

**FACULDADE PERNAMBUCANA DE SAÚDE**

**INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF.  
FERNANDO FIGUEIRA - IMIP**

**NÍVEIS SOLÚVEIS DE sTIM-3 E s4-1BB COMO POSSÍVEIS PREDITORES  
DE RESPOSTA PATOLÓGICA EM PACIENTES CÂNCER DE MAMA  
TRIPLO-NEGATIVO SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA  
NEOADJUVANTE**

**Autor:** Beatriz Costa de Carvalho Silva

**Co-autores:** Clara França Gomes

Gabriel Duarte Muniz de Possídio Marques

Guilherme Barros Alves de Carvalho

**Orientador(a):** Profa. Dra. Leuridan Cavalcante Torres

**Co-orientadores:** Prof Dr. Marcelo Tejo Ramos Salgado; Prof. Dr. Carlos  
Eduardo Caiado Anunciação

**Colaboradores:** Prof. Dr. Claudeir Dias Silva-Junior; Msc Kamylla Ramos da  
Silva; Pedro Henrique de Melo Soares

**Title:** Níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB como possíveis preditores de resposta patológica em pacientes câncer de mama triplo-negativo submetidos à Quimioterapia Neoadjuvante

## RESUMO

**Introdução:** O Câncer de Mama Triplo-Negativo (CMTN), que representa 15% a 20% dos casos, é um subtipo clinicamente agressivo, caracterizado pela ausência dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, com pior prognóstico e maior risco de recidiva. A classificação TNM é essencial para o manejo, mas a busca por novas estratégias terapêuticas é crucial, dada a limitação à quimioterapia padrão. Nesse contexto, a resposta imune no microambiente tumoral e a imunoterapia surgem como alvos promissores. TIM-3 e 4-1BB são receptores imunológicos estudados: TIM-3 é um ponto de controle que limita a resposta de células T (exaustão), enquanto o 4-1BB é um receptor coestimulador de linfócitos T efetores, envolvido na ativação e sobrevivência celular, ambos com formas solúveis (sTIM-3 e s4-1BB) que podem atuar como potenciais biomarcadores séricos. O estudo teve como objetivo analisar os níveis solúveis de sTIM-3 e s4-1BB no sangue periférico de pacientes com CMTN localmente avançado antes e depois da Quimioterapia Neoadjuvante (QT Neo) e associá-los à resposta à QT Neo (Resposta Patológica Completa - RPC ou Parcial - RPP), ao tamanho do tumor e ao status linfonodal. **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal com 29 mulheres com CMTN localmente avançado (estágio III) submetidas à QT Neo (adriablastina/ciclofosfamida seguidas de paclitaxel) realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e no Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) entre 2015 e 2017. Um grupo de controle de 30 mulheres saudáveis foi incluído. Amostras de sangue periférico foram coletadas antes (Pré-QT Neo) e após (Pós-QT Neo) o tratamento. A concentração de sTIM-3 e s4-1BB no plasma foi determinada por ensaio imunoenzimático. A Resposta Patológica Completa (RPC) foi definida como a ausência de tumor invasivo na mama e linfonodos. Para a análise estatística, foram utilizados testes como t de Student não pareado, Mann-Whitney e Wilcoxon (para análises pareadas), com significância estatística estabelecida em  $p < 0,05$ . **Resultados:** A idade média das 29 pacientes foi de 43 anos, e o tipo histológico mais comum foi o carcinoma ductal invasivo (100%), com grau III (75,86%), 48,28% das pacientes obtiveram RPC. Os níveis de sTIM-3 estavam significativamente elevados nas pacientes com RPC e RPP em comparação com o

grupo controle ( $P<0,0001$  e  $P<0,0003$ , respectivamente). Os níveis de s4-1BB foram elevados nas pacientes com RPC em comparação com os grupos com RPP e com o grupo controle ( $P<0,0004$  e  $P<0,0001$ , respectivamente). Foram observados níveis elevados de s4-1BB nos grupos com status linfonodal N0 e N1 comparado ao grupo com status N3 ( $P<0,05$ ). Houve diferenças significativas nas análises pareadas dos níveis de sTIM-3 e s4-1BB pré e pós-QT Neo ( $P<0,05$ ). **Conclusão:** As moléculas solúveis sTIM-3 e s4-1BB se mostraram potenciais alvos terapêuticos e biomarcadores preditivos de resposta à QT neo no CMTN localmente avançado. A diferença nos níveis de s4-1BB entre os grupos de RPC e RPP sugere que ele pode ser um possível biomarcador preditivo específico para a resposta à QT Neo. As alterações nos níveis de ambos os marcadores após o tratamento indicam que a quimioterapia pode modificar o perfil de resposta imune. A detecção dessas moléculas no sangue periférico antes e após a QT Neo é um procedimento minimamente invasivo e promissor para o monitoramento e busca por novas terapias, como a imunoterapia com agonistas de 4-1BB, no CMTN.

