNAs destacam-se os microRNAs (miRNAs), os RNA circulares (circRNAs) e RNAs não codificantes longos (lncRNAs) (170), (171).

No campo da oncologia diversos microRNAs (miRNAs) têm sido identificados como desregulados em tumores sólidos e hematológicos. Uma revisão sistemática de 2012 examinou a associação de vários miRNAs com o prognóstico em diversos tipos de câncer (172).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores, altamente conservados, com tamanho de 19 a 25 nucleotídeos. Eles desempenham papéis importantes no desenvolvimento, diferenciação e envelhecimento celular, além de estarem relacionados à fisiopatologia de doenças tumorais. O mecanismo de ação dos miRNAs envolve o silenciamento do mRNA em nível pós-transcricional, que ocorre por meio da degradação do mRNA ou na inibição de sua tradução nos ribossomos (173).

O processamento dos miRNAs ocorre em duas etapas, tanto no núcleo quanto no citoplasma. Os transcritos primários (pri-miRNAs) são processados pela enzima Drosha, levando à formação do pré-miRNA. Em alguns casos, como os mirtrons, os miRNAs são emendados como íntrons e processados como pré-miRNAs, contornando a clivagem mediada por Drosha. Eles são, então, transferidos do núcleo para o citoplasma pela exportina-5 e submetidos ao processamento adicional pela enzima Dicer, resultando na formação do duplex miRNA. Este é desenrolado em uma fita guia e empacotado no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que afeta a estabilidade ou leva à degradação do mRNA (174).

Estudos mostram que as assinaturas de miRNAs podem identificar linhagens de desenvolvimento e estados de diferenciação de diferentes tumores com mais precisão do que perfis de mRNA, discriminando tumores e suas características prognósticas (175).

A instabilidade genômica permite que as células tumorais adquiram características vantajosas em relação às células normais, incluindo autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios, evasão da apoptose, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástases (176). Essa instabilidade também influencia a expressão de microRNAs, prejudicando vias essenciais na iniciação e progressão do tumor. Por sua vez, os microRNAs podem induzir diferentes formas de instabilidade genômica, controlando quebras de fita dupla (DSBs) de DNA e reparo de incompatibilidade, além de afetar o fenótipo de metilação (173).

Nas leucemias linfocíticas crônicas de células B a associação dos microRNAs miR-15 e miR-16-1, localizados no cromossomo 13q14, foi identificada como correlacionada à instabilidade cromossômica em mais de 50% dos casos analisados (177).

Vários microRNAs, como o miR-21, miR-155 e membros do cluster miR-17-92, foram encontrados regulados positivamente em alguns tipos de câncer, sugerindo um envolvimento geral na carcinogênese humana. No câncer de pulmão o cluster miR-17-92 foi regulado positivamente, enquanto o miR-155 foi regulado negativamente (178).

O primeiro banco de dados de sequências de microRNAs continha 506 entradas para seis organismos em 2002, e em 2010, esse número aumentou para 1.424 descrições em humanos. É importante ressaltar que alguns microRNAs podem ser descartados devido a classificações errôneas, resultantes de altas similaridades de sequência entre os miRNAs pré-processados e as variantes menores entre eles (172).

A influência dos microRNAs foi identificada em todos os tipos de câncer de mama. Alguns participam da modulação do receptor de estrogênio (ER), incluindo miR-21, miR-18a/b, miR-193, miR-302, miR-92, let-7, miR-22, miR-221-222, miR-449a/b e miR-17-92. Outros regulam a proteína HER2, sendo influenciados pelo miR-125a/b (179).

O primeiro estudo que avaliou o status dos microRNAs em tecidos de câncer de mama analisou 76 amostras de tumores e identificou 29 microRNAs expressos diferencialmente em relação ao tecido normal, incluindo miR-10b, miR-125b, miR-145, miR-21 e miR-155, este último, que objeto do presente estudo, o mais consistentemente desregulado (180).

Outro estudo revelou que a expressão de miR-342 foi maior em tumores ER e HER2 positivos e menor em tumores triplo-negativos, enquanto o miR-520g estava elevado em tumores HR-negativos (181). Uma publicação que analisou 309 microRNAs em 93 tumores de mama identificou 31 microRNAs associados a melhores fatores prognósticos, como grau histológico 1 e características ER+. Destaque-se que miR-155 foi superexpresso em tumores de mama em comparação com controles normais, apresentando maior prevalência em tumores ER negativos em relação aos ER positivos (182).

O microRNA miR-21 é um microRNA amplamente estudado, associado a características tumorais agressivas, como estágio clínico avançado, alto grau tumoral e status de receptor hormonal negativo (HR). O fator de crescimento transformador beta

(TGF- β) regula positivamente a expressão do miR-21, e essa elevada expressão é frequentemente observada no câncer de mama (183).

A superexpressão dos microRNAs miR-200b-3p e miR-190a tem sido relacionada à quimiossensibilidade, associando-se à resposta patológica completa (pCR) em pacientes com TNBC (184). Altos níveis de miR-621 também estão correlacionados a uma melhor resposta à terapia neoadjuvante com paclitaxel/carboplatina em pacientes com câncer de mama. FBXO11 é identificado como um alvo funcional direto do miR-621, com regulação negativa entre eles, pois a expressão do gene FBXO11 atenuou o aumento da apoptose em células de câncer de mama com superexpressão de miR-621 após tratamento quimioterápico (185).

Em tumores triplo-negativos a expressão de 754 microRNAs foi analisada em 10 pacientes que alcançaram resposta patológica completa (pCR) e em 8 que não apresentaram pCR. A análise revelou que a expressão diferencial de miR-30a, miR-9-3p, miR-770 e miR-143-5p está associada a uma maior sobrevida livre de doença (SLD) (186).

Evidências demonstram o papel dos microRNAs na iniciação e progressão de tumores humanos. Eles podem atuar como oncogenes, como os miR-10b, miR-103/107 e miR-30d, ou como supressores tumorais, como miR-31, miR-29 e miR-200 (187). O microRNA miR-7, por exemplo, foi descrito como um inibidor da expressão do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) em células de glioblastoma, câncer de mama e câncer de próstata (188).

A literatura indica que a expressão de miR-320 é regulada negativamente tanto no plasma quanto no tecido tumoral de pacientes com câncer de mama; análises de sobrevida associaram essa regulação a um pior prognóstico (189). Além disso, miR-320 pode inibir a capacidade de invasão e migração das células de câncer de mama *in vitro*, enquanto seu silenciamento potencializa esses processos (190).

8.2.2 MicroRNA 155 (miR155) e oncologia mamária

A identificação de marcadores que possam prever o câncer ou facilitar o diagnóstico precoce é uma busca constante na literatura, visando aumentar as chances de sucesso nas terapias (191). Uma estratégia emergente envolve a análise de assinaturas moleculares no tecido normal antes da manifestação de sinais clínicos da doença. No câncer de mama evidências consistentes mostram que microRNAs estão desregulados em

amostras de tecido e soro/plasma, desempenhando papéis cruciais nos estágios iniciais do desenvolvimento e progressão da doença, bem como modulando a expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumor a nível pós-transcricional (192).

Alguns miRNAs, regulados negativamente em casos de hiperplasia ductal atípica (HDA), são regulados positivamente em carcinoma ductal infiltrante (CDI) (193). Estudos demonstraram a elevação dos níveis de miR-155, que é o alvo em investigação de estudo no presente projeto, assim como miR-19a, miR-181b e miR-24. Todos esses microRNAs são conhecidos por inibir genes supressores de tumor, em carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasivo em comparação ao tecido normal e à HDA em amostras de soro (194).

A interrupção da expressão desses microRNAs pode desencadear uma série de disfunções celulares, incluindo alterações no ciclo celular e crescimento tumoral descontrolado (195). O microRNA miR-155 está associado à regulação da resposta imune e à inflamação, processos intimamente ligados à progressão do câncer (196). Um painel de miRNAs, que inclui miR-21 e miR-155, revelou níveis plasmáticos elevados em pacientes com câncer de mama não metastático antes do início do tratamento, com redução significativa nos níveis após a terapia. Esses achados sugerem o potencial desses microRNAs como biomarcadores tanto para diagnóstico como para monitoramento da resposta terapêutica (197).

A busca por biomarcadores no câncer de mama triplo negativo tem incentivado estudos que relacionam microRNAs a possíveis alvos terapêuticos, enriquecendo o conhecimento sobre a biologia tumoral. Dados indicam que o miR-155 regula a proliferação celular em parte pela manutenção do metabolismo da tiamina em tumores triplo negativos (198, 199).

Para investigar a função de um microRNA específico em fenótipos celulares de interesse podem ser utilizados oligonucleotídeos inibidores, que são sequências de RNA que se ligam a sequências complementares presentes no microRNA de interesse por meio de pontes de hidrogênio, assim impedindo sua função. Essa abordagem é fundamental para avaliar o impacto do microRNA sobre processos celulares, como expressão gênica, diferenciação e apoptose. Nesse contexto, a técnica antisense foi empregada para inibir a expressão de miR-155 *in vitro*. E ensaios de apoptose demonstraram que o oligonucleotídeo antisense para miR-155 (miR-155 ASO) induz a apoptose celular em células HS578T. Considerando-se que o silenciamento de miR-155 induziu morte celular,

pode-se propor que esse microRNA desempenha papel crucial na viabilidade das células tumorais (200).

Uma publicação de 2020 identificou níveis circulantes de miR-155 significativamente maiores em pacientes com câncer de mama do que em indivíduos saudáveis. Além disso, os níveis de miR-155 diminuíram após o tratamento, sendo mais elevados em tumores com mais de 5 cm (T3). Isso sugere que o miR-155 circulante pode ser um marcador útil para monitoramento terapêutico no câncer de mama (201), além de estar associado à recorrência tumoral em estágios iniciais (202).

No contexto metastático há a hipótese de que os exossomos, vesículas nanométricas que transportam diversas cargas, incluindo microRNAs (miRNAs), possam transferir o fenótipo canceroso para células distantes, tanto em tecidos saudáveis quanto patológicos. Estudos demonstraram que os miRNAs miR-9 e miR-155, que é o foco do presente estudo, estão enriquecidos em exossomos provenientes de câncer de mama metastático. Além de seu potencial uso como biomarcadores na chamada biópsia líquida, é importante destacar que essa transferência de miRNAs por meio de exossomos pode desempenhar um papel crucial na comunicação intercelular e na promoção da progressão tumoral (203).

Essa teoria apoia a associação do miR-155 com a quimiorresistência, uma vez que sua presença foi identificada em exossomos isolados de células-tronco cancerígenas e células resistentes (204).

Uma revisão sistemática que analisou 28 estudos elegíveis revelou que a superexpressão de miR-155 apresenta correlação positiva com o grau do tumor e seu estadiamento (205).

Após agregar tantas informações observamos que os TILs desempenham um papel crucial na resposta ao tratamento de tumores malignos de mama, especialmente em casos de câncer de mama triplo-negativo (TNBC), influenciando positivamente a sobrevida global quando expressos em grandes quantidades no tecido tumoral (166).

Somado a isso, é descrito que microRNAs podem induzir instabilidade genômica, favorecendo o desenvolvimento de células tumorais (173), e diferentes microRNAs atuam de maneiras variadas em diversos tipos de tumores, podendo ser superexpressos ou regulados negativamente em diferentes tecidos, e ainda assim funcionam como biomarcadores que impactam as análises do desenvolvimento tumoral (178).

Notavelmente o microRNA miR-155 foi associado à regulação da resposta imune e à inflamação, processos que estão intimamente ligados à progressão do câncer (196).

Considerando esses dados surgiu o interesse em investigar a relação entre o miR-155 e a expressão de TILs em tumores de mama triplo-negativos.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Investigar infiltrados linfocitários tumorais (TILs) em amostras teciduais de biopsias de tumores de mama triplo-negativos (TNBC) e sua correlação com fenótipos clínicos e a expressão de miR-155.

2. Objetivos específicos

- A. Identificar o perfil epidemiológico de uma subpopulação brasileira com TNBC;
- B. Determinar a presença de TILs em amostras de tecido tumoral de pacientes com TNBC e examinar a sua correlação com fenótipos clínicos de interesse;
- C. Definir um ponto de corte para expressão de TILs nas amostras da população em estudo, estabelecendo um valor de cut-off que permita classificar as amostras em grupos de alta e baixa expressão de infiltrados linfocitários;
- D. Analisar o desempenho de CD3, CD4/CD8 e FoxP3 como biomarcadores preditores de TILs em biópsias e peças cirúrgicas de TNBC;
- E. Examinar se a expressão de miR-155 isoladamente ou em associação a CD3 tem acurácia para identificar biópsias tumorais com alto grau de infiltração linfocitária, ou seja, com alto percentual de TILs.

III. METODOLOGIA

Este é um estudo retrospectivo realizado por meio de um desenho de corte transversal. Foram utilizadas amostras de tecidos tumorais fixados em formol e embebidos em parafina (FFPE), coletadas no diagnóstico inicial (biópsia) e após a quimioterapia neoadjuvante, provenientes de peças cirúrgicas (mastectomia ou cirurgia conservadora) de pacientes do sexo feminino diagnosticadas com câncer de mama do subtipo triplo-negativo (TNBC), atendidas no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF) e no Centro de Câncer de Brasília (CETTRO).

As amostras incluíram 37 pacientes diagnosticadas com TNBC, identificadas por exame de imunohistoquímica entre 01/2016 e 01/2024. Dados sobre a caracterização da doença e evolução clínica foram analisados, assim como amostras biológicas para análises moleculares.

Esses dados foram examinados para identificar possíveis associações entre a expressão de infiltrados linfocitários tumorais (TILs) e marcadores tumorais, como FOXP3, CD4/CD8 e CD3, por meio de imuno-histoquímica, além do nível de expressão do miR-155 avaliado por RT-qPCR.

1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídas pacientes do sexo feminino diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo em estágios I a III, com idade superior a 18 anos durante o período estabelecido. Excluíram-se pacientes com discordâncias nas análises de imuno-histoquímica entre a biópsia e a peça cirúrgica, aquelas sem dados clínicos adequadamente documentados nos prontuários médicos e pacientes cujo bloco de parafina estava deteriorado, impossibilitando a análise molecular.

2. Coleta de Dados

Os dados clínicos de interesse foram obtidos dos prontuários médicos após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexos 3 e 4). As variáveis coletadas incluíram: sexo, idade, paridade, amamentação, histórico familiar, tabagismo, etilismo, teste genético, estadiamento clínico inicial, estadiamento patológico pós-quimioterapia, tipo de neoplasia, subtipo molecular, grau nuclear histológico, tipo de

quimioterapia, tipo de cirurgia realizada, radioterapia, adjuvância sistêmica, quantificação da pureza do tumor, quantidade de estroma, porcentagem de TILs, FOXP3, CD3 e razão CD4/CD8, além de PCR para quantificação de miR-155. Todas as informações foram armazenadas em um banco de dados utilizando o programa Epi Info (versão 7).

3. Análise imuno-histoquímica e molecular

Foram selecionados os blocos de parafina das biópsias diagnósticas e das peças cirúrgicas de todas as pacientes do estudo. O material era separado em cortes de 10 micrometros e parte era fixado em lâmina de HE (hematoxilina e eosina) e encaminhado para laboratório onde foi realizado o teste imuno-histoquímico das variáveis linfocitárias, e parte era armazenada em eppendorf e encaminhado para análise molecular do microRNA miR-155.

3.1. Análise imuno-histoquímica para TILs, CD3, CD4, CD8 e FOXP3

As reações de imuno-histoquímica (IHQ) para detectar as proteínas CD3, CD4, CD8 e FOXP3 foram realizadas utilizando o método automatizado DAKO Autostainer Link48 (Dako, Glostrup, Dinamarca) e o DAKO Flex Kit. O processo incluiu a recuperação antigênica por meio da exposição a calor controlado em solução de pH alto, utilizando PTLINK DAKO, juntamente com o bloqueio endógeno com peroxidase (200 microlitros por 5 minutos) e a incubação com anticorpos primários: CD3 (policlonal, Rabbit - DAKO, diluição pronta para uso, 200 microlitros por 20 minutos), CD8 (Clone C8/144B - Anti-Human - Monoclonal Mouse - DAKO, diluição pronta para uso, 200 microlitros por 20 minutos), CD4 (clone 4B12 - DAKO, diluição pronta para uso, 200 microlitros por 20 minutos) e FOXP3 (clone 236A/E7 - Abcam, diluição 1:500, 200 microlitros por 30 minutos).

Controles foram incluídos na mesma lâmina, com resultados "positivos" previamente determinados por IHQ e "negativos" oriundos de tecido normal da amostra e controle externo. A análise das lâminas de IHQ foi conduzida por patologista experiente em laboratório de anatomia patológica de referência do Distrito Federal.

Os casos foram avaliados conforme o padrão de expressão de linfócitos infiltrantes no estroma tumoral (sTILs), segundo recomendações internacionais do grupo

de trabalho em TILs para câncer de mama, de 2014 (163), e do grupo de trabalho internacional em biomarcadores de imunoterapia para câncer de mama, em 2018 (206).

Os TILs foram quantificados no compartimento estromal como porcentagem (% TILs estromais), utilizando a área total de tecido estromal (área ocupada por células inflamatórias mononucleares dividida pela área estromal intratumoral total), em vez do número total de núcleos estromais. A avaliação foi restrita ao tumor invasivo, excluindo TILs localizados fora das bordas tumorais e em áreas adjacentes, como CDIS e lóbulos normais. Foram também descartados TILs em regiões tumorais com artefatos de esmagamento, necrose, hialinização regressiva ou no local da biópsia anterior. Todas as células mononucleares (incluindo linfócitos e plasmócitos) foram contabilizadas, exceto leucócitos polimorfonucleares. As seções foram avaliadas por cortes de 4–5 μm sob magnificação de $\times 200$ –400, e a porcentagem foi calculada com base na análise média da área tumoral pelo patologista, considerando não apenas os pontos de maior infiltração (hotspots).

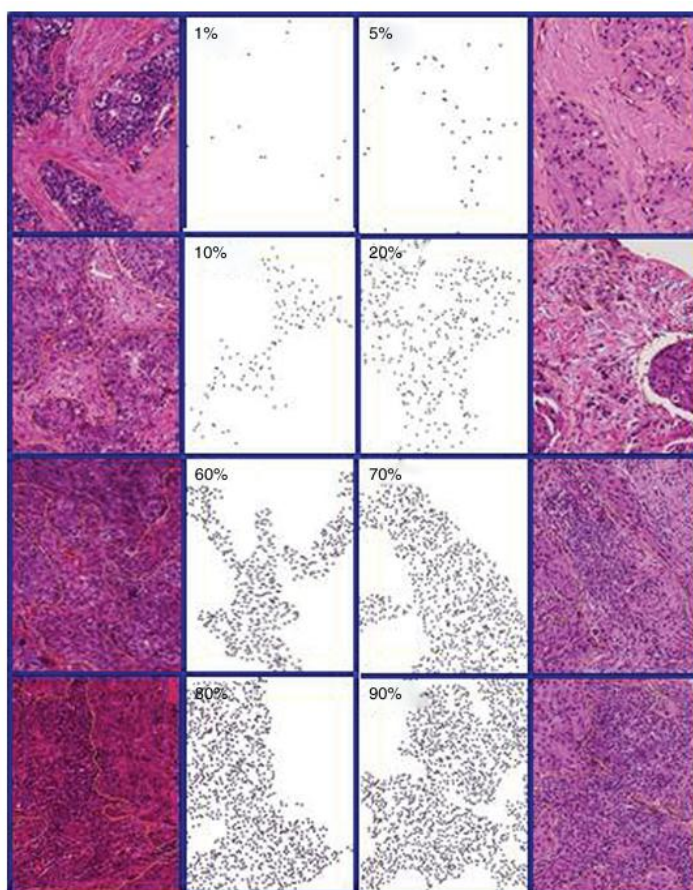


Figura 7. Quantidade de TILs (%) no estroma tumoral de acordo com as diretrizes internacionais (163).