**Palavras-chave:** câncer de mama triplo-negativo; TIM-3; 4-1BB; Resposta patológica; Quimioterapia neoadjuvante.

**Title:** Soluble levels of sTIM-3 and s4-1BB as possible predictors of pathological response in triple-negative breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy

## ABSTRACT

**Introduction:** Triple-negative breast cancer (TNBC) accounts for 15–20% of breast cancer cases and represents an aggressive subtype characterized by the absence of estrogen, progesterone, and HER2 receptors. With limited therapeutic options, chemotherapy remains the standard treatment. Immune checkpoints such as TIM-3 and 4-1BB, found in soluble forms (sTIM-3 and s4-1BB), may act as predictive biomarkers of therapeutic response. **Objective:** To evaluate soluble, sTIM-3 and s4-1BB levels in patients with locally advanced TNBC undergoing neoadjuvant chemotherapy (NACT) and their association with pathological response, tumor size, and lymph node status. **Methods:** Cross-sectional study including 29 women with stage III TNBC treated with NACT (adriamycin/cyclophosphamide followed by paclitaxel) and 30 healthy controls carried out at the Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) and the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) between 2015 e 2017. Plasma levels of sTIM-3 and s4-1BB were measured by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) before and after treatment. Pathological complete response (pCR) was defined as the absence of invasive carcinoma in breast and lymph nodes. Statistical analyses included Student's t test, Mann-Whitney, and Wilcoxon for paired samples ( $p < 0.05$ ). **Results:** Mean age was 43 years; all cases were invasive ductal carcinoma, mostly grade III (75.9%). pCR was achieved in 48.3% of patients. sTIM-3 levels were significantly higher in pCR and partial response groups compared with controls ( $p < 0.0001$ ;  $p < 0.0003$ ). s4-1BB levels were higher in pCR compared with partial response and controls ( $p < 0.0004$ ;  $p < 0.0001$ ) and in N0/N1 compared with N3 patients ( $p < 0.05$ ). Paired analysis showed significant changes in sTIM-3 and s4-1BB after NACT ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** Soluble sTIM-3 and s4-1BB are potential therapeutic targets and predictive biomarkers of NACT response in locally advanced TNBC. s4-1BB showed specific association with pCR, reinforcing its role as a predictive marker. Detection in peripheral blood offers a minimally invasive strategy for patient monitoring and supports the development of novel immunotherapies.

**Keywords:** Triple Negative Breast Neoplasms; T-Cell Immunoglobulin and Mucin-Domain-Containing Molecule-3; Receptors, Tumor Necrosis Factor; Biomarkers, Tumor; Antineoplastic Agents; Immunotherapy.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) representa aproximadamente 15% a 20% de todos os casos de câncer de mama e caracteriza-se pela ausência de receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Esse subtipo apresenta comportamento clínico mais agressivo, com maior propensão à recidiva, metástases e pior prognóstico em comparação com outros subtipos (DOGRA et al., 2025).

Para o adequado manejo clínico e determinação do prognóstico, a classificação TNM (Tumor, Nodo, Metástase), proposta pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2018) e pela *Union for International Cancer Control* (UICC) constitui ferramenta essencial na avaliação do câncer de mama, incluindo o subtipo triplo-negativo. Esse sistema considera o tamanho tumoral (T), o comprometimento linfonodal regional (N) e a presença de metástases à distância (M), permitindo a definição do estadiamento clínico e patológico. Dessa forma, o TNM auxilia na estimativa do risco de recidiva, na seleção de pacientes candidatos à quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante, além de fornecer parâmetros objetivos para decisões terapêuticas individualizadas (AJCC, 2018; WHO, 2020).

Pacientes com tumores de mama localmente avançados iniciam o tratamento com terapia neoadjuvante. A resposta à quimioterapia neoadjuvante (QT Neo) é avaliada no exame anatomopatológico da peça cirúrgica. A resposta patológica completa (RPC) está associada a uma melhor sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) e difere de acordo com o subtipo de câncer de mama (UNTCH; VON MINCKWITZ, 2011). Desenvolver melhores estratégias de tratamento para câncer de mama e doença metastática continua sendo um objetivo importante. Avanços nessa área podem proporcionar uma sobrevida mais expressiva em pacientes metastáticos e uma melhor

qualidade de vida. Nesse sentido, evidências crescentes indicam que o microambiente tumoral não é meramente o resultado da tumorigênese, mas uma consequência da resposta inflamatória com numerosas células da imunidade inata e adaptativa (BOBRIE et al., 2012).