Nos casos pós-neoadjuvância, o leito tumoral residual foi definido como a maior área transversal entre as células tumorais invasivas, conforme o índice RCB (residual cancer burden) (207). Foram excluídas da análise áreas de necrose (frequentemente substituídas por agregados de histiócitos e fendas de colesterol), áreas fibrosas e estromas infiltrados por histiócitos espumosos ou hemossiderófagos, frequentemente encontrados após a quimioterapia neoadjuvante.

Para os marcadores de imuno-histoquímica CD3, CD4, CD8 e FOXP3, o padrão de análise microscópica foi mantido, contabilizando células linfoides com marcação de membrana para cada marcador, segundo os critérios mencionados. As proporções foram registradas, assim como a relação CD4/CD8 para cada caso.

Três campos representativos foram fotografados em amostras selecionadas, utilizando um microscópio Leica DM1000LED, uma câmera Leica ICC50W e o software Leica Acquire, versão 3.4.7 Build 9121.

3.2. Análise molecular da expressão de miR-155 e controles endógenos

Inicialmente o RNA foi extraído de biópsias de tumor mamário e de tecido de peça cirúrgica após a quimioterapia, utilizando um kit comercial (MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra Kit, Thermo Fisher Scientific). As amostras de RNA purificado foram quantificadas utilizando um fluorômetro Qubit (Qubit RNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific).

A expressão de miR-155 e controles, presentes no RNA purificado das biópsias de tumor mamário foi determinada por RT-qPCR em tempo real. A síntese de cDNA para os microRNAs foi realizada com kits comerciais específicos para microRNAs (*TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific™, EUA*). Para a reação de PCR, foi utilizado o kit *TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific™)*. Os primers de miR-155 e controles endógenos foram adquiridos comercialmente (*Thermo Fisher Scientific™*), e foram previamente validados para o ensaio de amplificação que utiliza sondas Taqman descrito acima. Os ensaios de qPCR foram executados em triplicata, incluindo-se controles negativos.

O método de qPCR escolhido para o presente estudo inclui a chamada pré-amplificação, o denominado sistema "Advanced". Trata-se de um procedimento que utiliza RNA extraído por kits apropriados, destacando-se o *TaqMan Advanced MiRNA Assay* acima citado, que é particularmente útil para amostras com escassez de miRNAs,

como é o caso das biópsias de tumor mamário em blocos de parafina, com certo tempo de armazenamento, o que resulta em perda de ácidos ribonucleicos.

Inicialmente os reagentes e amostras foram descongelados e homogeneizados antes de serem centrifugados para otimizar a mistura. Diferentemente do qPCR convencional essa abordagem incorpora etapas prévias à transcrição reversa (RT-PCR), a saber, a adição da cauda poli-A e do adaptador, seguidas pela reação de transcrição reversa e, por fim, a amplificação de miR-Amp, culminando na reação de qPCR.

A primeira etapa foi a adição da cauda poli-A, que requer a preparação de uma solução mestre com componentes específicos para cada ensaio. Após a mistura adequada a solução é colocada em termociclador, onde a poliadenização ocorre a 37°C por 45 minutos, seguida pela inativação da reação a 65°C. A próxima fase envolveu a adição do adaptador, onde uma nova solução mestre foi preparada e a reação ocorreu a 16°C por 60 minutos. Essa etapa foi seguida pela transcrição reversa, crucial para converter RNA em cDNA. Novamente a solução foi cuidadosamente preparada antes de ser termociclada a 42°C por 15 minutos, com a possibilidade de armazenamento para uso futuro.

Subsequente à transcrição reversa ocorreu a reação de miR-Amp. Os reagentes foram homogeneizados e misturados em uma nova solução mestre, após a qual a reação foi realizada em ciclos de aquecimento a 95°C, seguido de etapas de desnaturação e anelamento/extensão a 60°C. Essa fase também permitiu a pausa para armazenamento.

Por fim, a amplificação por qPCR em tempo real foi similar àquela sem pré-amplificação. Iniciou-se com a preparação de misturas específicas conforme o alvo de interesse. O material proveniente da miR-Amp foi diluído antes de ser adicionado aos poços da placa de reação, com controles negativos apropriados. A amplificação ocorreu em ciclos com condições de ativação da enzima inicial e subsequente desnaturação e anelamento/extensão. A expressão relativa do RNA micro foi então calculada utilizando o método de ΔC_t .

4. Análise Estatística

Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade de distribuição através do teste de kolmogorov-Smirnov. Para a análise estatística, foram aplicados testes adequados de acordo com a distribuição dos dados, incluindo correlação, regressão logística e regressão simples. A análise dos dados quantitativos foi realizada com o software GraphPad Prism, versão 6.

Os dados com distribuição normal foram submetidos a testes paramétricos, como o teste t de Student para comparações entre dois grupos e ANOVA para comparações múltiplas, seguidos do teste de Tukey, com os resultados expressos como média e erro padrão. Para dados que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados testes não paramétricos, como Mann-Whitney ou Wilcoxon. Para as variáveis categóricas, foi usado o teste de Fisher e os resultados foram expressos em mediana e intervalo interquartil. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

Medidas descritivas foram calculadas para variáveis demográficas, clínicas e relacionadas ao tratamento, incluindo frequências absolutas e relativas, além de medidas de tendência central (média, mediana) e dispersão (desvio padrão, valores mínimos e máximos). Para comparar as variáveis contínuas TILs, CD3, CD4/CD8 e FoxP3 em relação à presença ou ausência de resposta patológica, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes.

Uma análise de regressão linear múltipla foi realizada para avaliar a relação entre os TILs (variável dependente) e os preditores CD3, CD4/CD8 e FoxP3 (variáveis independentes), incluindo os coeficientes de regressão (B), erros-padrão, valores de t e níveis de significância (p). Todas as análises foram realizadas no IBM SPSS Statistics, versão 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA), com nível de significância fixado em 5% ($p < 0,05$).

A capacidade discriminativa das variáveis TILs, CD3, CD4/CD8 e FoxP3 em relação à resposta patológica foi avaliada por meio de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic), reportando a área sob a curva (AUC), sensibilidade, especificidade e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Como não há na literatura um consenso sobre o ponto de corte que define a partir de qual valor é considerado alta expressão de TILs (208), optamos por comparar as amostras que tiveram resposta patológica completa com as pacientes sem resposta patológica completa e comparar a mediana dos valores de TILs desses grupos através do teste de Mann-Whitney e aplicando a curva ROC, o valor de 32,5% foi o que teve melhor acurácia para prever a resposta patológica e foi estipulado como o ponto de corte do quartil superior, conforme descrito previamente na literatura (209).

Feito isso, foi realizada uma análise de frequência utilizando o teste de Fisher para investigar a relação entre a expressão de TILs e a resposta patológica completa (pCR).

As amostras de biópsias de tumor mamário em blocos de parafina foram divididas em dois grupos, com baixo percentual de TILs e com alto percentual de TILs. Após a

separação desses grupos, foram utilizados os valores de CT de miR-155 para cálculo da expressão relativa do alvo, pelo método de delta CT, visando-se comparar tumores com diferentes graus de infiltração linfocitária aplicando o teste de Mann-Whitney para comparação das medianas e a curva ROC para determinar a acurácia desse marcador.

5. Viabilidade técnica da execução do projeto

O presente projeto está submetido ao edital 01/2020 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UnB (SEI nº 23106.021787/2020-12) para o segundo período letivo de 2020 no nível de doutorado. A execução do projeto contou com o apoio do Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica (ASS-128 ICC Sul, UnB), garantindo a viabilidade da infraestrutura e dos equipamentos disponíveis, como centrífugas, fluorômetro, termociclador QuantStudio 12K e freezer a -80°C.

Este estudo utiliza materiais remanescentes de um projeto aprovado no edital de Demanda Espontânea FAP-DF 04/2017, intitulado “Alvejando miR-7, miR-34a e miR-134 para silenciamento da sinucleína e proteção de neurônios dopaminérgicos em Parkinson experimental induzido por rotenona” (processo 0193.001656/2017). Além disso, o projeto será parcialmente financiado com recursos do MEC, por meio do projeto "Fortalecimento da infraestrutura laboratorial para testagem de COVID-19 e pesquisa científica", cujos valores já foram transferidos para a UnB.

A aprovação do projeto foi concedida através da plataforma Brasil CAAE: 46115121.6.0000.8153, com número do Parecer: 4.698.038 (Anexo 2). O termo de consentimento está detalhado nos Anexos 3 e 4.

IV. RESULTADOS

O presente estudo investigou amostras do câncer de mama triplo negativo, considerado um dos subtipos tumorais mais agressivos e desafiadores. Focamos em uma população do Distrito Federal, analisando a infiltração de linfócitos tumorais e suas correlações com os fenótipos clínicos dos pacientes. Além disso, avaliamos a expressão do microRNA miR-155 em biópsias coletadas antes da terapia neoadjuvante, investigando sua relação com a resposta imunológica tumoral e seu potencial como biomarcador de infiltração linfocitária.

Foram selecionadas 123 pacientes que atendiam aos critérios de inclusão para câncer de mama triplo-negativo. Conforme apresentado no fluxograma abaixo, figura 8, parte das amostras não pode ser utilizada devido a intercorrências experimentais. Assim, 7 pacientes foram reclassificadas como de outro tipo molecular (com HER2 positivo e/ou receptores hormonais positivos) após reavaliação da imuno-histoquímica. O material de 2 pacientes não foi encontrado, e 67 pacientes apresentaram material degradado devido à preservação inadequada ou quantidade insuficiente para realizar as reações necessárias. Das 47 pacientes restantes, 10 foram excluídas por não possuírem informações clínicas adequadamente registradas no prontuário.

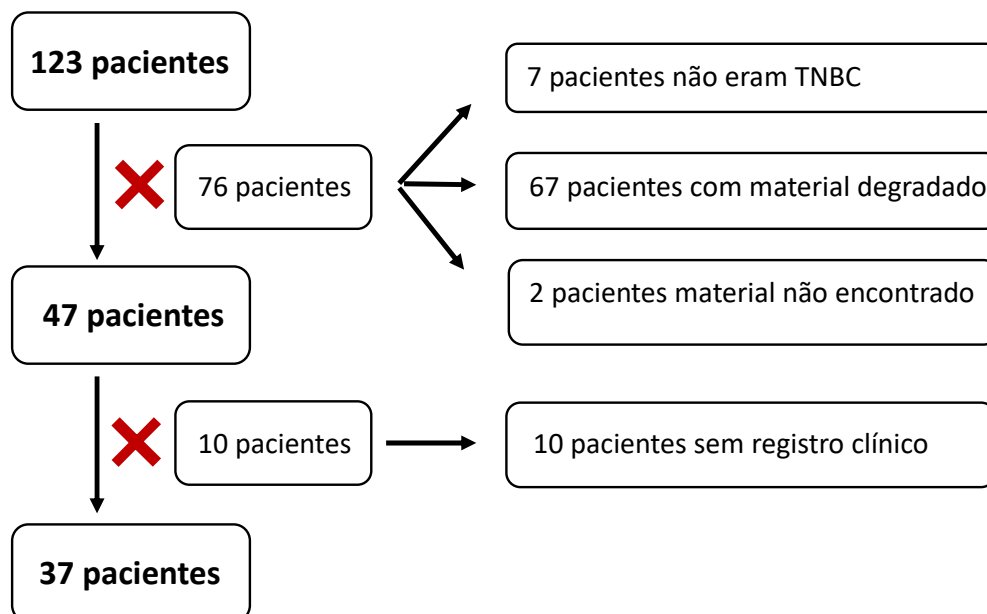


Figura 8. Fluxograma do número de pacientes selecionadas para o estudo

O resultado, após aplicarem-se os critérios de exclusão relacionados ao tipo tumoral, degradação ou perda de material e ausência de informações em prontuários (n = 37).

Foram coletados dados de 15 pacientes de uma instituição pública e 22 de uma instituição privada. As idades variaram de 32 a 97 anos, com média de 55,8 anos e mediana de 53 anos (Tabela 1).

Entre as pacientes, 67,6% tinham mais de 60 anos, enquanto 32,4% eram menores de 60 anos. Quanto à maternidade, 10,8% das pacientes não tiveram gestações, 48,6% tiveram 1 ou 2 gestações, e 40,5% tiveram 3 ou mais. Apenas 13,5% das pacientes não amamentaram. Em relação ao tabagismo e etilismo, 72% das pacientes foram classificadas como não tabagistas e 84% como não etilistas (Tabela 2).

Aproximadamente 46% das pacientes relataram histórico familiar positivo para câncer de mama em parente de primeiro grau. Mais da metade das pacientes (51,4%) não realizaram teste genético. As análises genéticas revelaram que 5,4% do total de pacientes apresentava mutações no gene BRCA1, 2,7% no BRCA2 e 5,4% no gene TP53. Além disso, 32,4% das pacientes testadas tiveram resultado negativo para mutações em painel genético. Das 18 pacientes que realizaram o teste genético 33,3% tiveram variante patológica em algum gene analisado. Do total de participantes, 21,6% evoluíram a óbito diretamente relacionado à doença, enquanto as demais permanecem vivas e com a doença controlada. Em relação à lateralidade, 20 pacientes (54,1%) apresentavam câncer de mama à direita e 17 (45,9%) à esquerda, com uma razão de lateralidade de 1,17. Uma paciente teve câncer bilateral, mas o tumor triplo negativo foi localizado à direita. Esses dados estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 1. Idade das pacientes estudadas

	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	55,89	13,88	32	97

Tabela 2. Caracterização do perfil demográfico das pacientes estudadas

	n	%
Tipo de unidade hospitalar		
Privada	22	59,5
Pública	15	40,5
Faixa etária		
< 60 anos	25	67,6
≥ 60 anos	12	32,4
Nº de gestação		
Nenhuma	4	10,8

1 a 2	18	48,6
3 ou mais	15	40,5
Amamentação		
Não	5	13,5
Sim	32	86,5
Tabagismo		
Não	18	72,0
Sim	7	28,0
Etilismo		
Não	21	84,0
Sim	4	16,0
História familiar positiva		
Não	20	54,1
Sim	17	45,9
Lateralidade		
Direita	20	54,1
Esquerda	17	45,9
Painel Genetico		
BRCA 1	2	5,4
BRCA 2	1	2,7
BRIP 1	1	2,7
PT53	2	5,4
Negativo	12	32,4
Não fizeram o teste	19	51,4
Obito		
Não	29	78,4
Sim	8	21,6

n, frequência absoluta; %, frequência relativa

Todas as pacientes apresentaram carcinoma ductal infiltrante do tipo não especial. A Tabela 3 descreve as características tumorais das pacientes no momento do diagnóstico. Dentre elas, 31 (83,7%) tinham tumores com diâmetro superior a 2 cm ($\geq$ T2), 20 (54%) eram positivas para linfonodos axilares e 26 (70,3%) apresentavam grau 3.

Tabela 3. Características clínicas ao diagnóstico

	n	%
Estadiamento clínico		
IA	5	13,5
IIA	9	24,3
IIB	9	24,3
IIIA	8	21,6
IIIB	6	16,2
cT (Tamanho tumor)		
T1	1	2,7
T1B	3	8,1
T1C	2	5,4
T2	17	45,9
T3	10	27,0
T4B	2	5,4
T4D	2	5,4
cN (Status axilar)		
N0	17	45,9
N1	13	35,1
N2	7	18,9

Grau do tumor		
2	11	29,7
3	26	70,3

n, frequência absoluta; %, frequência relativa

Duas pacientes foram submetidas a cirurgia como tratamento primário; uma delas pela idade (97 anos) e outra devido ao tamanho tumoral clínico T1 de 0,7 cm. As 35 pacientes restantes receberam quimioterapia neoadjuvante, com 44,1% alcançando resposta patológica completa. É importante destacar que nenhuma paciente estudada foi submetida à tratamento com Pembrolizumabe pois ainda não havia aprovação no Brasil para esse tratamento quando elas foram designadas para terapia neoadjuvante.

As características tumorais pós-tratamento cirúrgico e a análise histopatológica estão detalhadas na Tabela 4. Após o tratamento sistêmico, 13 pacientes (38,2%) ainda apresentaram tumores maiores que 2 cm e 10 (29,4%) mantiveram linfonodos axilares positivos.

Tabela 4. Características patológicas pós-quimioterapia neoadjuvante

	n	%
Estadiamento Patológico		
pCR (Resposta Patológica Completa)	15	44,1
IB	4	11,8
IIA	2	5,9
IIB	4	11,8
IIIA	6	17,6
IIIB	2	5,9
IIIC	1	2,9
yT (Tamanho do tumor)		
T0	15	44,1
T1	1	2,9
T1B	1	2,9
T1C	4	11,8
T2	7	20,6
T3	5	14,7
T4B	1	2,9
yN (Status axilar)		
N0	24	70,6
N1	4	11,8
N2	5	14,7
N3	1	2,9

n, frequência absoluta; %, frequência relativa

A Tabela 5 mostra que o índice de proliferação tumoral, representado pelo Ki67, que mostrou uma média de 63,2%.

Tabela 5. Índice Ki67

	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Ki67 %	63,24	18,53	60	30	90

O esquema de quimioterapia selecionado para 34 (97,1%) pacientes incluiu antraciclina associada a ciclofosfamida e taxano, enquanto uma paciente foi tratada com carboplatina e taxano. Onze (29,7%) pacientes foram submetidas à cirurgia conservadora, e 25 (67,6%) à mastectomia, com ou sem reconstrução. Uma paciente (2,7%) não pôde ser operada devido à progressão sistêmica durante a quimioterapia (Tabela 6).

Nove (24,3%) pacientes receberam capecitabina após a cirurgia, em conformidade com os protocolos do CREATE-X. Uma (2,7%) paciente recebeu quimioterapia adjuvante com antraciclina, ciclofosfamida e taxano após a cirurgia primária. Essas características de tratamento estão detalhadas na Tabela 6.

Tabela 6. Caracterização do tratamento

	n	%
Quimioterapia neoadjuvante		
AC + T	34	97,1
Carboplatina	1	2,9
Quimioterapia adjuvante		
AC + T	1	2,7
Capecitabina	9	24,3
Tipo de cirurgia		
Conservadora	11	29,7
Mastectomia	25	67,6
Não operou	1	2,7

n, frequência absoluta; %, frequência relativa

O tempo médio entre o término da quimioterapia neoadjuvante e a cirurgia foi de 3,52 meses, e a mediana foi de 2 meses. Trinta (85,7%) pacientes receberam radioterapia adjuvante, com uma média de 17,6 sessões (Tabela 7).

Tabela 7. Características de tratamento

	Média	Desvio padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Δ T Fim da QT até a Cirurgia (meses)	3,52	5,41	2	0	25
RT sessões	17,6	4,28	15	15	28

O nível de resposta foi classificado da seguinte forma: ausência de resposta para pacientes que mantiveram o mesmo tamanho tumoral e status axilar após o tratamento sistêmico; resposta parcial baixa para aquelas com diminuição do tamanho tumoral ou status axilar inferior a 50%; resposta parcial alta para as que apresentaram redução significativa do tamanho tumoral (entre 50% e 99,9%); e resposta patológica completa

para pacientes sem células cancerígenas no leito tumoral ou nos linfonodos axilares após o tratamento sistêmico (Tabela 8).

Tabela 8. Caracterização da resposta ao tratamento sistêmico

	n	%
Nível de resposta patológica		
Ausência de resposta	3	8,8
Resposta parcial Baixa	8	23,5
Resposta Parcial Alta	8	23,5
Resposta Patológica completa	15	44,1

n, frequência absoluta; %, frequência relativa

Para analisar as características biológicas tumorais separamos os grupos experimentais em tecido de biópsia, que representam células não expostas a qualquer tratamento, ou seja, antes da terapia neoadjuvante, e tecido da peça cirúrgica de pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante, conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Estatísticas descritivas da biologia tumoral

	Tecido de Biópsia		Tecido de Peça cirúrgica	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
N ^a de Fragmentos estudados	5	4,47	2,33	3,87
Tamanho dos fragmentos mm ²	115,76	127,02	330,67	148,36
Relação Tu/Area mm ²	55,3	56,48	104,53	69,75
Presença de necrose %	10,7	20,33	13,2	21,24
Invasão tumoral %	13,13	28,4	51,54	30,03
Pureza do tecido %	40,3	18,58	32,2	15,71
Presença de estoma %	48,48	18,14	37,69	25,99
Quantidade de Tils %	25,21	27,08	23,4	21,09
Quantidade CD3 %	23,85	20,4	25,53	15,77
Razão CD4/CD8	0,7	0,68	1,07	0,96
Quantidade FoxP3	7,21	9,79	5,53	6,63

Analizamos a sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) das variáveis linfocitárias expressas tanto no tecido tumoral da biópsia quanto na peça cirúrgica após o tratamento neoadjuvante, incluindo TILs, CD3, razão CD4/CD8 e FOXP3, com intervalo de confiança (IC) de 95%, conforme detalhado na Tabela 10.

A relação entre os marcadores TILs, CD3, razão CD4/CD8 e FOXP3 como preditores de resposta patológica nos tumores triplo-negativos (TNBC) foi analisada para avaliar se a população estudada apresenta padrões tumorais consistentes com os descritos na literatura e se esses marcadores influenciam positivamente a resposta à quimioterapia.

Tabela 10. Resultado da análise de sensibilidade, especificidade, acurácia, VPP, e VPN com a TILs, CD3, CD4/CD8 e FoxP3 para a Biópsia e Peça cirúrgica

Variável	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)	VPP	VPN	Critério	P-valor
Biópsia							
Tils	75.0% (48.2% - 101.8%)	33.3% (4.1% - 62.6%)	39.6% (8.3% - 77.8%)	0,43	0,67	>2.00	0,9
CD3	100.0% (nan% - nan%)	16.7% (-6.4% - 39.8%)	43.8% (5.2% - 85.5%)	0,44	1	>2.00	0,83
CD4/CD8	50.0% (19.0% - 81.0%)	83.3% (60.2% - 106.4%)	43.8% (5.2% - 85.5%)	0,67	0,71	>0.66	0,67
FoxP3	50.0% (19.0% - 81.0%)	66.7% (37.4% - 95.9%)	43.8% (5.2% - 85.5%)	0,5	0,67	>1.00	0,91
Peça cirúrgica							
Tils %	75.0% (48.2% - 101.8%)	33.3% (4.1% - 62.6%)	39.6% (0.0% - 85.7%)	0,43	0,67	>20.00	0,73
CD3	100.0% (nan% - nan%)	33.3% (4.1% - 62.6%)	43.8% (4.2% - 84.0%)	0,5	1	>20.00	0,67
CD4/CD8	50.0% (19.0% - 81.0%)	83.3% (60.2% - 106.4%)	56.2% (12.5% - 100.0%)	0,67	0,71	>1.50	0,82
FoxP3	50.0% (19.0% - 81.0%)	66.7% (37.4% - 95.9%)	41.7% (0.0% - 84.0%)	0,5	0,67	>3.00	0,94

VPP, valor preditivo positivo; VPN, valor preditivo negativo; IC, intervalo de confiança

Adicionalmente foi realizado o teste de Mann-Whitney para examinar a expressão das variáveis linfocitárias tanto no tecido tumoral das biópsias quanto na peça cirúrgica. Essa análise comparou pacientes que apresentaram resposta ao tratamento neoadjuvante com aquelas que não responderam ou que progrediram, conforme os resultados descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Resultado da comparação de qualquer resposta patológica com as variáveis linfocitárias em tecidos de biópsia e de peça cirúrgica

	Resposta patológica		<i>p</i> ¹
	Não Mediana (25p - 75p)	Sim Mediana (25p - 75p)	
Biópsia			
Tils	14,00 (1,00 - 37,50)	15,00 (1,25 - 2,75)	0,54
CD3	20,00 (1,75 - 37,50)	17,50 (2,00 - 13,75)	0,75
CD4/CD8	0,42 (0,11 - 0,63)	0,58 (0,15 - 0,92)	0,39
FoxP3	1,00 (0,00 - 8,50)	2,00 (0,00 - 19,00)	0,24
Peça cirúrgica			
Tils	15,00 (4,50 - 51,25)	20,00 (5,75 - 48,75)	0,84
CD3	15,00 (13,75 - 51,25)	25,00 (21,25 - 41,25)	0,5
CD4/CD8	1,00 (0,41 - 1,75)	0,66 (0,35 - 1,88)	0,78
FoxP3	2,00 (1,50 - 16,25)	3,00 (0,25 - 12,00)	0,79

1-Teste de Mann-Whitney.

Foram analisados todos os valores de TILs nas amostras de biópsia de pacientes com resposta patológica completa (pCR) e foram considerados os intervalos interquartis com o valor de 2% no quartil inferior e 32,5% no quartil superior (Figura 9).

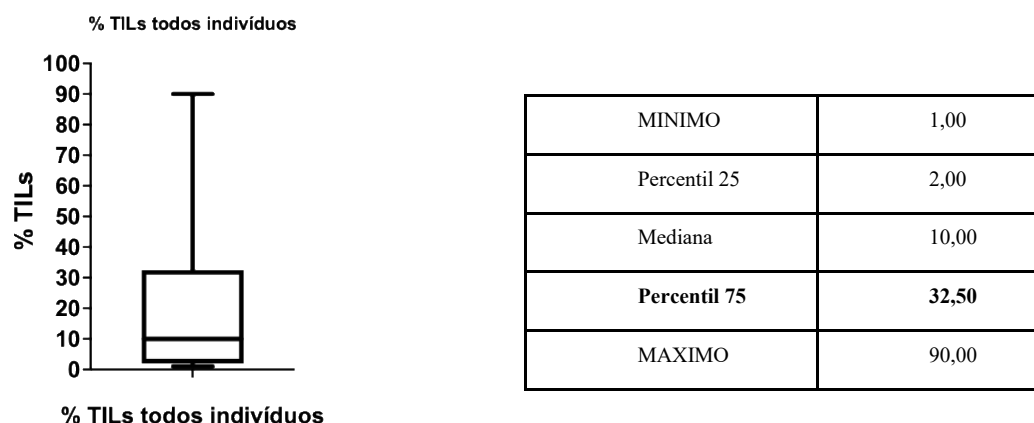


Figura 9. Valores de TILs em amostras de biopsias com pCR

Após aplicar o teste de Mann-Whitney para comparar a mediana dos valores de TILs entre o grupo com resposta patológica completa com as amostras de pacientes sem resposta patológica completa e aplicando a curva ROC, o valor de 32,5% foi o que teve melhor acurácia para prever a resposta patológica e foi estipulado como o ponto de corte do quartil superior. Então, comparando os grupos com e sem resposta patológica completa nesse cut-off, respeitando o intervalo interquartil da amostra analisada, sendo o quartil inferior tendo expressão de TILs = 2% e o quartil superior (75%) com expressão de TILs = 32,5%, houve significância estatística com $p = 0,01$ (figura 10).

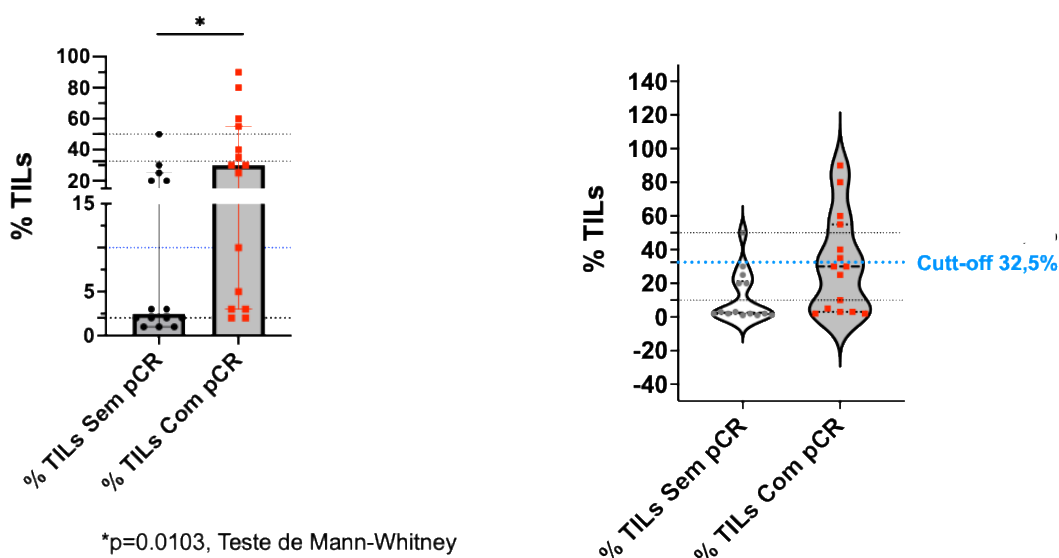


Figura 10. Comparação da mediana dos valores de expressão de TILs em amostras com pCR e amostras sem pCR

Foi realizada uma análise de frequência utilizando o teste de Fisher para investigar a relação entre a expressão de TILs e a resposta patológica completa (pCR), conforme demonstrado na tabela 12. Observamos que 20% das pacientes com alta expressão de TILs apresentara pCR e 46,6% das pacientes com baixa expressão de TILs não apresentaram a resposta patológica completa. A figura 11 demonstra esse achado graficamente.

Tabela 12. Proporção de indivíduos de acordo com a presença ou ausência de resposta patológica completa (pCR) e com o padrão de expressão de TILs, alto ou baixo

Infiltrados linfocitários tumorais (TILs).	Alto TILs	Baixo TILs	p^1
	n (%)	n (%)	
Pacientes com pCR	6 (20)	9 (30,0)	0,0103
Pacientes sem pCR	1 (3,33)	14(46,6)	

1-Valor de p, teste exato de Fisher

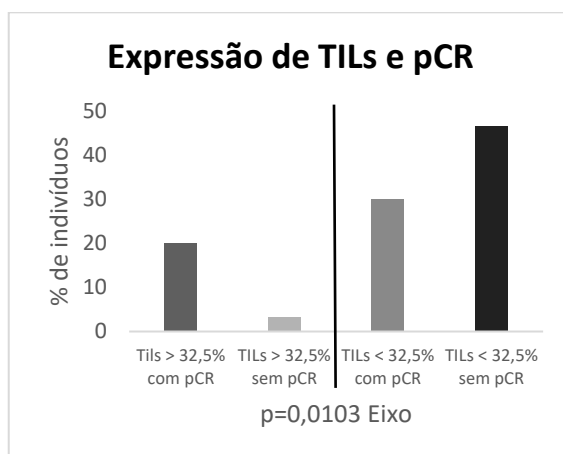


Figura 11. Expressão de TILs correlacionada com Resposta patológica completa (pCR)

Dentre as pacientes analisadas avaliou-se a quantidade de infiltrados linfocitários tumorais (TILs) nos tecidos das biópsias e o nível de resposta associado a essa expressão, classificada como baixa ou alta. Além disso, para comparar o nível de resposta com a expressão das variáveis linfocitárias nos tecidos tumorais, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, realizando as seguintes comparações: Ausência de resposta vs. Resposta Parcial alta; Ausência de resposta vs. Resposta Parcial baixa; Ausência de resposta vs. Resposta Patológica completa; Resposta Parcial alta vs. Resposta Parcial baixa; Resposta Parcial alta vs. Resposta Patológica completa e Resposta Parcial baixa vs. Resposta Patológica completa. Os resultados dessas comparações estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Análise comparativa dos níveis de resposta patológica de acordo com as variáveis linfocitárias

	TILs% (Bx)	CD3 (Bx)	CD4/CD8 (Bx)	FoxP3 (Bx)	TILs % (Peça)	CD3 (Peça)	CD4/CD8 (Peça)	FoxP3 (Peça)
Ausência de resposta vs Resposta Parcial Alta	0.264	0.272	0.380	0.261	0.881	0.453	0.878	0.445
Ausência de resposta vs Resposta parcial Baixa	0.673	0.691	0.571	0.516	0.822	0.610	0.831	0.682
Ausência de resposta vs Resposta Patológica completa	0.220	0.555	0.583	0.460	0.822	0.610	0.831	0.682
Resposta Parcial Alta vs Resposta parcial Baixa	0.649	0.847	0.948	0.694	0.714	0.646	0.646	0.927
Resposta Parcial Alta vs Resposta Patológica completa	0.121	0.405	0.687	0.636	0.714	0.646	0.646	0.927
Resposta parcial Baixa vs Resposta Patológica completa	0.305	0.458	0.451	0.373	1.000	1.000	1.000	1.000

Números da tabela representam os valores de p no teste de Mann-Whitney. Bx, biópsia anterior à terapia neoadjuvante; Peça, tumor residual após terapia neoadjuvante.

Foi realizada análise de regressão linear múltipla para avaliar a relação entre os valores de TILs e suas variáveis preditoras: CD3, relação CD4/CD8 e FOXP3, tanto em tecidos provenientes de biópsias quanto em tecidos da peça cirúrgica. A única variável que apresentou significância estatística foi CD3, com $p < 0,01$, tanto nas biópsias quanto nas amostras cirúrgicas (Tabela 14), demonstrando que o CD3 é um bom preditor linfocitário para expressão de TILs nessas amostras.

Tabela 14. Resultado da análise de regressão linear múltipla entre o TILs e as variáveis preditoras CD3, CD4/CD8 e FoxP3 para tecido de biópsia e peça cirúrgica

	r2	B	Erro padrão	t	p
Biópsia					
CD3		1,2	0,09	13,61	<0,01
CD4/CD8	0,88	4,93	2,63	1,88	0,07
FoxP3		-0,2	0,18	1,14	0,26
Peça cirúrgica					
CD3		1,03	0,2	5,05	<0,01
CD4/CD8	0,78	3,29	3,27	1	0,34
FoxP3		0,51	0,46	1,1	0,3

Tumores com alto grau de infiltrados linfocitários mostraram aumento significativo na expressão de miR-155 quando comparados com tumores com baixo grau de infiltrados (2,655 *versus* 1,310; $P=0,0379$, teste de Mann Whitney; $n=8$ por grupo). O valor de *cutt-off* de 1,66 foi determinado pela análise da curva ROC (Figura 12).

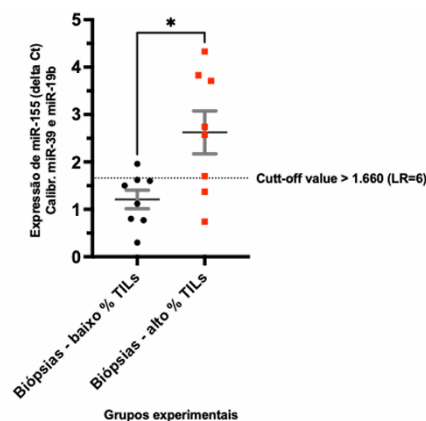


Figura 12. Expressão de miR-155 de acordo com o grau de infiltração linfocitária. Análise dos valores do delta Ct do alvo miR-155, determinado por RT-qPCR, em amostras de tecido de biópsia com baixa expressão de TILs e amostras com alta expressão de TILs. * $p=0,03$ (IC: 0,58 a 1,00)

Tal achado corrobora a importância desse microRNA na biologia do tumor mamário e justificou, ainda, a continuidade da análise para avaliar-se qual a acurácia de miR-155 na identificação dos tumores com alto infiltrado linfocitário.

Foi utilizada a análise da curva ROC para determinar a acurácia de miR-155 na identificação de tumores com algum grau de infiltração linfocitária, sendo expressa pela área sob a curva, AUC, do inglês *Area Under the Curve*.

Ao analisar os resultados produzidos em relação ao miR-155 obteve-se um valor de AUC de 0,81, considerado uma boa acurácia (Figura 13). O desempenho do biomarcador para discriminar os grupos foi estatisticamente significativo, com $p = 0,0357$. Isso nos permite propor que o miR-155 seja um potencial biomarcador para identificar tumores com alta expressão TILs.

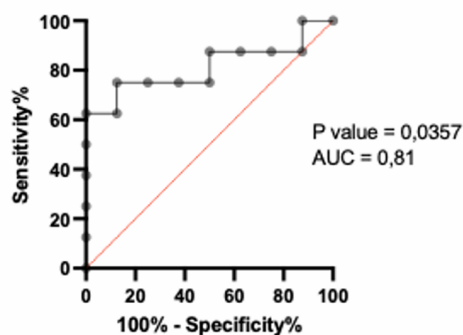


Figura 13. Análise da acurácia da expressão de miR-155 em identificar indivíduos com alta infiltração linfocitária. Utilizou-se a metodologia da curva ROC, com dados de expressão de miR-155 e

de grau de infiltração linfocitária, alta ou baixa. Área sob a curva (AUC) resultante foi de 0,81, com $p=0,0357$.

Para determinar o cut-off da expressão de miR-155, foi escolhido o maior valor de razão de verossimilhança (Likelihood Ratio, LR), que foi de 6,0, resultando em alta sensibilidade (75%) e alta especificidade (87,5%). Com esses parâmetros, estabeleceu-se um cut-off de 1,66, gerando uma acurácia de 81% com $p = 0,0357$ (IC 95%: 0,58 a 1,00).

Como passo seguinte do estudo, buscou-se examinar se uma combinação de dois alvos, com estrutura química distinta e obtidos por metodologias diferentes, poderia melhorar o desempenho do biomarcador. Ou seja, combinamos resultados de miR-155 (molécula de RNA não-codificante, identificada por RT-qPCR) com resultados de uma proteína de superfície celular linfocitária, CD3 (identificada por imuno-histoquímica), ambas moléculas presentes na biópsia tumoral.

Nesta segunda etapa experimental, que incluiu cálculos da expressão de miR-155 associada ao CD3, os achados do ensaio anterior foram corroborados, melhorando a discriminação entre os grupos experimentais. Conforme apresentado na Figura 14, tumores com alto grau de infiltração linfocitária mostraram um aumento significativo na expressão combinada de miR-155 e CD3 quando comparados a tumores com baixa infiltração (2,185 versus 1,010; $P = 0,0003$, teste de Mann-Whitney; $n = 8$ por grupo). Nas análises, os valores de CD3 foram transformados em logaritmo para alinhá-los aos valores de RT-qPCR de miR-155, minimizando assim as variações numéricas e facilitando a análise dos dados.

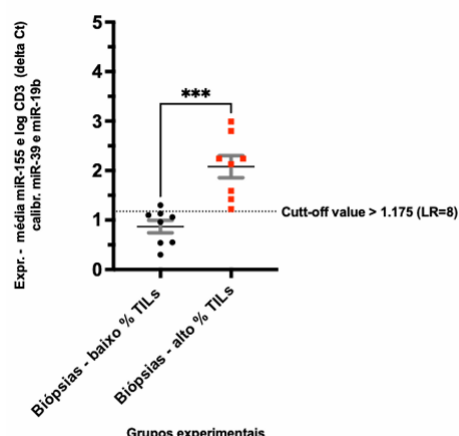


Figura 14. Expressão de miR-155 e CD3 de acordo com o grau de infiltração linfocitária. Análise dos valores do delta Ct da média de miR-155 com log de CD3, determinado por RT-qPCR, em amostras de

tecido de biopsia com baixa expressão de TILs e amostras com alta expressão de TILs com $*p=0,01$ (IC: 0,93 a 1,00).