Mecanismos imunológicos antitumorais foram estudados para melhor compreender as vias envolvidas na ativação e inibição da resposta imune em diferentes tipos e estágios tumorais, a fim de desenvolver imunoterapias que possam auxiliar na eliminação do tumor (CHEN; MELLMAN, 2013). Abordagens terapêuticas com anticorpos monoclonais capazes de ativar a resposta imune por mecanismos de bloqueio inibitório de receptores (antagonistas) ou de estimulação (agonistas) de linfócitos T, aumentando a produção de proteínas que participam da citólise tumoral (SUZUKI et al., 2016).

O domínio 3 da imunoglobulina e mucina de células T (TIM-3) pertence à família TIM e consiste em três membros (TIM-1, TIM-3 e TIM-4) em humanos. As proteínas TIM individuais diferem na estrutura molecular e nos padrões de expressão, bem como em suas funções regulatórias e no impacto nas respostas das células T. A TIM-3 utiliza a lectina tipo C (galectina-9) como ligante, é expressa na superfície da membrana celular e está livre no plasma (sTIM3) (FREEMAN et al., 2010; ANDERSON, 2014). A TIM-3 é um receptor que atua limitando a duração e a magnitude das respostas imunes mediadas por células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, contribuindo para a manutenção da homeostase (SABATOS et al., 2003; SÁNCHEZ-FUEYO et al., 2003; MATSUZAKI et al., 2010; CHEN; FLIES, 2013).

Além da sua isoforma de membrana, estudos recentes têm dado ênfase às formas solúveis desses marcadores, denominadas sTIM-3 e sGAL-9. Esses fragmentos

solúveis podem ser gerados a partir da clivagem proteolítica do ectodomínio do receptor de membrana, através de splicing alternativo ou de secreção ativa e têm sido estudados como potenciais biomarcadores séricos para diferentes neoplasias (WU et al., 2014; ZHOU et al., 2017).

Outro mediador estudado e relacionado à ativação do sistema imunológico é o 4-1BB (CD137/TNFRSF9), um receptor da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFR), que atua como coestimulador de linfócitos T efetores, sendo fundamental na ativação e sobrevivência de células T de memória (SCHMIED et al., 2015). O 4-1BB é predominantemente expresso pela ativação das células apresentadoras de antígenos, células B, células dendríticas e macrófagos e quando superexpresso ativa as células T CD8 e Natural Killer (NK), promovendo o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e citólise, resultando na morte das células tumorais (CHEN; FLIES, 2013).

Nosso estudo analisou os níveis solúveis de sTIM-3, 4-1BB e sCD44 no sangue periférico de pacientes com CMTN antes e depois da QT Neo. Os níveis de sTIM-3 e 4-1BB foram associados à resposta terapêutica, ao tamanho do tumor e ao status linfonodal.

## **2 MÉTODOS**

### **2.1 Desenho do estudo e aspectos éticos**

Trata-se de um estudo transversal realizado a partir do banco de dados secundários obtidos do trabalho intitulado “Investigação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nos tumores de mama HER2+ e triplo negativo localmente avançado”, que foi realizado entre 2015 e 2017 no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral

Prof. Fernando Figueira (IMIP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HCP sob número CAAE39967014.3.3002.5201.

Foram incluídas 29 mulheres com câncer de mama triplo negativo (CMTN) avançado, submetidas à quimioterapia neoadjuvante (QNA) e localmente avançado (estágio III) na admissão. Uma biópsia por agulha grossa (core biopsy) confirmou o diagnóstico de carcinoma de mama, e a imuno-histoquímica foi realizada para classificar o tumor, de acordo com a classificação de tumores sólidos da 8ª edição [(AJCC, 8ª edição, 2018)]. Nenhuma das pacientes foi submetida a radioterapia ou quimioterapia antes da coleta de sangue periférico. O grupo controle foi composto por 30 mulheres saudáveis, com idade entre 18 e 60 anos, sem diagnóstico prévio ou atual e com histórico familiar de CM.