Os resultados de qPCR mostraram que tumores com alto grau de infiltrados apresentam o dobro do valor de expressão combinada de miR-155 associado a CD3, ou seja, essa combinação de alvos apresenta capacidade significativa de discriminar os grupos experimentais, seguindo-se para a determinação da acurácia desses biomarcadores combinados pela curva ROC.

A análise da curva ROC revelou uma acurácia significativa de 98% ($p=0,0011$ (IC 95%: 0,93 a 1,00) (Figura 15). A razão de verossimilhança aumentou de 6.0, no ensaio anterior apenas com miR-155, para 8.0. Houve, ainda, aumento na sensibilidade do teste com a combinação miR-155 e CD3. A sensibilidade alcançou 100%, ou seja, todos os tumores com altos infiltrados, os verdadeiros positivos, foram corretamente identificados.

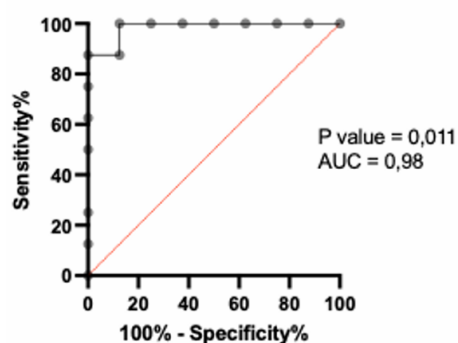


Figura 15. Análise da acurácia da expressão de miR-155 e de CD3 em identificar indivíduos com alta infiltração linfocitária. Foi utilizada a metodologia da curva ROC, baseada na média da expressão de miR-155 e do log de CD3, para tumores com grau de infiltração linfocitária alta ou baixa. Área sob a curva (AUC) resultante foi de 0,98, com $p=0,011$.

V. DISCUSSÃO

A literatura é bastante ampla sobre dados de câncer de mama, e as características raciais, culturais e ambientais interferem nos dados epidemiológicos de cada região do mundo, trazendo variações interpopulacionais (9)

A média de idade na população feminina na América do sul com câncer de mama é de 56 anos (6), enquanto a média nas mulheres com câncer de mama triplo-negativo (TNBC) tem sido descrita como 51 anos (DP: 11 anos) (210). Nossas pacientes estudadas tinham média de 55 anos (DP: 13 anos).

Algumas características epidemiológicas são importantes serem descritas pois existem os fatores protetores e o risco relativo de câncer de mama diminui em 4,3% (IC 95% 2,9-5,8; $p < 0,0001$) para cada 12 meses de amamentação, e cada parto confere uma redução de 7,0% (5,0-9,0; $p < 0,0001$) do risco (211). Nesse estudo 89.2% das pacientes tiveram pelo menos um parto e 86,5% amamentaram.

Quanto aos fatores de risco, um dado bem descrito na literatura é a associação do alcoolismo com o câncer de mama. O risco relativo é de 1,12 (1,10 – 1,14) para uma dose de álcool/dia (212). Apesar disso, apenas 16%, a minoria das pacientes, relataram consumir bebida alcoólica ao longo da vida.

Outro fator de risco importante é a história familiar, o risco aumenta mesmo que só tenha um familiar de primeiro ou segundo grau com câncer de mama e o Hazard Ratio (HR) descrito é 1,77. Quando há dois ou mais familiares com história positiva o HR é de 2,52, isso independente do perfil molecular (213). Na nossa população, quase metade das pacientes (46%) tinha história de câncer de mama em algum parente de primeiro ou sendo grau.

Esse risco é independente de mutações genéticas, quando analisamos o risco em pacientes com mutação a chance de desenvolver essa neoplasia maligna é de 5 a 10%. Os principais genes relacionados são os de alta penetrância como BRCA 1 e 2 e PT53, porém mutação de genes de moderada e baixa penetrância como CHECK2, CDH1, RAD50, BRIPI 1 e PALB 2 também interferem favorecendo uma maior susceptibilidade a câncer de mama nas pacientes com essas mutações genéticas (214). O risco de desenvolver câncer de mama ao longo da vida é de 57% para portadoras de mutação em BRCA1 e 49% para as mutações me BRCA 2 (215).

O acesso ao teste genético no Distrito Federal, bem como em todo Brasil, é limitado principalmente pelo custo. Considerando esse aspecto, 51,4% das pacientes não

realizaram teste genético. Do total, 5,4% tinham mutações no gene BRCA1, 2,7% no BRCA2, e 5,4% no gene TP53, isso configura que 33% das pacientes que fizeram o teste eram mutadas.

O câncer de mama triplo negativo está descrito entre os tipos mais agressivos de câncer de mama e um dos parâmetros que mede esse dado é a mortalidade diretamente relacionada à doença. Foram à óbito pelo TNBC na amostra estudada 21,6% das pacientes, portanto 78,6% permaneceram vivas durante o período de análise. Na literatura, o melhor padrão de sobrevivência foi observado entre mulheres com subtipo HR+/HER2- (taxa de sobrevivência de 92,5% em 4 anos), seguido por HR+/HER2+ (90,3%), HR-/HER2+ (82,7%) e, finalmente, pior sobrevivência para o subtipo triplo-negativo (77,0%) (216).

A mama que desenvolve o câncer sempre foi uma questão de curiosidade para definir se o lado interfere de fato na frequência da neoplasia mamária, a razão de lateralidade descrita na literatura é de 1,05 a 1,26 com frequência aumentada do lado esquerdo (217). Porém no nosso estudo a razão foi de 1,17 a favor da mama direita, porém não consideramos um fator de discordância importante, uma vez que a lateralidade não é fator de risco e esse dado é apenas uma descrição de frequência.

Todas as pacientes estudadas tinham tipo histológico de carcinoma ductal invasivo sem tipo especial. Isso pode ser consequência de o número amostral não ser tão alto. A maioria, cerca de 90%, dos carcinomas de mama triplo negativos são assim classificados (218), porém cerca de 1% dos carcinomas descritos na literatura são metaplásico, 3% a 5% são medulares e nesses tipos histopatológicos a grande maioria é do subtipo triplo negativo (219).

Em uma coorte com 1.600 pacientes, sendo 11% TNBC (180 pacientes) demonstrou que 54,4% dessas tinham linfonodos axilares positivos para malignidade ao diagnóstico, quando 45,6% eram clinicamente N1 ou N2 nos outros subtipos, e 64,5% tinham tumores maiores que 2 cm contra 37,4% dos demais tumores de mama, isso prova que esse subtipo molecular confere estadiamentos mais avançados ao diagnósticos quando comparados aos outros subtipos. Há ainda a descrição de 90,2% dos TNBC serem grau 2 ou 3 (111). Na nossa amostra 54% era axila com linfonodos positivos e 87,3% eram tumores $\geq$ cT2, e 100% da nossa amostra era grau 2 ou 3, concordando com a literatura.

Ainda no contexto do estadiamento clínico, analisando outros dados publicados, em uma coorte de 304 pacientes, 71% eram N0, ou seja, axila clinicamente negativa ao

diagnóstico (220). Apenas 46% das nossas pacientes se enquadravam nesse status axilar, fato que pode ser atribuído à demora ao diagnóstico em uma população de país subdesenvolvido como o Brasil. Quanto ao grau tumoral, essa mesma coorte teve quase 85,7% das pacientes com grau 3. Nosso dado é parecido com 70,3% dos casos de tumores pouco diferenciados.

Em uma publicação de 2016 está descrito em banco de base do SEER com 18.855 pacientes com TNBC a seguinte informação sobre estadiamento comparada aos nossos dados (221): IA (35,6%) *vs* (13,5%); IIA (28,7%) *vs* (24,3%); IIB (13,0%) *vs* (24,3%); IIIA (7,4%) *vs* (21,6%); IIIB (3,8%) *vs* (16,2%).

A base de dados mostra quase 37% das pacientes descritas são diagnosticadas em estadiamento inicial com tumores menores que 2 cm. Nesse estadiamento só encontramos 13,5% das pacientes. Uma das hipóteses para esse dado ser discrepante é o fato de fazermos diagnósticos mais tardios no Brasil devido à dificuldade de acesso das pacientes que dependem do Sistema Único de Saúde.

A associação do alto índice de proliferação tumoral, representada pelo Ki67, com os TNBC já está bem estabelecida na literatura. Em uma publicação que analisou a expressão do Ki67 como um biomarcador para cada subtipo molecular de câncer de mama mostrou que 60% das pacientes tinham Ki67 considerado elevado acima de 15% (222). Destaca-se que um estudo anterior identificou índice elevado de Ki67 em proporção ainda maior dos indivíduos, alcançando 83% das pacientes (223). Todas as nossas pacientes tinham Ki67 superior a 30% com média de 63%, confirmando que em TNBC o Ki67 é rotineiramente elevado.

Na literatura, 40% a 50% dos TNBC atingem resposta patológica completa (pCR) após quimioterapia neoadjuvante (224). Na nossa amostra esse dado foi 44,1%, bastante similar aos números publicados.

Regimes de quimioterapia neoadjuvante baseados em antraciclina associada a ciclofosfamida e taxano (AC + T) são os de escolha para tratamento de TNBC maiores que 1 cm (67). Tumores T1a ou T1b, ou seja, menores que esse ponto de corte devem ter a cirurgia como opção de tratamento primário (218). Apenas 3% das pacientes estudadas usaram esquema de carboplatina na quimioterapia neoadjuvante, 97% delas fizeram esquema AC + T.

Após a publicação do estudo KeyNote522, pacientes com tumores triplo-negativo localmente avançados, maiores que 2 cm e/ou com linfonodos axilares positivos ao diagnóstica devem preferencialmente serem submetidas à taxano associado à carboplatina

e pembrolizumabe seguido de antraciclina e ciclofosfamida (118). Esses dados são impactantes, mas não podemos inferir que o esquema escolhido para nossas pacientes foi incompleto, mesmo com tumores localmente avançados, isso pois a publicação que mudou a prática clínica ocorreu em 2022 e a maioria das pacientes analisadas foram selecionadas antes desse período, portanto o esquema escolhido ainda era o mais adequado.

Dados cirúrgicos disponíveis em publicação recente para 604 pacientes 57,3% foram submetidos à cirurgia conservadora e 42,7% foram submetidos a mastectomia (225). Semelhante a esses dados, uma coorte de 275 pacientes, na qual 52% foram submetidas à cirurgia conservadora e 37,9% à cirurgia mamária radical (226). Para nossas pacientes esse dado foi de 29,7% submetidas a cirurgias menores e 67,6% à mastectomia. Fato que pode ser explicado pelo diagnóstico mais tardio e estadiamentos mais avançados nessa população que analisamos.

Entender a resposta desses tumores ao tratamento sistêmico é um dos principais pontos desse estudo. Em uma publicação de 2021 em uma população brasileira 12% das pacientes praticamente não tiveram resposta patológica, enquanto esse número foi de 8,8% nas nossas pacientes. Uma resposta baixa foi descrita em 21% das pacientes comparada as nossas 23,5%; a descrição dessa coorte teve resultados mais baixos que os nosso ao analisar uma boa resposta à terapia neoadjuvante em apenas 8% das pacientes, nós encontramos 23,5% das pacientes nesse contexto. A resposta patológica completa foi bem similar 42% publicado e 44,1% no nosso estudo (227). Essa comparação é importante pois analisa perfil demográfico semelhante e terapia neoadjuvante também bastante parecida.

Analisar o status axilar após a quimioterapia neoadjuvante é fundamental para estabelecer o prognóstico da pacientes, sabendo que pacientes que continuam com células neoplásicas após o tratamento sistêmico possuem pior prognóstico. Em uma publicação de 2021 em uma população brasileira, 45,8% das pacientes estudadas mantiveram axila com linfonodos positivos para doença maligna enquanto 54,2% apresentaram estadiamento patológico pN0 (227). Nossos números nessa esfera analítica demonstraram 70,6% das pacientes com axila negativa pós quimioterapia neoadjuvante.

Algumas publicações são emblemáticas no que tange a oncologia mamária, e uma delas foi a publicação do estudo CREATE-X em 2017 que após randomizar pacientes com tumor residual após quimioterapia neoadjuvante para receber capecitabina adjuvante comparada com pacientes que receberam placebo, o grupo de pacientes TNBC tiveram

sobrevida livre de doença de 69,8% versus 56,1% e sobrevida Global de 78,8% versus 70,3% em cinco anos favorecendo o grupo do tratamento (129). Apesar de 55,9% das pacientes estudadas não terem atingido resposta patológica completa, apenas 24,5% do total, ou 47,3% das pacientes sem pCR fizeram capecitabina adjuvante. Esse dado poderia ser maior considerando que o período usado para seleção de pacientes coincide com a publicação. Porém alguns pontos devem ser ressaltados e o primeiro deles é que o serviço público só aderiu essa terapêutica a partir de 2023, outro ponto é que algumas dessas pacientes evoluíram com metástase visceral precoce sendo direcionadas para outros tratamentos. Houve ainda pacientes que tiveram condições clínicas para esse tratamento adjuvante.

É motivo de preocupação o tempo entre o fim do tratamento sistêmico e a cirurgia proposta para cada paciente, que deve ser idealmente entre 4 e 8 semanas (228). Dados da literatura mostram uma média de 30 dias, dentro do proposto (229). Porém nossa média foi de 3,52 meses ou 105 dias, mas isso aconteceu como consequência do fato de que uma paciente teve um intervalo de sete meses e outra de dez meses. Analisando nossos dados, a mediana foi de 2 meses de intervalo, mais consistente com a literatura.

A radioterapia segue critérios impostos pelo estadiamento TNM, portanto qualquer cirurgia conservadora que não tenha contraindicação deve ser irradiada, e após mastectomia as principais indicações são 4 ou mais linfonodos comprometidos por doença ou estadiamento III (230).

As publicações nesse contexto focam em discutir recorrência local após esse tratamento para certificar a eficácia da radioterapia. Em um trabalho com 77 pacientes, 57,1% foram submetidas à mastectomia e 38,9% do total de pacientes representavam as pacientes que foram submetidas a cirurgia radical seguida de radioterapia, do universo apenas desse tipo de cirurgia foram 47,7% pacientes encaminhadas para esse tratamento local adjuvante (231). Do nosso total de pacientes, 67,5% foram submetidas a mastectomia, e 51,3% foram pacientes submetidas à cirurgia radical seguida de radioterapia, mas ao analisar apenas as pacientes desse grupo cirúrgico 76% se enquadram nesse combo de tratamento. Isso pode ser explicado pelo fato de o diagnóstico na nossa população acontecer mais em estadiamentos localmente avançados.

Entender a expressão dos infiltrados linfocitários nesses tumores é um ponto crucial nesse estudo, uma vez que a literatura relaciona o aumento da expressão de TILs com maiores índices de resposta patológica completa (232). A densidade mínima de TILs no estroma tumoral não tem um valor estipulado para análise, estudos conseguem

fazer análise com densidade média pouco acima de 10% no estroma tumoral de tumores triplo negativos (233), nossa média de densidade de TILs foi de 25% consagrando como adequadas as amostras analisadas.

Em uma meta-análise que teve objetivo investigar o valor prognóstico dos TILs em TNBC, considerou 30% ponto de corte para separar em alta e baixa expressão de TILs após levantar as médias dos estudos analisados (232). Nosso ponto de corte foi 32,5% após comparar as medianas dos grupos de pacientes com e sem pCR, valor bem similar a literatura.

Em publicação recente, em que buscou-se analisar a sensibilidade e especificidade dos TILs para prever resposta patológica completa em TNBC, encontrou-se sensibilidade de 78%, especificidade de 50% com acurácia de 66,7% (234). Nossos dados variaram entre: sensibilidade de 75%, especificidade de 33% e acurácia de 40%. Essas variações entre amostras são esperadas uma vez que os tumores são heterogêneos e os TILs não são os únicos fatores que interferem na resposta patológica, mas a proximidade das análises mostra como o infiltrado linfocitário se comporta como preditor de resposta nesses tumores triplo-negativos.

No entanto, falta uma recomendação formal de um valor de corte clinicamente relevante que categorize os tumores de mama como tendo alta infiltração linfocítica, o que dificulta o estabelecimento de um padrão universal para essa variável como biomarcador de resposta terapêutica. Meta-análises revelam valores de corte que variam de 10 a 60% (208,235).

A relevância de TILs elevados como biomarcadores de boa resposta terapêutica tem maior valor clínico para tumores TNBC em comparação com outros subtipos de câncer de mama (236). Ochi et al (237) categorizaram os tumores em três grupos: TILs baixos (0-9%), intermediários (10-49%) e TILs altos ($\geq 50\%$), sendo este último conhecido como CB predominantemente linfocitário (LP). As taxas de pCR em tumores TNBC com TILs baixos são de 4%, em comparação com 43,6% naqueles com TILs intermediários ou altos. Em tumores HER-2-positivos, as taxas de pCR são de 26% vs. 51,9%, respectivamente, e significativas em ambos os casos (237).

Loi et al. (238) observaram TILs mais elevados em TNBC (n = 134) e HER2+ (n = 209) em comparação com subtipos de câncer de mama luminal (n = 591). A mediana do segundo quartil da expressão de TILs foi de 25,0, 15,0 e 7,5% para esses tipos de tumores, respectivamente. Apesar da variabilidade substancial nas porcentagens de infiltração para os grupos TNBC, HER2+ e luminal, o quartil superior apresentou 40,0,

30,0 e 12,5% de infiltração, respectivamente (237). Isso está alinhado com os achados de Stanton et al, que demonstraram TNBC e HER2+ como subtipos mais frequentes de alta expressão de TILs (239,240). Denkert et al. reforçaram esses achados, relatando altas porcentagens de TILs ($> 60\%$) em 30% dos tumores de TNBC, 19% em HER2+ e 13% em tumores luminal-HER2-negativos (165).

Loi et al identificaram TILs (alta expressão com ponto de corte $\geq 50\%$) como preditores de bom prognóstico para sobrevida livre de doença a distância em TNBC, mas não em HER2+ ou luminal (238). Além disso, Russo et al. (241) corroboraram esses achados ao utilizar TILs $\geq 30\%$ para a classificação de alta expressão, um ponto de corte derivado de Liu et al (242).

Em uma análise de 41 amostras de TNBC, Russo et al constataram que 34% apresentavam TILs $>30\%$, com uma taxa de pCR de 78,6% (11/14) em comparação com 14,8% (4/27) naqueles com TILs $<30\%$. Além disso, uma taxa de pCR significativa de 71,4% foi observada em indivíduos HER2+ com TILs $>30\%$ (241).

Um aspecto fundamental do uso de TILs para prognóstico é determinar a porcentagem apropriada de infiltração linfocítica que caracteriza os tumores com alta expressão de TILs. Um valor de corte amplamente aceito é de 50% para alta infiltração linfocítica, conforme recomendado pelo TILs Working Group (163). Estabelecer esse limiar é fundamental para as decisões de tratamento e a avaliação prognóstica.

Salgado et al propuseram a classificação de LPBC para tumores com “mais linfócitos do que células tumorais”, o que significa que apresentam 50-60% de infiltração linfocítica (163). Denkert et al. relataram que 40% dos pacientes com alta expressão ($>50\%$ de TILs) alcançaram pCR em comparação com 7% dos pacientes sem infiltração linfocitária (165).

O uso de um ponto de corte de TILs $>50\%$ como marcador significativo de infiltração apresenta limitações em relação à sensibilidade, visto que relativamente poucos tumores de mama atingem esse ponto de corte. Stanton et al (57, 63) constataram que aproximadamente 20% dos tumores TNBC e HER2+ apresentam expressão de TILs $>50\%$ (240).

Denkert et al. avaliaram 3.771 amostras, relatando pCR em 50% dos tumores TNBC com alto TIL e 48% dos tumores HER2+ com alto TIL ($>60\%$ TILs) (53). As taxas de pCR para TNBC e HER2+ com infiltração intermediária (11-59%) foram de 31 e 39%, respectivamente. Portanto, um ponto de corte entre 11 (baixa infiltração) e 50%

(alta infiltração) poderia aumentar a sensibilidade para identificar indivíduos com prognóstico favorável sem comprometer a precisão discriminativa (165).

Alguns estudos utilizaram pontos de corte entre 30 e 50% para definir alta expressão de TILs. Uma análise da Bélgica utilizou um ponto de corte de 40% (243), enquanto outros estudos na Venezuela, Bélgica e Itália utilizaram um ponto de corte de 30% (241,244,245).

Uma avaliação mais ampla dos pontos de corte foi realizada em dois estudos multicêntricos. Um incluiu Austrália, Europa (França, Itália, Finlândia, Bélgica, Alemanha) e os Estados Unidos, que avaliou amostras de pacientes com TNBC para avaliar o valor prognóstico dos TILs (246), e outro envolvendo quatro centros da França, Itália e Coreia do Sul (209).

Em 2.148 indivíduos, o TIL exibiu um intervalo interquartil de 10 a 30%, com uma mediana de 15%. Notavelmente, cerca de um terço dos pacientes apresentaram TILs $\geq 30\%$, ampliando o grupo de indivíduos beneficiados pelo biomarcador em comparação com estudos que utilizaram TILs de 50%, o que estava presente em um quinto dos pacientes (238,239). O ponto de corte de 30% alinha-se com o Q3, indicando 30% de infiltração linfocitária como parâmetro limite (246).

Park et al. investigaram se TILs $\geq 30\%$ identificam aqueles que podem não necessitar de quimioterapia adjuvante. Pacientes com TNBC em estágio I (n=74) apresentaram sobrevida livre de doença em 5 anos de 91% (IC de 95% 84-96%) e sobrevida global de 98% (IC de 95% 95-100%). Esse estudo utilizou o ponto de corte de 30%, consistente com Loi et al. (246). Sua mediana foi menor (10 vs. 15%), enquanto o terceiro quartil permaneceu em 30%, confirmando sua consistência (209).

TILs estromais $\geq 30\%$ podem representar um subgrupo de pacientes com TNBC estágio I com excelente prognóstico sem terapia adjuvante. Isso sugere que grupos vulneráveis, como idosos ou aqueles com comorbidades, podem ser poupados da toxicidade e dos custos da quimioterapia adjuvante sem comprometer as taxas de sobrevida. Além disso, a avaliação de TILs a 30% pode gerar boa reprodutibilidade entre patologistas, visto que, nesse nível, as diferenças visuais são mais fáceis de serem detectadas. No entanto, o uso de biomarcadores exige cautela em relação aos critérios diagnósticos clínicos estabelecidos, como tamanho do tumor e estado dos linfonodos, para refinar a análise patológica e os insights terapêuticos para cada caso clínico (247).

Russo et al., Floris et al. e Dieci et al. demonstraram boa capacidade discriminativa com um ponto de corte de TIL de 30% (241,244,245). Russo et al. relataram uma

incidência cinco vezes maior de pCR em pacientes com TILs $\geq 30\%$ em comparação com aqueles com TILs $< 30\%$ (58,5 vs. 11,0%) (241).

Limiares de TIL de 30% ou 50% não apenas servem como biomarcadores promissores para orientar a redução da quimioterapia em TNBC em estágio inicial, mas também informam decisões terapêuticas relacionadas a inibidores de ponto de controle imunológico. A mensuração da expressão de TIL e PD-L1 auxilia na identificação de tumores imunoenriquecidos, melhorando assim a seleção de pacientes com TNBC avançado com probabilidade de resposta a inibidores de PD-1/PD-L1 (248).

O limite de 30% é particularmente inclusivo, permitindo a identificação de uma população de pacientes mais ampla em comparação com o limite mais rigoroso de 50%, que é menos frequentemente alcançado na prática clínica (239,240)

Após essa vasta revisão encontramos e determinamos nosso valor de corte baseado no quartil superior de número de amostras das nossas paciente de 32,5%, o que está bem consistente com a literatura, conforme mostrado na tabela 12 e Figuras 10 e 11.

Compreendendo o papel dos TILs na oncologia mamária surgiu então a necessidade de entender quais seriam os fatores que interferem no aumento desses infiltrados nesses tumores. Encontramos o CD3 como a principal variável preditora de TILs na nossa amostra em análise de regressão linear múltipla com $p < 0,01$ e isso é comprovado pela literatura, quando também foi demonstrado que o CD3 teve maior impacto como memória citotóxica efetiva (162).

Embora a amostra seja relativamente pequena reconhecemos que a busca por novos marcadores deve começar com um número reduzido de amostras para avaliar sua relevância, antes de investir tempo e recursos em uma amostra maior. Optou-se por microRNAs por serem biomarcadores viáveis para estudo nas biópsias tumorais permitindo escalabilidade na translação do laboratório de pesquisa para laboratório clínico, já que se baseia em reações de qPCR, técnica que já é utilizada em outros testes de oncologia que examinam a expressão múltiplos alvos para fins de diagnóstico e prognóstico (249).

Quanto ao tema específico do presente estudo, há evidências científicas sólidas de que microRNAs regulam a comunicação de células do sistema imune no ambiente do tumor mamário, com papel na tumorigênese (250). Neste sentido um trabalho anterior evidenciou que a expressão do microRNA miR-155 se mostrou promissora como preditor da expressão de TILs (251). No entanto, tal achado precisaria ser examinado em novas

coortes de pacientes para validações adicionais, envolvendo instituições de outros países, como nos hospitais do Distrito Federal do presente estudo.

Fazendo análise a nível molecular o miR-155 mostrou sua relação positiva importante com fatores prognósticos do TNBC como já apresentado anteriormente. Justamente por isso foi importante calcular a influência desse microRNA na expressão de TILs, e encontramos uma acurácia de 81% e $p = 0,03$ nessa relação molecular. A afirmação de que a superexpressão de miR-155 aumenta a infiltração imunológica antitumoral foi feita em 2022 quando, *in vitro*, demonstraram que o aumento de miR-155 favoreceu o combate tumoral com maior recrutamento de células imunológicas e a sua deficiência esteve relacionada com a progressão tumoral por falta de recrutamento das células imunes (251).

Uma das perguntas biológicas foi se a combinação miR-155 + CD3 iria corroborar os dados de miR-155 isoladamente e se, ao combinarem-se esses dois alvos de natureza distinta, haveria melhora no desempenho do biomarcador de infiltração linfocitária, ou seja, se ficaria mais acurado, sensível, e específico, com uma superior razão de verossimilhança.

Considerando que os tumores de mama triplo negativo são heterogêneos e o impacto do tratamento dos mesmos é multifatorial, a associação da variável linfocitária que mais prediz a expressão de TILs, o CD3, com a variável molecular estudada, miR-155 como cofatores responsáveis em favorecer o ambiente imunológico no TNBC demonstrou na nossa amostra acurácia de 98% com $p = 0,01$, sendo descrito pela primeira vez esse importante dado.

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A investigação de biomarcadores, como linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) e microRNAs, é fundamental na oncologia mamária, especialmente no câncer de mama triplo negativo (TNBC), um subtipo agressivo.

A presença de TILs, que indicam uma resposta imunológica eficaz, está ligada a melhores prognósticos, destacando seu papel como marcadores de eficácia de tratamento. O presente estudo mostrou uma maior proporção de resposta patológica completa em pacientes com TNBC com altos níveis de TILs, e essa diferença foi significativa.

Os microRNAs desempenham um papel crucial na regulação de processos tumorais, incluindo proliferação celular e metástase, e são potenciais biomarcadores na oncologia mamária.

O miR-155 isoladamente demonstrou um bom preditor molecular de TILs nos tumores de mama triplo-negativos, com acurácia de 81%. E a associação de miR-155 e CD3 demonstrou uma acurácia (98%) ainda maior na identificação de TNBC com altos níveis de infiltração linfocitária.

Esses resultados são promissores para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e prognósticas mais precisas, permitindo tratamentos personalizados e melhor manejo clínico. Entretanto é crucial realizar novos estudos com um número ampliado de amostras em coortes independentes para validar essas descobertas.

A ampliação das pesquisas sobre esses biomarcadores poderá enriquecer a compreensão da biologia tumoral e facilitar a adoção de estratégias terapêuticas inovadoras na oncologia mamária.

Considerando avanços posteriores os resultados do presente estudo, na busca de um biomarcador de infiltração linfocitária na biópsia poderiam no futuro, motivar pesquisas translacionais para um biomarcador circulante, ou seja, nas biópsias líquidas a partir de amostras do sangue, desde que houvesse boa acurácia de miR-155 nas biopsias tumorais como ponto de partida.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hatton IA, Galbraith ED, Merleau NSC, Miettinen TP, Smith BMD, Shander JA. The human cell count and size distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(39).
2. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, *Cell*. 2000.
3. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol*. 2013 Nov;40(6):463–71.
4. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. Vol. 7, *World Journal of Clinical Oncology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited; 2016. p. 54–86.
5. NATIONAL CANCER INSTITUTE. What is cancer? Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition>.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209–49.
7. <https://gco.iarc.fr/today/en>.
8. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer. 2023.
9. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023 Jan;73(1):17–48.
10. Bedard PL, Hyman DM, Davids MS, Siu LL. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *Lacet*. 2020 Mar 28;395(10229):1078–88.
11. Drake R, Vogl A, Mitchell A. Gray's Anatomy for students. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2015. 1–1161 p.
12. Lucena C, Paulinelli R, Pedrini JL. Oncoplastia e reconstrução mamária. 1st ed. Vol. 1. Rio de Janeiro: MEDBOOK; 2017. 3–16 p.
13. Biazus J, Melo M, Zucatto A. Cirurgia da mama. 2nd ed. orto Alegre: Artmed; 2012. 13–38 p.
14. Radu I, Scripcariu V, Panuța A, Rusu A, Afrăsânie VA, Cojocaru E, et al. Breast Sarcomas—How Different Are They from Breast Carcinomas? Clinical, Pathological, Imaging and Treatment Insights. *Diagnostics*. 2023 Apr 1;13(8).
15. Elston CW, Ellis O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up Pathological prognostic factors in breast cancer. 1. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Vol. 19, *Histopathology*. 1991.
16. Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, Maisonneuve P, Rotmensz N, Galimberti V, et al. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: Results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer*. 2008 Oct 1;113(7):1511–20.
17. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. Vol. 77, *Histopathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2020. p. 181–5.
18. Moran MS, Yang Q, Haffty BG. The yale university experience of early-stage invasive lobular carcinoma (ILC) and invasive ductal carcinoma (IDC) treated with breast conservation treatment (BCT): Analysis of clinical-pathologic features,

- long-term outcomes, and molecular expression of COX-2, Bcl-2, and p53 as a function of histology. *Breast Journal*. 2009 Nov;15(6):571–8.
19. Bagnoli F, Mansani F, Breneli F, Pedrini J, Freitas Júnior R, Oliveira V. *Mastologia: do diagnóstico ao tratamento*. 2nd ed. Goiânia: Conexão Soluções Corporativas; 2022. 383–384 p.
 20. Jenkins S, Kachur ME, Rechache K, Wells JM, Lipkowitz S. *Rare Breast Cancer Subtypes*. Vol. 23, *Current Oncology Reports*. Springer; 2021.
 21. Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* [Internet]. 2000 Aug 17;406(6797):747–52. Available from: www.stanford.edu/molecularportraits/
 22. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast Journal*. 2009 Nov;15(6):593–602.
 23. Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: Insights into physiology and therapeutics. Vol. 72, *Annual Review of Physiology*. 2009. p. 247–72.
 24. Allison KH, Elizabeth ; M, Hammond H, Dowsett ; Mitchell, Mckernin SE, Carey LA, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol* [Internet]. 2020;38:1346–66. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.2105-22>.
 25. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Simopoulos C, Polychronidis A, Gatter KC, Harris AL, et al. c-erbB-2 Related Aggressiveness in Breast Cancer Is Hypoxia Inducible Factor-1 Dependent. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2004 Dec 1;10(23):7972–7. Available from: <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/10/23/7972/1954580/zdf02304007972.pdf>
 26. Wolff AC, Elizabeth M, Hammond H, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, et al. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. *J Clin Oncol* [Internet]. 2018;36:2105–22. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.2105-22>.
 27. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Nov 1;31(31):3997–4013.
 28. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021 Aug 15;149(4):778–89.
 29. INCA. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama>. 2022. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama>.
 30. Bevers TB, P C, Sardesai S, Chair V, Arun BK, Colditz GA, et al. NCCN Guidelines Version 1.2025 Breast Cancer Risk Reduction Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures [Internet]. 2024. Available from: <https://www.nccn.org/home/member->
 31. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan;71(1):7–33.
 32. Britt KL, Cuzick J, Phillips KA. Key steps for effective breast cancer prevention. Vol. 20, *Nature Reviews Cancer*. Nature Research; 2020. p. 417–36.
 33. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, Huang H, Lee KY, Na J, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2021 Feb 4;384(5):440–51.

34. Dwyer, Mary. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic [Internet]. 2024. Available from: <https://www.nccn.org/home/member->
35. Wong SM, King T, Boileau JF, Barry WT, Golshan M. Population-Based Analysis of Breast Cancer Incidence and Survival Outcomes in Women Diagnosed with Lobular Carcinoma In Situ. *Ann Surg Oncol*. 2017 Sep 1;24(9):2509–17.
36. Suzuki R, Orsini N, Saji S, Key TJ, Wolk A. Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status-A meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009 Feb 1;124(3):698–712.
37. Chlebowski RT, Anderson GL, Aragaki AK, Manson JE, Stefanick ML, Pan K, et al. Association of Menopausal Hormone Therapy with Breast Cancer Incidence and Mortality during Long-term Follow-up of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2020 Jul 28;324(4):369–80.
38. Soldato D, Michiels S, Havas J, Di Meglio A, Pagliuca M, Franzoi MA, et al. Dose/Exposure Relationship of Exercise and Distant Recurrence in Primary Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2024 Jun 5;
39. V Beral DBRDRPGRDS (chairman), GCBHCLVCMTMBPMPDTF van L. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet*. 2002 Jul;360:187–95.
40. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Teras LR, Campbell PT, Patel A V. Oophorectomy and hysterectomy and cancer incidence in the cancer prevention study-II nutrition cohort. *Obstetrics and Gynecology*. 2014;123(6):1247–55.
41. Fenton JJ, Rolnick SJ, Harris EL, Barton MB, Barlow WE, Reisch LM, et al. Specificity of clinical breast examination in community practice. *J Gen Intern Med*. 2007 Mar;22(3):332–7.
42. Chiarelli AM, Majpruz V, Brown P, Thériault M, Shumak R, Mai V. The contribution of clinical breast examination to the accuracy of breast screening. *J Natl Cancer Inst*. 2009 Sep;101(18):1236–43.
43. Provencher L, Hogue JC, Desbiens C, Poirier B, Poirier E, Boudreau D, et al. Is clinical breast examination important for breast cancer detection? *Current Oncology*. 2016;23(4):e332–9.
44. Miller AB, Wall C, Baines CJ, Sun P, To T, Narod SA. Twenty five year follow-up for breast cancer incidence and mortality of the Canadian National Breast Screening Study: Randomised screening trial. *BMJ (Online)*. 2014 Feb 11;348.
45. Sharpe RE, Venkataraman S, Phillips J, Dialani V, Fein-Zachary VJ, Prakash S, et al. Increased cancer detection rate and variations in the recall rate resulting from implementation of 3D digital breast tomosynthesis into a population-based screening program. *Radiology*. 2016 Mar 1;278(3):698–706.
46. Lee JM, Arao RF, Sprague BL, Kerlikowske K, Lehman CD, Smith RA, et al. Performance of Screening Ultrasonography as an Adjunct to Screening Mammography in Women Across the Spectrum of Breast Cancer Risk. *JAMA Intern Med*. 2019 May 1;179(5):658–67.
47. Phi XA, Houssami N, Hooning MJ, Riedl CC, Leach MO, Sardanelli F, et al. Accuracy of screening women at familial risk of breast cancer without a known gene mutation: Individual patient data meta-analysis. Vol. 85, *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd; 2017. p. 31–8.

48. Freitas R, Rodrigues DCN, Da Silveira Corrêa R, Peixoto JE, De Oliveira HVCG, Rahal RMS. Contribution of the unified health care system to mammography screening in Brazil, 2013. *Radiol Bras*. 2016 Sep 1;49(5):305–10.
49. Hellquist BN, Duffy SW, Abdsaleh S, Björneld L, Bordás P, Tabár L, et al. Effectiveness of population-based service screening with mammography for women ages 40 to 49 years. *Cancer*. 2011 Feb 15;117(4):714–22.
50. Mao Z, Nyström L, Jonsson H. Effectiveness of Population-Based Service Screening with Mammography for Women Aged 70–74 Years in Sweden. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2020 Nov 1;29(11):2149–56.
51. Bevers TB, P C, Niell BL, φ VC, Aminololama-Shakeri S, Baker JL, et al. NCCN Guidelines Version 2.2024 Breast Cancer Screening and Diagnosis Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures [Internet]. 2024. Available from: <https://www.fda.gov/media/131885/download>
52. ACR BI-RADS® ATLAS-Mammography.
53. Silverstein MJ, Lagios MD, Recht A, Allred DC, Harms SE, Holland R, et al. Image-detected breast cancer: State of the art diagnosis and treatment. In: *Journal of the American College of Surgeons*. 2005. p. 586–97.
54. Wesoła M, Jeleń M. The Diagnostic Efficiency of Fine Needle Aspiration Biopsy in Breast Cancers-Review. *Adv Clin Exp Med*. 2013 Nov;22(6):887–92.
55. Montezuma D, Malheiros D, Schmitt FC. Breast fine needle aspiration biopsy cytology using the newly proposed iac yokohama system for reporting breast cytopathology: The experience of a single institution. *Acta Cytol*. 2019 Jun 1;63(4):274–9.
56. Boiron D, Dauchy S, Charles C, Fasse L, Cano A, Balleyguier C, et al. Patient satisfaction with a rapid diagnosis of suspicious breast lesions: Association with distress and anxiety. *Breast Journal*. 2018 Mar 1;24(2):154–60.
57. Schünemann HJ, Lerda D, Quinn C, Follmann M, Alonso-Coello P, Rossi PG, et al. Breast cancer screening and diagnosis: A synopsis of the european breast guidelines. *Ann Intern Med*. 2020 Jan 7;172(1):46–56.
58. Quinn-Laurin V, Hogue JC, Pinault S, Duchesne N. Vacuum-assisted complete excision of solid intraductal/intracystic masses and complex cysts: Is follow-up necessary? *Breast*. 2017 Oct 1;35:42–7.
59. Cserni G, Francz M, Járny B, Kálmán E, Kovács I, Krenács T, et al. Pathological Diagnosis, Work-Up and Reporting of Breast Cancer 1st Central-Eastern European Professional Consensus Statement on Breast Cancer. Vol. 28, *Pathology and Oncology Research*. Frontiers Media S.A.; 2022.
60. Brieley JD, Gospodarowicz Mary K, Wittekind Christian. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition - Union For International Cancer Control. 8th ed. Brieley JD, editor. Vol. 1. Wiley-Blackwell; 2016. 1–272 p.
61. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging . *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93–9.
62. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015 Nov 19;373(21):2005–14.
63. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016 Aug 25;375(8):717–29.