## **2.2 Quimioterapia neoadjuvante (QT Neo)**

Os regimes de QT Neo incluíram uma dose densa de adriablastina RD 60 mg/m<sup>2</sup> e ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> a cada duas semanas, durante quatro ciclos, seguidos por paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> a cada semana, durante 12 semanas. A avaliação da resposta patológica foi realizada no exame anatomopatológico. A ausência de evidência clínica de tumor na mama e nos linfonodos axilares foi definida como resposta completa [16]. A obtenção de resposta patológica completa (RPC) em espécimes pós-operatórios foi definida como a ausência de Resíduos invasivos na mama ou linfonodos. O acompanhamento de todas as pacientes foi de 24 meses, a partir da data do diagnóstico até outubro de 2019.

### **2.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)**

Para os exames laboratoriais, um volume total de 4 mL de sangue foi coletado em um tubo com anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®). O plasma foi separado por centrifugação a 300 g por 5 min a uma temperatura de 4 °C. A coleta da primeira amostra de sangue periférico (pré-tratamento) foi realizada uma hora antes do início da QT neo. A segunda coleta de sangue periférico foi realizada 30 dias após a última QT neo (pós-tratamento).

Um volume total de 100 µL foi utilizado para o teste ELISA, realizado em duplicata. Kits comerciais foram utilizados para os exames laboratoriais: Human sTIM-3 DuoSet (cat. DY2365, R&D® Systems) e CD137/s4-1BB (Solúvel) Humano Kit ELISA (Invitrogen, Thermo Scientific, cat. nº BMS289). A leitura da absorbância foi realizada utilizando o leitor de placas Human Reader HS (Human, Wiesbaden, Alemanha). A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram expressas em pg/mL.

### **2.4 Análise estatística**

As variáveis categóricas foram descritas como frequências absolutas e relativas. O teste t de Student não pareado realizou a análise de dados contínuos. Para as variáveis quantitativas, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado inicialmente. As variáveis quantitativas foram descritas em mediana e valores interquartis (IIQ: 25% - 75%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar dois grupos. Para análise pareada pré e pós-tratamento, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. O nível de significância estatística foi estabelecido em  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism v8.0 (Graphpad Software, San Diego, CA).

### 3.RESULTADOS

#### 3.1 Descrição das características clínicas e anatomopatológicas

Foram analisadas 29 pacientes com câncer de mama triplo negativo com idade média de 43 anos. A faixa etária predominante foi entre 46 à 55 anos (37,93%), seguido pela faixa etária  $\leq 35$  anos (27,58%). Todas as pacientes (100%) apresentaram como tipo histológico o carcinoma ductal invasivo (SOE). O grau tumoral mais encontrado foi o III (75,86%). As pacientes apresentaram-se em estadiamento localmente avançado (estágio III) e 68,96% das pacientes tinham tumores T4 e 55,17% tinham tumores N1. A RPC foi observada em 48,28% das pacientes e 6 pacientes evoluíram com recidiva, sendo 4 em SNC e duas com recidiva loco-regional, com uma delas progredindo para fígado e pulmão e a outra em controle. Cinco pacientes foram a óbito e um em seguimento sem evidência de doença (Tabela 1).

#### 3.2 Análises dos níveis de sTIM3 e s4-1BB

Nas análises do s4-1BB e sTIM-3 antes da QT Neo entre os grupos de pacientes com resposta patológica completa (RPC) e parcial (RPP) e controles, os níveis de sTIM-3 foram elevados nas pacientes com RPC e RPP quando comparado ao grupo controle ( $P<0,0001$  e  $P<0,0003$ , respectivamente). Também observamos níveis elevados de s4-1BB nas pacientes com RPC comparado aos grupos com RPP e aos controles ( $P<0,0004$  e  $P<0,0001$ , respectivamente). Foram observados níveis elevados de s4-1BB nos grupos com status linfonodal N0 e N1 comparados ao grupo com status N3 ( $P<0,05$ ). Não houve diferença estatística nas análises do s4-1BB e do sTIM-3 em relação ao tamanho tumoral (Figura 1). Nas análises pareadas, verificamos diferenças significativas nas análises pareadas dos níveis sTIM-3 e s4-1BB antes (Pré-QT Neo) e após do quimioterapia neoadjuvante (Pós-QT Neo;  $P<0,05$ ) (Figura 2).