64. Alves da Quinta D, Rocha D, Retamales J, Giunta D, Artagaveytia N, Velazquez C, et al. Closing the gap: prognostic and predictive biomarker validation for personalized care in a Latin American hormone-dependent breast cancer cohort. *Oncologist* [Internet]. 2024 Aug 8; Available from: <https://academic.oup.com/oncolo/advance-article/doi/10.1093/oncolo/oyae191/7730117>
65. Tolaney SM, Guo H, Pernas S, Barry WT, Dillon DA, Ritterhouse L, et al. Seven-Year Follow-Up Analysis of Adjuvant Paclitaxel and Trastuzumab Trial for Node-Negative, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer [Internet]. Vol. 37, *J Clin Oncol*. 2019. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.37.1>
66. von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019 Feb 14;380(7):617–28.
67. Korde LA, Somerfield MR, Carey LA, Crews JR, Hershman DL. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer-ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(13):1485–505.
68. Halsted WS. The results of Radical operations for cure of Carcinoma of the breast. *Ann Surg*. 1907 Jul;46(1):1–19.
69. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Zucali R. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N Engl J Med*. 1981;305(1):7–11.
70. De-La-Cruz-Ku G, Valcarcel B, Morante Z, Moller MG, Gomez HL. Breast-conserving surgery vs. total mastectomy in patients with triple negative breast cancer in early stages: A propensity score analysis. *Breast Dis*. 2020;39(1):29–35.
71. Rosenkranz KM, Ballman K, McCall L, Kubicky C, Cuttino L, Le-Petross H, et al. The feasibility of breast-conserving surgery for multiple ipsilateral breast cancer: An initial report from ACOSOG Z11102 (Alliance) trial. *Ann Surg Oncol*. 2023 Jun 30;30(6):3281.
72. Lisa A, Newman MD. Decision Making in the Surgical Management of Invasive Breast Cancer-Part 2: Expanded Applications for Breast-Conserving Surgery. *Oncology*. 2017 May 15;31(5):415–20.
73. Kaufmann M, Morrow M, Von Minckwitz G, Harris JR. Locoregional treatment of primary breast cancer: Consensus recommendations from an international expert panel. Vol. 116, *Cancer*. 2010. p. 1184–91.
74. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, Fleige B, Hausschild M, Helms G, et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): A prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol*. 2013 Jun;14(7):609–18.
75. Demirors B, Goktepe B, Medeck H, Ozbas S, Soran A. The Role of Primary Surgery in De Novo Metastatic Breast Carcinoma. Vol. 19, *European Journal of Breast Health*. Galenos Publishing House; 2023. p. 110–4.
76. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Láng I, Ciruelos E, Bellet M, et al. Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015 Jan 29;372(5):436–46.
77. Tevaarwerk AJ, Wang M, Zhao F, Fetting JH, Cella D, Wagner LI, et al. Phase III comparison of tamoxifen versus tamoxifen plus ovarian function suppression in premenopausal women with node-negative, hormone receptor-positive breast cancer (E-3193, INT-0142): A trial of the eastern cooperative oncology group. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Dec 10;32(35):3948–58.

78. LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview Group, Cuzick J, Ambroisine L, Davidson N, Sainsbury R. Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. *Lancet*. 2007 May 19;369(9574):1711–23.
79. Bradley R, Burrett J, Clarke M, Davies C, Duane F, Evans V, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. *The Lancet*. 2015 Oct 3;386(10001):1341–52.
80. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *The Lancet*. 2013;381(9869):805–16.
81. Bartlett JMS, Sgroi DC, Treuner K, Zhang Y, Ahmed I, Piper T, et al. Breast Cancer Index and prediction of benefit from extended endocrine therapy in breast cancer patients treated in the Adjuvant Tamoxifen—To Offer More? (aTTom) trial. *Annals of Oncology*. 2019 Nov 1;30(11):1776–83.
82. Chumsri S, Brodie A. Aromatase inhibitors and breast cancer. *Horm Mol Biol Clin Invest*. 2012;9(2):119–26.
83. Johnston SR, Harbeck N, Hegg R, Toi M, Martin M, Min Shao Z, et al. Abemaciclib Combined With Endocrine Therapy for the Adjuvant Treatment of HR1, HER22, Node-Positive, High-Risk, Early Breast Cancer (monarchE). *J Clin Oncol* [Internet]. 2020;38:3987–98. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2019.38.3987>.
84. Fasching PA, Slamon D, Nowecki Z, et al. Health-related quality of life in patients with HR+/HER2- early breast cancer treated with ribociclib plus a nonsteroidal aromatase inhibitor: results from the NATALEE trial. *Clin Cancer Res*. 2025 Feb 28;
85. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2011;14(6):1273–83.
86. Von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 May 20;30(15):1796–804.
87. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T, Costes J. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2278–84.
88. Modi S, Saura C, Yamashita T, Park YH, Kim SB, Tamura K, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 13;382(7):610–21.
89. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022 Jul 7;387(1):9–20.
90. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG), Peto R, Davies C, Pritchard K. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *The Lancet* [Internet]. 2012 Feb 4;379:432–44. Available from: www.thelancet.com

91. Gray R, Bradley R, Braybrooke J, Liu Z, Peto R, Davies L, et al. Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials. *The Lancet*. 2019 Apr 6;393(10179):1440–52.
92. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: Updates of national surgical adjuvant breast and bowel project protocols B-18 and B-27. Vol. 26, *Journal of Clinical Oncology*. 2008. p. 778–85.
93. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Alberto L, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Oct 17;347(3):1227–32.
94. McGale P, Taylor C, Correa C, Cutter D, Duane F, Ewertz M, et al. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: Meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *The Lancet*. 2014 Jan 1;383(9935):2127–35.
95. Hickey BE, James ML, Lehman M, Hider PN, Jeffery M, Francis DP, et al. Fraction size in radiation therapy for breast conservation in early breast cancer. Vol. 2016, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2016.
96. Haviland JS, Owen R, Dewar JA, Barret J, Yarnold JR. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. *Lancet Oncol*. 2013 Sep;14:1086–94.
97. Murray Brunt A, Haviland JS, Sydenham M, Agrawal RK, Algurafi H, Alhasso A, et al. Ten-Year Results of FAST: A Randomized Controlled Trial of 5-Fraction Whole-Breast Radiotherapy for Early Breast Cancer [Internet]. Vol. 38, *J Clin Oncol*. 2020. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15.15>.
98. Veronesi U, Orecchia R, Maisonneuve P, Viale G, Rotmensz N, Sangalli C, et al. Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): A randomised controlled equivalence trial. *Lancet Oncol*. 2013 Dec;14(13):1269–77.
99. Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, Zedeler K. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. *New Engl J Med*. 1997 Oct 2;337(14):949–55.
100. Whelan TJ, Julian JA, Berrang TS, Kim DH, Germain I, Nichol AM, et al. External beam accelerated partial breast irradiation versus whole breast irradiation after breast conserving surgery in women with ductal carcinoma in situ and node-negative breast cancer (RAPID): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2019 Dec 14;394(10215):2165–72.
101. Vicini FA, Cecchini RS, Whaite JR, Kuske RR. Long-term primary results of accelerated partial breast irradiation after breast-conserving surgery for early-stage breast cancer: a randomised, phase 3, equivalence trial. *Lancet*. 2019 Dec 14;394(10215):2155–64.
102. Fowble BL, Einck JP, Kim DN, McCloskey S, Mayadev J, Yashar C, et al. Role of postmastectomy radiation after neoadjuvant chemotherapy in stage II-III breast cancer. Vol. 83, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2012. p. 494–503.

103. Richardson LC, Henley ; S Jane, Miller JW, Massetti G, Thomas CC. Program and mortality data from the National Vital Statistics System (2). Data on new cases of invasive (malignant) breast cancer* diagnosed during 1999-2013 were obtained from population-based cancer registries affiliated with NPCR or SEER programs in each state and the District of Columbia Morbidity and Mortality Weekly Report Patterns and Trends in Age-Specific Black-White Differences in Breast Cancer Incidence and Mortality-United States, 1999-2014. Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. 2016 Oct 14;65(40). Available from: http://www.cdc.gov/mmwr/cme/conted_info.html#weekly.
104. Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21(1):50–7.
105. Khatcheressian JL, Hurley P, Bantug E, Esserman LJ, Grunfeld E, Halberg F, et al. Breast cancer follow-up and management after primary treatment: American society of clinical oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 Mar 1;31(7):961–5.
106. Moschetti I, Cinquini M, Lambertini M, Levaggi A, Liberati A. Follow-up strategies for women treated for early breast cancer. Vol. 2016, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2016.
107. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Vol. 28, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2010. p. 2784–95.
108. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes and Control*. 2009 Sep;20(7):1071–82.
109. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011 Mar 1;17(5):1082–9.
110. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Smith L V, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer NIH Public Access. Vol. 109, *Breast Cancer Res Treat*. 2008.
111. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007 Aug 1;13(15):4429–34.
112. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathology*. 2006 Feb;19(2):264–71.
113. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012 Jun 21;486(7403):395–9.
114. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015 Apr 1;21(7):1688–98.
115. Steenbruggen TG, van Werkhoven E, van Ramshorst MS, Dezentjé VO, Kok M, Linn SC, et al. Adjuvant chemotherapy in small node-negative triple-negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 2020 Aug 1;135:66–74.

116. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, Von Minckwitz G, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: Pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. Vol. 26, *Journal of Clinical Oncology*. 2008. p. 814–9.
117. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 Mar 10;26(8):1275–81.
118. Downs-Canner S, Mittendorf EA. Preoperative Immunotherapy Combined with Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: Perspective on the KEYNOTE-522 Study. *Annals of Surgical Oncology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023.
119. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 27;382(9):810–21.
120. Schmid P, Cortes J, Dent R, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, et al. Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2022 Feb 10;386(6):556–67.
121. FDA. FDA approves pembrolizumab for high-risk early-stage triple-negative breast cancer. 2021. FDA approves pembrolizumab for high-risk early-stage triple-negative breast cancer. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pembrolizumab-high-risk-early-stage-triple-negative-breast-cancer> (Accessed on August 26, 2021).
122. Shah AN, Flaum L, Helenowski I, Santa-Maria CA, Jain S, Rademaker A, et al. Phase II study of pembrolizumab and capecitabine for triple negative and hormone receptor-positive, HER2-negative endocrine-refractory metastatic breast cancer. *J Immunother Cancer*. 2020 Feb 13;8(1).
123. Yu EY, Piulats JM, Gravis G, Fong PCC, Todenhöfer T, Laguerre B, et al. Pembrolizumab plus Olaparib in Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Long-term Results from the Phase 1b/2 KEYNOTE-365 Cohort A Study. Vol. 83, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2023. p. e87.
124. Schmid P, Cortes J, Dent R, McArthur H, KEYNOTE-522 investigators. Overall Survival with Pembrolizumab in Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J med*. 2024 Nov 28;391(21):1981–91.
125. Sharma P, Stecklein SR, Yoder R, Staley JM, O'Shaughnessy J. Clinical and Biomarker Findings of Neoadjuvant Pembrolizumab and Carboplatin Plus Docetaxel in Triple-Negative Breast Cancer NeOPACT Phase 2 Clinical Trial. *JAMA*. 2024 Feb 1;10(2):227–35.
126. Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, et al. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Apr 1;19(4):497–509.
127. Hahnen E, Lederer B, Hauke J, Loibl S, Kröber S, Schneeweiss A, et al. Germline mutation status, pathological complete response, and disease-free survival in triple-negative breast cancer: Secondary analysis of the GeparSixto randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2017 Oct 1;3(10):1378–85.
128. Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B, Viale G, Fumagalli D, Rastogi P, et al. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1 - or BRCA2 -Mutated Breast Cancer . *New England Journal of Medicine*. 2021 Jun 24;384(25):2394–405.

129. Masuda N, Lee SJ, Ohtani S, Im YH, Lee ES, Yokota I, et al. Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 2017 Jun;376(22):2147–59.
130. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3108–14.
131. Anders CK, Deal AM, Miller CR, Khorram C, Meng H, Burrows E, et al. The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases. *Cancer*. 2011 Apr 15;117(8):1602–11.
132. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Vol. 28, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2010. p. 2784–95.
133. Lash TL, Fox MP, Buist DSM, Wei F, Field TS, Frost FJ, et al. Mammography surveillance and mortality in older breast cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Jul 20;25(21):3001–6.
134. Lash TL, Fox MP, Buist DSM, Wei F, Field TS, Frost FJ, et al. Mammography surveillance and mortality in older breast cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology*. 2007 Jul 20;25(21):3001–6.
135. Berg WA, Zhang Z, Lehrer D, Jong RA, Pisano ED, Barr RG, et al. Detection of breast cancer with addition of annual screening ultrasound or a single screening MRI to mammography in women with elevated breast cancer risk. *JAMA*. 2012 Mar 28;307(13):1394–404.
136. Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach MO, Lehman CD, et al. American Cancer Society Guidelines for Breast Screening with MRI as an Adjunct to Mammography. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2007 Mar 1;57(2):75–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/canjclin.57.2.75>
137. Amir E, Clemons M. Should a biopsy be recommended to confirm metastatic disease in women with breast cancer? *Lancet Oncol*. 2009 Oct;10(10):933–5.
138. Egger SJ, Chan MMK, Luo Q, Wilcken N. Platinum-containing regimens for triple-negative metastatic breast cancer. Vol. 2020, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2020.
139. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Karantza V. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *The Lancet*. 2020 Dec;396(10256):1817–28.
140. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation . *New England Journal of Medicine*. 2017 Aug 10;377(6):523–33.
141. Litton JK, Hurvitz SA, Mina LA, Rugo HS, Lee KH, Gonçalves A, et al. Talazoparib versus chemotherapy in patients with germline BRCA1/2-mutated HER2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from the EMBRACA trial. *Annals of Oncology*. 2020 Nov 1;31(11):1526–35.
142. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):913–7.

143. Bardia A, Rugo HS, Tolaney SM, Loirat D, Punie K, Oliveira M, et al. Final Results from the Randomized Phase III ASCENT Clinical Trial in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer and Association of Outcomes by Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Trophoblast Cell Surface Antigen 2 Expression. *Journal of Clinical Oncology*. 2024 May 20;42(15):1738–44.
144. Mao Y, Qu Q, Chen X, Huang O, Wu J, Shen K. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016 Apr 1;11(4).
145. Wood SJ, Gao Y, Lee JH, Chen J. High tumor infiltrating lymphocytes are significantly associated with pathological complete response in triple negative breast cancer treated with neoadjuvant KEYNOTE-522 chemoimmunotherapy. *Breast Cancer Research*. 2024 Jan 30;205:193–9.
146. da Cunha BR, Domingos C, Buzzo Stefanini AC, Henrique T, Polachini GM, Castelo-Branco P, et al. Cellular interactions in the tumor microenvironment: The role of secretome. Vol. 10, *Journal of Cancer*. Ivyspring International Publisher; 2019. p. 4574–87.
147. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21:137–48.
148. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. Vol. 279, *Journal of Internal Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 541–62.
149. Lin B, Du L, Li H, Zhu X, Cui L, Li X. Tumor-infiltrating lymphocytes: Warriors fight against tumors powerfully. *Biomed Pharmacother*. 2020 Oct 14;132(110873):1–9.
150. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. Vol. 27, *Current Opinion in Immunology*. 2014. p. 16–25.
151. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. 2012. p. 265–77.
152. Catalán E, Charni S, Jaime P, Aguiló JI, Enríquez JA, Naval J, et al. MHC-I modulation due to changes in tumor cell metabolism regulates tumor sensitivity to CTL and NK cells. *Oncoimmunology*. 2015 Jan 2;4(1):985924.
153. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. Vol. 299, *Source: Science, New Series*. 2003.
154. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3 + regulatory T cells in the human immune system. Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. 2010. p. 490–500.
155. Wang M, Yin B, Wang HY, Wang RF. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. Vol. 6, *Immunotherapy*. Future Medicine Ltd.; 2014. p. 1265–78.
156. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 227–42.
157. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2012 Jun 28;366(26):2455–65.
158. Shevach EM. Application of IL-2 therapy to target T regulatory cell function. Vol. 33, *Trends in Immunology*. 2012. p. 626–32.
159. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol*. 2007 Apr;19(2):217–23.

160. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
161. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, Von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature*. 2003 Feb 20;421(6925):852–6.
162. Sun X, Zhai J, Sun B, Parra ER, Jiang M, Ma W, et al. Effector memory cytotoxic CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺ T cells are predictive of good survival and a lower risk of recurrence in triple-negative breast cancer. *Modern Pathology*. 2022 May 1;35(5):601–8.
163. 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. Vol. 26, *Annals of Oncology*. Oxford University Press; 2015. p. 259–71.
164. Murakami E, Shionoya T, Komenoi S, Suzuki Y, Sakane F. Cloning and characterization of novel testis-Specific diacylglycerol kinase η splice variants 3 and 4. *PLoS One*. 2016 Sep 1;11(9).
165. Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, Lederer B, Heppner BI, Weber KE, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol*. 2018 Jan 1;19(1):40–50.
166. Leon-Ferre RA, Jonas SF, Salgado R, Loi S, International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA*. 2024 Apr 2;331(13):1135–44.
167. Plasterk RHA. RNA Silencing: The Genome's Immune System. *Science* (1979). 2002 May 17;296(5571):1263–5.
168. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome International Human Genome Sequencing Consortium*. *Nature [Internet]*. 2004 Oct 21;431(7011):931–45. Available from: <http://www.genome.gov/10000923>.
169. Zoghbi HY, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Feb 1;8(2):1–28.
170. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. 2006 Jul 13;442(7099):203–7.
171. Hon CC, Ramilowski JA, Harshbarger J, Bertin N, Rackham OJL, Gough J, et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature*. 2017 Mar 9;543(7644):199–204.
172. Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JPA. Clinical outcome prediction by MicroRNAs in human cancer: A systematic review. Vol. 104, *Journal of the National Cancer Institute*. 2012. p. 528–40.
173. Lovat F, Valeri N, Croce CM. MicroRNAs in the pathogenesis of cancer. *Semin Oncol*. 2011 Dec;38(6):724–33.
174. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Vol. 136, *Cell*. 2009. p. 642–55.
175. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*. 2008 Apr;26(4):462–9.
176. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, *Cell*. 2000.

177. Adrian Calin G, Sevignani C, Dan Dumitru C, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Mar 2;101(9):2999–3004. Available from: www.gene.ucl.ac.uk
178. Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, Quera A, Agustí C, Huerta A, et al. MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology*. 2009 Mar;76(3):162–9.
179. Castañeda CA, Agullo-Ortuño MT, Fresno Vara JA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos E. Implication of miRNA in the diagnosis and treatment of breast cancer. Vol. 11, *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2011. p. 1265–75.
180. Iorio M V., Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7065–70.
181. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2009 May 11;11(3).
182. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007 Oct 8;8(10).
183. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R, et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF- β 1. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Sep;117(1):131–40.
184. Kolacinska A, Morawiec J, Fendler W, Malachowska B, Morawiec Z, Szemraj J, et al. Association of microRNAs and pathologic response to preoperative chemotherapy in triple negative breast cancer: Preliminary report. *Mol Biol Rep*. 2014;41(5):2851–7.
185. Xue J, Chi Y, Chen Y, Huang S, Ye X, Niu J, et al. MiRNA-621 sensitizes breast cancer to chemotherapy by suppressing FBXO11 and enhancing p53 activity. *Oncogene*. 2016 Jan 28;35(4):448–58.
186. García-Vazquez R, Ruiz-García E, García AM, Astudillo-De La Vega H, Lara-Medina F, Alvarado-Miranda A, et al. A microRNA signature associated with pathological complete response to novel neoadjuvant therapy regimen in triple-negative breast cancer. *Tumor Biology*. 2017 Jan 1;39(6).
187. Kong X, Li G, Yuan Y, He Y, Wu X, Zhang W, et al. MicroRNA-7 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via targeting FAK expression. *PLoS One*. 2012 Aug 2;7(8).
188. Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by MicroRNA-7. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Feb 27;284(9):5731–41.
189. Luo L, Yang R, Zhao S, Chen Y, Hong S, Wang K, et al. Decreased miR-320 expression is associated with breast cancer progression, cell migration, and invasiveness via targeting Aquaporin 1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018 May 1;50(5):473–80.
190. Yu J, Wang JG, Zhang L, Yang HP, Wang L, Ding D, et al. MicroRNA-320a inhibits breast cancer metastasis by targeting metadherin. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Sep 5;7(25):38612–25. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget

191. Mihai AM, Ianculescu LM, Suci N. MiRNAs as potential biomarkers in early breast cancer detection: a systematic review. *JOURNAL of MEDICINE and LIFE* 549 *JOURNAL of MEDICINE and LIFE*. 2024;17(6).
192. Fu SW, Lee W, Coffey C, Lean A, Wu X, Tan X, et al. miRNAs as potential biomarkers in early breast cancer detection following mammography. *Cell Biosci*. 2016 Jan 26;6(1).
193. Tan X, Peng J, Fu Y, An S, Rezaei K, Tabbara S, et al. miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2014;16(1).
194. Sochor M, Basova P, Pesta M, Dusilkova N, Bartos J, Burda P, et al. Oncogenic MicroRNAs: MiR-155, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum. *BMC Cancer*. 2014 Jun 18;14(1).
195. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Mashavan D, Burwinkel B. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer*. 2013 Apr 1;132(7):1602–12.
196. Tili E, Croce CM, Michaille JJ. MiR-155: On the crosstalk between inflammation and cancer. *Int Rev Immunol*. 2009;28(5):264–84.
197. Khalighfard S, Alizadeh AM, Irani S, Omranipour R. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
198. Kim S, Rhee J keun, Yoo HJ, Lee HJ, Lee EJ, Lee JW, et al. Bioinformatic and metabolomic analysis reveals miR-155 regulates thiamine level in breast cancer. *Cancer Lett*. 2015 Feb 28;357(2):488–97.
199. Lu Z, Ye Y, Jiao D, Qiao J, Cui S, Liu Z. MiR-155 and miR-31 are differentially expressed in breast cancer patients and are correlated with the estrogen receptor and progesterone receptor status. *Oncol Lett*. 2012 Nov;4(5):1027–32.
200. Zheng SR, Guo GL, Zhang W, Huang GL, Hu XQ, Zhu J, et al. Clinical significance of miR-155 expression in breast cancer and effects of miR-155 ASO on cell viability and apoptosis. *Oncol Rep*. 2012 Apr;27(4):1149–55.
201. Anwar SL, Tanjung DS, Fitria MS, Kartika AI, Sari DNI, Rakhmina D, et al. Dynamic Changes of Circulating Mir-155 Expression and the Potential Application as a Non-Invasive Biomarker in Breast Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2020 Feb 1;21(2):491–7.
202. Bašová P, Pešta M, Sochor M, Stopka T. Prediction potential of serum MiR-155 and MiR-24 for relapsing early breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 10;18(10).
203. kia V, Paryan M, Mortazavi Y, Biglari A, Mohammadi-Yeganeh S. Evaluation of exosomal miR-9 and miR-155 targeting PTEN and DUSP14 in highly metastatic breast cancer and their effect on low metastatic cells. *J Cell Biochem*. 2019 Apr 1;120(4):5666–76.
204. Santos JC, Lima NDS, Sarian LO, Matheu A, Ribeiro ML, Derchain SFM. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
205. Grimaldi AM, Nuzzo S, Condorelli G, Salvatore M, Incoronato M. Prognostic and clinicopathological significance of mir-155 in breast cancer: A systematic review. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 2;21(16):1–13.
206. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology

- Biomarker Working Group on Breast Cancer. Vol. 52, Seminars in Cancer Biology. Academic Press; 2018. p. 16–25.
207. Viale G, Fusco N. Pathology after neoadjuvant treatment - How to assess residual disease. *The Breast*. 2022 Nov 9;62:25–8.
 208. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(179):1–15.
 209. Park JH, Jonas SF, Bataillon G, Crisctiello C, Salgado R, Loi S. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancer (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. *Annals of Oncology*. 2019 Sep 30;30:1941–9.
 210. Musall BC, Rauch DE, Mohamed RMM, Panthi B, Boge M, Candelaria RP, et al. Diffusion Tensor Imaging for Characterizing Changes in Triple-Negative Breast Cancer During Neoadjuvant Systemic Therapy. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2024 Oct 1;
 211. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):187–95.
 212. Floud S, Hermon C, Simpson RF, Reeves G. Alcohol consumption and cancer incidence in women: interaction with smoking, body mass index and menopausal hormone therapy. *BMC Cancer*. 2023 Aug 16;23(1):758.
 213. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Aug 1;165(1):193–200.
 214. Sheikh A, Hussain SA, Ghori Q, Naeem N, Fazil A, Giri S, et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. Vol. 16, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention; 2015. p. 2177–85.
 215. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. Vol. 13, International Journal of Biological Sciences. Ivyspring International Publisher; 2017. p. 1387–97.
 216. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2018 Jun 1;27(6):619–26.
 217. Al Saad S, Al Shenawi H, Almarabheh A, Al Shenawi N, Mohamed AI, Yaghan R. Is laterality in breast Cancer still worth studying? Local experience in Bahrain. *BMC Cancer*. 2022 Dec 1;22(1).
 218. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. Vol. 293, Archives of Gynecology and Obstetrics. Springer Verlag; 2016. p. 247–69.
 219. Schmadeka R, Harmon BE, Singh M. Triple-negative breast carcinoma: Current and emerging concepts. Vol. 141, American Journal of Clinical Pathology. American Society of Clinical Pathologists; 2014. p. 462–77.
 220. Steward L, Conant L, Gao F, Margenthaler JA. Predictive factors and patterns of recurrence in patients with triple negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(7):2165–71.
 221. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Jan 1;161(2):279–87.
 222. Soliman NA, Yussif SM. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer Biol Med*. 2016 Dec 1;13(4):496–504.

223. Pan Y, Yuan Y, Liu G, Wei Y. P53 and Ki-67 as prognostic markers in triplenegative breast cancer patients. *PLoS One*. 2017 Feb 1;12(2).
224. van den Ende NS, Nguyen AH, Jager A, Kok M, Debets R, van Deurzen CHM. Triple-Negative Breast Cancer and Predictive Markers of Response to Neoadjuvant Chemotherapy: A Systematic Review. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2023.
225. Golshan M, Loibl S, Wong SM, Houber JB, O'Shaughnessy J, Rugo HS, et al. Breast Conservation after Neoadjuvant Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: Surgical Results from the BrighTNess Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg*. 2020 Mar 1;155(3).
226. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2018 Jan 8;18(1).
227. da Costa REAR, de Oliveira FTR, Araújo ALN, Vieira SC. Prognostic factors in triple-negative breast cancer: a retrospective cohort. *Rev Assoc Med Bras*. 2021;67(7):950–7.
228. Culliane C, Shrestha A, Al Maksoud A. Optimal timing of surgery following breast cancer neoadjuvant chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2021 Jul;47(7):1507–13.
229. Holanek M, Selingerova I, Bilek O, Kazda T, Fabian P, Foretova L, et al. Neoadjuvant chemotherapy of triple-negative breast cancer: Evaluation of early clinical response, pathological complete response rates, and addition of platinum salts benefit based on real-world evidence. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 1;13(7).
230. He MY, Rancoule C, Rehailia-Blanchard A, Espenel S, Trone JC, Bernichon E, et al. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: Current situation and upcoming strategies. Vol. 131, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 96–101.
231. Dragun AE, Pan J, Rai SN, Kruse B, Jain D. Locoregional recurrence in patients with triple-negative breast cancer: Preliminary results of a single institution study. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. 2011 Jun;34(3):231–7.
232. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and prognosis: A pooled individual patient analysis of early-stage triple negative breast cancers. *J Clin Oncol*. 2019 Jan 16;31(7):559–71.
233. Koletsa T, Kotoula V, Koliou GA, Manousou K. Prognostic impact of stromal and intratumoral CD3, CD8 and FOXP3 in adjuvantly treated breast cancer: do they add information over stromal tumor-infiltrating lymphocyte density? *Cancer Immunology*. 2020 Mar 28;69:1549–64.
234. Sousa RB, Sousa IM, Comini AC, Tavares MC. Prediction of pathologic complete response to chemoimmunotherapy in triple-negative breast cancer using tumor-infiltrating lymphocytes: Exploiting cutoff values. *Journal of Clinical Oncology*. 2024 May 29;42(16).
235. Li S, Zhang Y, Zhang P, Xue S, Chen Y, Sun L, et al. Predictive and prognostic values of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancers treated with neoadjuvant chemotherapy: A meta-analysis. *Breast*. 2022 Dec 1;66:97–109.
236. Valenza C, Taurelli Salimbeni B, Santoro C, Trapani D, Antonarelli G, Curigliano G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. Vol. 15, *Cancers*. MDPI; 2023.
237. Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, et al. Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in

- triple negative and HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer*. 2019 Sep;118:41–8.
238. Loi S, Michiels S, Salgado R, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol*. 2014 Mar 7;25(8):1544–50.
 239. Stanton SE, Disis ML. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. Vol. 4, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2016.
 240. Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol*. 2016 Oct;2(10):1354–60.
 241. Russo L, Maltese A, Betancourt L, Romero G, Cialoni D, De la Fuente L, et al. Locally advanced breast cancer: Tumor-infiltrating lymphocytes as a predictive factor of response to neoadjuvant chemotherapy. *European Journal of Surgical Oncology*. 2019 Jun 1;45(6):963–8.
 242. Liu S, Duan X, Xu L, Xin L, Cheng Y, Liu Q, et al. Optimal threshold for stromal tumor-infiltrating lymphocytes: its predictive and prognostic value in HER2-positive breast cancer treated with trastuzumab-based neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Nov 1;154(2):239–49.
 243. Van Bockstal MR, Noel F, Guiot Y, Duhoux FP, Mazzeo F, Van Marcke C, et al. Predictive markers for pathological complete response after neo-adjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Ann Diagn Pathol*. 2020 Dec 1;49.
 244. Dieci MV, Tsvetkova V, Griguolo G, Miglietta F, Tasca G, Giorgi CA, et al. Integration of tumour infiltrating lymphocytes, programmed cell-death ligand-1, CD8 and FOXP3 in prognostic models for triple-negative breast cancer: Analysis of 244 stage I–III patients treated with standard therapy. *Eur J Cancer*. 2020 Sep 1;136:7–15.
 245. Floris G, Richard F, Hamy AS, Jongen L, Wildiers H, Ardui J, et al. Body Mass Index and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2021 Feb 1;113(2):146–53.
 246. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis PA, Lacroix-Triki M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019;37:559–69. Available from: <https://doi>.
 247. Laenkholm AV, Callagy G, Balancin M, et al. Incorporation of TILs in daily breast cancer care: how much evidence can we bear? *Virchows Arch*. 2022 Jan;480(1):147–62.
 248. Loi S, Michiels S, Adams S, Loibl S, Budczies J, Denkert C, et al. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. Vol. 32, *Annals of Oncology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 1236–44.
 249. Bernard PS, Wittwer C. Real-Time PCR technology for Cancer Diagnostics. *Clin Chem*. 2002 Aug;48(8):1178–85.
 250. Manap ASA, Wishan AA, Wong FW, Najmi HRA, Ng ZF, Diba RS. Mapping the function of MicroRNAs as a critical regulator of tumor-immune cell communication in breast cancer and potential treatment strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2024 Apr 24;12.

251. Wang J, Wang Q, Guan Y, Wang X, Fan D. Breast cancer cell-derived microRNA-155 suppresses tumor progression via enhancing immune cell recruitment and antitumor function. *J Clin Invest*. 2022 Oct 3;132(19):157248.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Figuras 16 e 17

Figura 16. Classificação 2 de estadiamento de acordo com AJCC UICC 8th edição.
Breast carcinoma TNM clinical prognostic stage groups AJCC UICC 8th edition

When TNM is...	And grade is...	And HER2 status is...	And ER status is...	And PR status is...	Then the clinical prognostic stage group is...
Tis N0 M0	Any	Any	Any	Any	0
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
			Negative	Positive	IA
				Negative	IA
		Negative	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
			Negative	Positive	IA
				Negative	IB
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G2	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
			Negative	Positive	IA
				Negative	IA
		Negative	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
			Negative	Positive	IA
				Negative	IB
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G3	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
			Negative	Positive	IA
				Negative	IA
		Negative	Positive	Positive	IA
				Negative	IB
			Negative	Positive	IB
				Negative	IB
T0 N1 ⁺ M0 T1* N1 ⁺ M0 T2 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IB
				Negative	IIA
			Negative	Positive	IIA
				Negative	IIA
		Negative	Positive	Positive	IB
				Negative	IIA
T0 N1 ⁺ M0 T1* N1 ⁺ M0 T2 N0 M0	G2	Positive	Positive	Positive	IB
				Negative	IIA
			Negative	Positive	IIA
				Negative	IIA
		Negative	Positive	Positive	IB
				Negative	IIA
			Negative	Positive	IIA
				Negative	IB

T0 N1 ⁺ M0	G3	Positive	Positive	Positive	IB
T1* N1 ⁺ M0				Negative	IIA
T2 N0 M0			Negative	Positive	IIA
				Negative	IIA
		Negative	Positive	Positive	IIA
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIB
T2 N1 ⁺ M0	G1	Positive	Positive	Positive	IB
T3 N0 M0					Negative
			Negative	Positive	IIA
				Negative	IIB
		Negative	Positive	Positive	IIA
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIB
T2 N1 ⁺ M0	G2	Positive	Positive	Positive	IB
T3 N0 M0					Negative
			Negative	Positive	IIA
				Negative	IIB
		Negative	Positive	Positive	IIA
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIIB
T2 N1 ⁺ M0	G3	Positive	Positive	Positive	IB
T3 N0 M0					Negative
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIIB
		Negative	Positive	Positive	IIB
				Negative	IIIA
			Negative	Positive	IIIA
				Negative	IIIB
T0 N2 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IIA
T1* N2 M0				Negative	IIIA
T2 N2 M0			Negative	Positive	IIIA
T3 N1 ⁺ M0				Negative	IIIA
T3 N2 M0		Negative	Positive	Positive	IIA
				Negative	IIIA
			Negative	Positive	IIIA
				Negative	IIIB

T0 N2 M0	G2	Positive	Positive	Positive	IIA
T1* N2 M0				Negative	IIIA
T2 N2 M0			Negative	Positive	IIIA
T3 N1 ^Δ M0				Negative	IIIA
T3 N2 M0		Negative	Positive	Positive	IIA
				Negative	IIIA
			Negative	Positive	IIIA
				Negative	IIIB
T0 N2 M0	G3	Positive	Positive	Positive	IIIB
T1* N2 M0				Negative	IIIA
T2 N2 M0			Negative	Positive	IIIA
T3 N1 ^Δ M0				Negative	IIIA
T3 N2 M0		Negative	Positive	Positive	IIIA
				Negative	IIIB
			Negative	Positive	IIIB
				Negative	IIIC
T4 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IIIA
T4 N1 ^Δ M0				Negative	IIIB
T4 N2 M0			Negative	Positive	IIIB
Any T N3 M0				Negative	IIIB
		Negative	Positive	Positive	IIIB
				Negative	IIIB
			Negative	Positive	IIIB
				Negative	IIIC
T4 N0 M0	G2	Positive	Positive	Positive	IIIA
T4 N1 ^Δ M0				Negative	IIIB
T4 N2 M0			Negative	Positive	IIIB
Any T N3 M0				Negative	IIIB
		Negative	Positive	Positive	IIIB
				Negative	IIIB
			Negative	Positive	IIIB
				Negative	IIIC
T4 N0 M0	G3	Positive	Positive	Positive	IIIB
T4 N1 ^Δ M0				Negative	IIIB
T4 N2 M0			Negative	Positive	IIIB
Any T N3 M0				Negative	IIIB
		Negative	Positive	Positive	IIIB
				Negative	IIIC
			Negative	Positive	IIIC
				Negative	IIIC
Any T Any N M1	Any	Any	Any	Any	IV

Figura 17. Classificação 3 de estadiamento de acordo com AJCC UICC 8th edição.

Breast carcinoma TNM pathologic prognostic stage groups AJCC UICC 8th edition

When TNM is...	And grade is...	And HER2 status is...	And ER status is...	And PR status is...	Then the pathological prognostic stage group is...
Tis N0 M0	Any	Any	Any	Any	0
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
		Negative	Negative	Positive	IA
				Negative	IA
			Positive	Positive	IA
				Negative	IA
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G2	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
		Negative	Negative	Positive	IA
				Negative	IA
			Positive	Positive	IA
				Negative	IA
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G3	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IA
		Negative	Negative	Positive	IA
				Negative	IA
			Positive	Positive	IA
				Negative	IA
T0 N1 [†] M0 T1* N1 [†] M0 T2 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IB
		Negative	Negative	Positive	IB
				Negative	IIA
			Positive	Positive	IA
				Negative	IB
T0 N1 [†] M0 T1* N1 [†] M0 T2 N0 M0	G2	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IB
		Negative	Negative	Positive	IB
				Negative	IIA
			Positive	Positive	IA
				Negative	IB
T2 N0 M0			Negative	Positive	IB
				Negative	IIA
		Negative	Positive	Positive	IA
				Negative	IIA
			Negative	Positive	IIA
				Negative	IIA

T0 N1 ⁺ M0 T1* N1 ⁺ M0 T2 N0 M0	G3	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IIA
			Negative	Positive	IJA
				Negative	IJA
		Negative	Positive	Positive	IB
				Negative	IJA
			Negative	Positive	IJA
				Negative	IJA
T2 N1 ⁺ M0 T3 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIB
		Negative	Positive	Positive	IA
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIB
T2 N1 ⁺ M0 T3 N0 M0	G2	Positive	Positive	Positive	IB
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIB
		Negative	Positive	Positive	IB
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIB
T2 N1 ⁺ M0 T3 N0 M0	G3	Positive	Positive	Positive	IB
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIB
		Negative	Positive	Positive	IJA
				Negative	IIB
			Negative	Positive	IIB
				Negative	IIIA
T0 N2 M0 T1* N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 ⁺ M0 T3 N2 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IB
				Negative	IIIA
			Negative	Positive	IIIA
				Negative	IIIA
		Negative	Positive	Positive	IB
				Negative	IIIA
			Negative	Positive	IIIA
				Negative	IIIA

ANEXO 2: Parecer do CEP

INSTITUTO DE GESTÃO
ESTRATÉGICA DE SAÚDE DO
DISTRITO FEDERAL - IGESDF



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A influencia genetica da celula tumoral do cancer de mama triplo negativo para expressao de TILs analisada em uma populacao Brasileira

Pesquisador: MIRIAM MONTEIRO ALVARES VILELA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 46115121.6.0000.8153

Instituição Proponente: Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal - IGESDF

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.698.038

Apresentação do Projeto:

O câncer de mama e a neoplasia mais comum em mulheres de todo o mundo, e dentre todos os tipos de câncer de mama, os tumores

que não expressão receptores hormonais ou proteína HER2, os chamado triplo negativos são considerados os mais agressivos. Ao analisar o

infiltrado inflamatório nos canceres parece haver um papel relevante nos tumores do tipo triplos negativos, sendo um forte indicador prognostico.

Assim a determinação da expressão genética do tumor triplo negativo que predispõe a infiltração linfocitária poderia auxiliar na escolha de

imunoterapias para determinados tumores e sua presença no estroma tumoral pode funcionar como fator preditivo de resposta a determinados

tratamentos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a influencia genetica da celula tumoral do cancer de mama triplo negativo para expressao de TILs analisada em uma populacao Brasileira

Objetivo Secundário:

Endereço: CENTRO DE PESQUISA EM SAÚDE DO IGESDF - TÉRREO SITUADO NO SETOR MÉDICO HOSPITALAR SUL
Bairro: ASA SUL **CEP:** 70.297-400
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3550-9167 **E-mail:** cep@igesdf.org.br

ANEXO 3: Termo de consentimento instituição privada



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Convidamos a Senhora a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **A influência genética da célula tumoral do câncer de mama triplo negativo para expressão de TILs analisada e uma população Brasileira**, sob a responsabilidade da pesquisadora Miriam Monteiro Alvares Vilela, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UnB. O projeto consta de análise de dados em prontuário e estudo em blocos de parafina de tecido tumoral. O objetivo desta pesquisa é analisar marcadores que podem influenciar na resposta patológica do câncer de mama triplo negativo associado à infiltrado inflamatório desses tumores. A senhora receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-la. A sua participação se dará por meio de autorizar o acesso aos dados de seu prontuário e dos materiais biológicos (blocos de parafina) para a realização da pesquisa. O risco decorrente de sua participação na pesquisa é o consumo do material biológico do tumor arquivado em bloco de parafina. Para minimizar esse risco foi adotado o seguinte critério de exclusão: “Material de peça cirúrgica com apenas um bloco para estudo. Os casos selecionados devem ter ao menos dois blocos de parafina com material suficiente para estudos de imunohistoquímica.

Se a senhora aceitar participar, estará contribuindo para a descoberta de novos marcadores de microRNA ou circRNA associados ao infiltrado inflamatório no câncer de mama triplo negativo. Além disso, pode-se estabelecer correlações clínico- patológicas, de cunho prognóstico, específicas com esses marcadores.

A Senhora pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para a senhora. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração. Todas as despesas que a senhora tiver relacionadas diretamente ao projeto de pesquisa serão cobertas pelo pesquisador responsável.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, a senhora deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil. Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se a Senhora tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Miriam Monteiro Alvares Vilela no Hospital de base, no respectivo telefone (61) 3550-8863, ou para o e-mail miriam_alvares@yahoo.com.br.

Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente serão acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal – IGESDF. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3550-8900 ramal: 9167 ou do e-mail cep@igesdf.org.br, horário de atendimento de 08:00hs às 12:00hs e de 13:00hs às 17:00hs, de segunda a sexta-feira.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento por gentileza,

Nome Completo

Assinatura (Paciente ou representante legal)

Dra. Miriam Monteiro Alvares Vilela

ANEXO 4: Termo de consentimento instituição pública***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE***

Convidamos a Senhora a participar voluntariamente do projeto de pesquisa **A influência genética da célula tumoral do câncer de mama triplo negativo para expressão de TILs analisada e uma população Brasileira**, sob a responsabilidade da pesquisadora Miriam Monteiro Alvares Vilela, doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UnB. O projeto consta de análise de dados em prontuário e estudo em blocos de parafina de tecido tumoral. O objetivo desta pesquisa é analisar marcadores que podem influenciar na resposta patológica do câncer de mama triplo negativo associado à infiltração inflamatória desses tumores. A senhora receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-la. A sua participação se dará por meio de autorizar o acesso aos dados de seu prontuário e dos materiais biológicos (blocos de parafina) para a realização da pesquisa. O risco decorrente de sua participação na pesquisa é o consumo do material biológico do tumor arquivado em bloco de parafina. Para minimizar esse risco foi adotado o seguinte critério de exclusão: “Material de peça cirúrgica com apenas um bloco para estudo. Os casos selecionados devem ter ao menos dois blocos de parafina com material suficiente para estudos de imunohistoquímica.

Se a senhora aceitar participar, estará contribuindo para a descoberta de novos marcadores de microRNA ou circRNA associados ao infiltrado inflamatório no câncer de mama triplo negativo. Além disso, pode-se estabelecer correlações clínico- patológicas, de cunho prognóstico, específicas com esses marcadores.

A Senhora pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para a senhora. Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração. Todas as despesas que a senhora tiver relacionadas diretamente ao projeto de pesquisa serão cobertas pelo pesquisador responsável.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, a senhora deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil. Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se a Senhora tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Miriam Monteiro Alvares Vilela no Hospital de base, no respectivo telefone (61) 3550-8863, ou para o e-mail miriam_alvares@yahoo.com.br.

Ressalta-se que quanto às medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dos prontuários, somente serão acessíveis à equipe de pesquisa, não sendo permitido o acesso a terceiros.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal – IGESDF. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3550-8900 ramal: 9167 ou do e-mail cep@igesdf.org.br, horário de atendimento de 08:00hs às 12:00hs e de 13:00hs às 17:00hs, de segunda a sexta-feira.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento por gentileza,

Nome Completo

Assinatura (Paciente ou representante legal)

Dra. Miriam Monteiro Alvares Vilela

ANEXO 5: Extração de RNA de amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE) – RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE

Extração de RNA de amostras fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE) – RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE	POP
Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica – FAV/UNB	

- **Antes de iniciar:**
- Pré-aquecer o bloco térmico a 60°C.
 - Colocar, no máximo, 80 µm de tecido em um microtubo de 1,5 mL (quatro fatias de 20 µm ou oito de 30 µm).

1. Desparafinação (Todo o procedimento realizado na capela de exaustão):

- 1.1. Adicionar 1 mL de xilol à amostra para remover a parafina.
- 1.2. Homogeneizar brevemente no vórtex e centrifugar (spin) a 10.000 rpm.

AVISO: O xilol é uma substância tóxica! Leia o MSDS da fabricante. Manuseie-o em área bem ventilada e com equipamento de proteção individual. Descarte os resíduos de acordo com os regulamentos aplicáveis.

- 1.3. Aquecer por 4 minutos a 60°C para derreter a parafina (sem agitação).
- 1.4. Centrifugar por 4 minutos em temperatura ambiente e velocidade máxima (14.000 rpm).

NOTA: Se um pellet compacto não se formar, prosiga com cuidado para a próxima etapa.

- 1.5. Remover o xilol sem perturbar o pellet. Descarte o xilol de forma adequada.

NOTA: Se o pellet estiver solto, deixar um pouco de xilol no tubo para evitar a remoção de pedaços de tecido.

- 1.6. Adicionar 1 mL de etanol absoluto e homogeneizar no vórtex (o tecido deve ficar opaco).
- 1.7. Centrifugar por 2 minutos em temperatura ambiente e velocidade máxima (14.000 rpm).
- 1.8. Remover o etanol sem perturbar o pellet. O etanol conterá traços de xilol, descarte adequadamente.
- 1.9. Repetir as etapas 1.6 – 1.8 para uma segunda lavagem da amostra com etanol.
- 1.10. Centrifugar novamente por 3 minutos, 14.000 rpm, para remover o máximo possível de etanol residual sem perturbar o pellet.
- 1.11. Secar o pellet ao ar por 45 minutos em temperatura ambiente (tubo virado pra baixo).

2. Digestão de Protease (a partir daqui pode ser realizado fora da capela)

- 2.1. Adicionar 100 µL de Tampão de Digestão e 4 µL de protease a cada amostra.
- 2.2. Inverter o tubo suavemente. Se o tecido grudar nas laterais do tubo, use uma ponteira para empurrá-lo ou centrifugue rapidamente para trazer o tecido para dentro da solução.
- 2.3. Incubar a amostra por 15 minutos a 50°C e, em seguida, 15 minutos a 80°C.

Atenção: Não ultrapassar o tempo! Prolongar a incubação a 80°C pode resultar na degradação do RNA.

NOTA: A amostra pode não clarificar após 30 minutos. Evite remover pedaços de tecido não digeridos ao transferir a amostra para o filtro na próxima etapa.

3. Isolamento de ácidos nucleicos

- 3.1. Combinar 120 µL de Aditivo de Isolamento e 275 µL Etanol Absoluto, por amostra (395 µL). Para várias amostras, preparar um mix único (nº de amostras + 5% de excedente)
- 3.2. Adicionar 395 µL da mistura de aditivo de isolamento + etanol a cada amostra. Misturar com movimentos up and down. Algumas amostras podem parecer brancas e turvas após a mistura.
- 3.3. Para cada amostra, colocar um cartucho de filtro em um dos tubos de coleta fornecidos.
- 3.4. Pipetar até 700 µL de amostra dentro do cartucho de filtro e fechar a tampa.

NOTA: Evitar pipetar pedaços grandes de tecido não digerido para não entupir o filtro.

- 3.5. Centrifugar por 30 segundos 10.000 rpm.

Nota: Forças centrifugas superiores podem danificar os filtros.

- 3.6. Descartar o fluxo e recolocar o filtro no mesmo tubo de coleta.
- 3.7. Se necessário, repetir as etapas anteriores até que toda a amostra tenha passado pelo filtro.
- 3.8. Adicionar 700 µL da solução de lavagem Wash 1.
- 3.9. Centrifugar por 30 segundos a 10.000 rpm.
- 3.10. Descartar o fluxo e recolocar o filtro no mesmo tubo de coleta.
- 3.11. Adicionar 500 µL da solução de lavagem Wash 2/3.
- 3.12. Centrifugar por 30 segundos a 10.000 rpm.
- 3.13. Descartar o fluxo e recolocar o filtro no mesmo tubo de coleta.
- 3.14. Centrifugar por mais 1 minuto para remover o fluido residual do filtro.

4. Digestão de nuclease e purificação final dos ácidos nucleicos

- 4.1. Combinar as soluções e quantidades indicadas na tabela abaixo para fazer o Mix de DNase. Calcular para o nº de amostras + 5% de excedente.

Componente	Volume (por reação)
10X DNase Buffer	6 µL
DNase	4 µL
H ₂ O Nuclease-free	50 µL
Volume total	60 µL

- 4.2. Adicionar 60 µL do Mix de DNase no centro de cada filtro
- 4.3. Fechar o tubo e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente (22 – 25°C).
- 4.4. Adicionar 700 µL da solução de lavagem Wash 1.
- 4.5. Incubar por 60 segundos em temperatura ambiente.
- 4.6. Centrifugar por 30 segundos a 10.000 rpm.
- 4.7. Descartar o fluxo e recolocar o filtro no mesmo tubo de coleta.
- 4.8. Adicionar 500 µL da solução de lavagem Wash 2/3.
- 4.9. Centrifugar por 30 segundos a 10.000 rpm.

- 4.10. Descartar o fluxo e recolocar o filtro no mesmo tubo de coleta.

- 4.11. Repetir a lavagem com 500 µL da solução de lavagem Wash 2/3, centrifugar por 30 segundos a 10.000 rpm.

- 4.12. Descartar o fluxo e centrifugar por 1 minuto a 10.000 rpm para remover o fluido residual do filtro.

- 4.13. Transferir o filtro para um novo tubo de coleta (tubo final).

- 4.14. Adicionar 60 µL de água nuclease-free à temperatura ambiente no centro do filtro e fechar a tampa.

- 4.15. Deixar as amostras em temperatura ambiente por 1 minuto.

- 4.16. Centrifugar por 1 minuto a velocidade máxima (14.000 rpm). Descartar o filtro. O volume eluído conterá o RNA.

- 4.17. Armazenar as amostras a –20°C ou menos.

ANEXO 6: Quantificação de RNA e miRNA por fluorimetria - Qubit 2.0

Quantificação de RNA e miRNA por fluorimetria - Qubit 2.0	POP
Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica – FAV/UNB	

MATERIAIS

- Qubit 2.0 Fluorometer
- Qubit microRNA Assay Kit ou Qubit RNA HS Assay Kit
- Amostra
- Microtubos de 1,5 mL ou 2,0 mL
- Qubit Assay Tubes de 0,5 mL
- Pipetas e ponteiros

➤ **Antes de iniciar:**

- Retirar os reagentes previamente da geladeira. Os ensaios Qubit foram concebidos para serem realizados à temperatura ambiente, as flutuações de temperatura podem influenciar na precisão.
- Sempre refazer a curva de calibração caso a anterior tenha sido feita por outra pessoa, pois pode haver diferença na pipetagem.

PROCEDIMENTOS

1. Solução de Trabalho:
 - Calcular o volume de solução de trabalho para o n° amostras + 1. Acrescentar + 2 para a curva de calibração, se necessário.
 - 1 µL de Qubit reagente.
 - 199 µL de Qubit buffer.
2. Executar a curva de calibração (opcional):
 - Curva padrão 1 (usar microtubos do kit):
 - 190 µL da solução de trabalho
 - 10 µL do standard #1
 - Curva padrão 2 (usar microtubos do kit):
 - 190 µL da solução de trabalho
 - 10 µL do standard #2

3. Preparo das amostras (usar microtubos do kit):

- 180 µL - 199 µL de Solução de Trabalho
- 1 µL - 20 µL de amostra

Recomendação inicial: 198 µL de Solução de Trabalho e 2 µL de amostra.

4. Homogeneizar no vortex de 3 a 5 segundos e incubar à temperatura ambiente por, no mínimo, 2 minutos.

5. Proceder a leitura:

- Ligar o aparelho e selecionar a opção desejada (RNA ou MicroRNA)
- (Opcional) Para efetuar a leitura de uma nova curva padrão, selecionar “Yes” para “Read new standard”.
 - Inserir Standard 1 e proceder a leitura.
 - Inserir Standard 2 e proceder a leitura.
- Para proceder diretamente à leitura das amostras, selecionar “No” para “Read new standard”.
- Inserir a amostra e selecionar a opção “Read”.
- Selecionar a opção “concentração stock”.
- Ajustar o volume inicial da amostra para 2 µL (ou outro volume que tenha sido utilizado).
- Selecionar a unidade de concentração:
 - RNA: ng/µL
 - MicroRNA: ng/mL (dividir o valor por 1.000 para obter a quantificação em ng/µL, pois o aparelho não faz a conversão automática)

Obs. 1:

Se houver a necessidade de repetir a quantificação com o mesmo tubo, remova-o do equipamento e deixe-o equilibrar à temperatura ambiente por 30 segundos antes de fazer uma nova leitura.

Obs. 2:

Se a concentração for muito baixa (too low), repetir a quantificação com um volume maior de amostra;

Se a concentração for muito alta (too high), diluir a amostra e proceder nova leitura (geralmente uma diluição de 1:20 é suficiente).

ANEXO 7: Protocolo TaqMan miRNA Avanced Assay

Protocolo TaqMan miRNA Avanced Assay

Preparo do cDNA – Etapas:

1. Reação de adição de Poly (A)
2. Ligação do Adaptador
3. Transcrição reversa
4. miR-Amp (Ampliação do microRNA)

1. Reação de adição de Poly (A)

- Descongelar reagentes no gelo, vórtex e centrifugar

- Preparar o mix Poly (A) de acordo com as informações abaixo:

10 x Poly (A) buffer	0,5 µl	X nº Amostras
ATP 10mm	0,3 µl	
POLY (A) Enzyme	0,3 µl	
RNase-Free water	1,7 µl	
TOTAL	3,0 µl	

- Homogeneizar no vórtex e centrifugar

- Adicionar 2 µl na amostra de RNA em cada tubo de reação (2 µl) e acrescentar 3 µl de mix Poly (A). Volume total = 5 µl

- Homogeneizar no vórtex e centrifugar

- Levar ao termociclador com a seguinte ciclagem:

Poliadenilação	37° C	45 min
Parar Reação	65° C	10 min
Hold	4° C	∞

- Avançar imediatamente para próxima etapa!

2. Ligação do Adaptador

- Preparar o mix de ligação:

5 x DNA ligase buffer	3 µl	X nº Amostras
50% PEG 8000	4,5 µl	
25X Ligation Adaptor	0,6 µl	
RNA ligase	1,5 µl	
H2O RNase free	0,4 µl	
TOTAL	10 µl	

- Homogeneizar no vórtex e centrifugar

- Transferir 10 µl para cada tubo contendo o produto da reação anterior: Poly (A): Volume total de 15 µl por tubo

- Homogeneizar no vórtex e centrifugar

- Prosseguir com a ciclagem:

Ligação	16° C	60 min
Hold	4° C	∞

- Avançar imediatamente para próxima etapa!

3. Transcrição Reversa (RT):

- Preparar o mix RT:

5 X RT buffer	6 µl	X nº Amostras
dNTP mix (25 mM)	1,2 µl	
20 X Universal RT primer	1,5 µl	
10 X RT Enzyme mix	3,0 µl	
H2O RNase free	3,3 µl	
TOTAL	15 µl	

- Homogeneizar no vórtex e centrifugar

- Transferir 15 µl do mix RT para cada tubo contendo os demais componentes: Volume total: 30 µl

- Homogeneizar no vórtex e centrifugar

- Prosseguir com a ciclagem:

Transcrição Reversa	42° C	15 min
Parar a reação	85° C	5 min
Hold	4° C	∞

- Guardar a reação a -20° C por até 2 meses ou prosseguir para próxima etapa (STOP POINT)

4. miR- Amp

- Preparar o mix miR-Amp:

2 X miR-Amp Master mix	25 µl	X nº Amostras
20 X miR-Amp Primer mix	2,5 µl	
RNase-Free water	17,5 µl	
TOTAL	45 µl	

- Transferir 45 µl de mix para um novo tubo de reação (0,2 ml)

- Adicionar 5 µl do produto da reação anterior (RT): Volume total 50 µl e centrifugar

- Prosseguir com a ciclagem:

Ativação da Enzima	95° C	5 min	1 ciclo
Desnaturação	95° C	3 seg	14 ciclos
Anelamento / extensão	60° C	30 seg	14 ciclos
Parar reação	99° C	10 min	1 ciclo
Hold	4° C	∞	1 ciclo

- Guardar a reação a -20° C por até 2 meses ou prosseguir para próxima etapa (STOP POINT)

qPCR

- Manter os ensaios protegidos da luz a -20° C até o momento do uso

- Recomendado 4 replicadas por reação: Incluir 10% de margem

- Descongelar os reagentes no gelo, agitar no vórtex e centrifugar

- Homogeneizar gentilmente o frasco do master mix. NÃO INVERTER O FRASCO

- Preparar a diluição do cDNA 1:10 (calcular o volume necessário com base em 5 µl por poço + 10%)

- Preparar o mix PCR:

Tapman Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µl	X nº Amostras
Tapman Advanced mRNA assay (20X)	1 µl	
RNase-Free water	4 µl	
TOTAL	15 µl	

- Homogeneizar no vórtex e centrifugar

- Transferir 15 µl do mix de PCR para cada poço da placa

- Adicionar 5 µl do cDNA diluído a 1:10 a seu respectivo poço. Volume total de 20 µl por poço

- Selar a placa e centrifugar brevemente

- Prosseguir com a corrida no QuantStudio:

Ativação da Enzima	95° C	20 seg	1 ciclo
Desnaturação	95° C	1 seg	40 ciclos
Anelamento / extensão	60° C	20 seg	40 ciclos

- Volume da reação = 20 µl