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisados alguns *immune checkpoints* envolvidos na ativação e inibição da resposta imune em 29 mulheres com CMTN localmente avançado submetidas à QT neo. Nosso estudo observou elevados níveis de s4-1BB no grupo de pacientes com RPC e com status linfonodal N0 e N1 de pacientes com CMTN. As moléculas solúveis de 4-1BB são produzidas por *splicing* alternativo durante as interações dos receptores 4-1BB presentes na superfície de linfócitos T ativados com seus ligantes (4-1BBL) expressos nas células dendríticas da membrana e macrófagos. Portanto, mais interações celulares entre 4-1BB/4-1BBL estão associadas a um aumento na síntese de 4-1BB em sua forma solúvel. Uma forma de promover a regulação da resposta imune quando há intensa ativação de linfócitos T é por meio da molécula solúvel de 4-1BB que ocupa a fenda de seu ligante (4-1BBL) nas células dendríticas, prevenindo a exacerbação da resposta inflamatória, com a produção de altos níveis de mediadores inespecíficos que podem ter ação anti ou pró-tumoral, dependendo do microambiente do indivíduo e do histórico tumoral (BOBRIE et al., 2012; CHEN; MELLMAN, 2013).

Por sua vez, esses autores demonstraram *in vitro* que o uso de anticorpo agonista de 4-1BB em cultura de células do infiltrado tumoral triplo-negativo promoveu aumento na proliferação e diferenciação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> citotóxicos e sugerem que a imunoterapia com 4-1BB no CMTN poderia ser uma nova abordagem terapêutica para esse subtipo de CM (SUZUKI et al., 2016). Em um estudo de fase 1 utilizando anticorpo agonista de 4-1BB em pacientes com câncer avançado, foi observado aumento quantitativo e funcional de células T e NK, inibindo o crescimento tumoral.

Além disso, houve boa tolerabilidade ao fármaco e doença estável em 22% dos pacientes (FREEMAN et al., 2010).

Foram observados níveis elevados de sTIM-3 no soro de pacientes com RPC e RPC em comparação ao grupo controle. Também foram encontradas alterações nos níveis de sTIM-3 e s41-BB antes e após QT Neo, sugerindo que a quimioterapia pode promover alterações no perfil de resposta imune, levando ao aumento ou à diminuição dos níveis de sTIM3 e s4-1BB no sangue de pacientes com CMTN. Níveis elevados de sTIM-3 são esperados em processos inflamatórios crônicos, onde a exposição contínua a antígenos pode levar à "exaustão" dos linfócitos T, com aumento da expressão de TIM-3 nas células T e induzir imunossupressão (GE et al., 2017).

As diferenças dos níveis de s4-1BB encontradas entre os grupos de RPC e RPP levam-nos a hipotetizar que apenas s4-1BB pode ser um possível biomarcador preditivo da resposta à QT Neo e um excelente alvo terapêutico para CMTN, corroborando o estudo de HARAO et al. (2017). Para validar essa hipótese, outros tipos de análise são necessários, como a verificação da expressão de 4-1BB na membrana de linfócitos T no sangue e no tecido tumoral, validando o método de análise usado para medir s4-1BB quanto à sua especificidade e sensibilidade e sua replicabilidade em um grupo maior de pacientes (BOBRIE et al., 2012; CHEN; MELLMAN, 2013).

As moléculas solúveis de 4-1BB e TIM-3 parecem ser potenciais alvos terapêuticos no CMTN localmente avançado por estarem associados ao desfecho clínico da doença. As moléculas sTIM3 e s4-1BB provaram ser um bom indicador preditivo de resposta à quimioterapia. É importante enfatizar a possibilidade de encontrar níveis detectáveis dessas moléculas no sangue de mulheres com CMTN localmente avançado antes e após QT neo. Com um fator facilitador, saberíamos que a

coleta é um procedimento menos invasivo e fácil de ser realizado em diferentes estágios da doença. A maior agressividade e o pior prognóstico do CMTN aumentam a necessidade de buscar alternativas de tratamento. A única opção terapêutica é a quimioterapia padrão, diferentemente dos tumores com receptor hormonal positivo que possuem terapia hormonal ou tumores HER-2, que também possuem terapias direcionadas. Portanto, uma melhor compreensão de como o sistema imunológico funciona no câncer pode nos ajudar a identificar novas terapias com um resultado clínico favorável na maioria dos pacientes, especialmente aqueles que têm doença avançada.

## 5. CONCLUSÃO

As moléculas solúveis sTIM-3 e s4-1BB se mostraram potenciais alvos terapêuticos e biomarcadores preditivos de resposta à QT neo no CMTN localmente avançado. A diferença nos níveis de s4-1BB entre os grupos de RPC e RPP sugere que ele pode ser um possível biomarcador preditivo específico para a resposta à QT Neo. As alterações nos níveis de ambos os marcadores após o tratamento indicam que a quimioterapia pode modificar o perfil de resposta imune. A detecção dessas moléculas no sangue periférico antes e após a QT Neo é um procedimento minimamente invasivo e promissor para o monitoramento e busca por novas terapias, como a imunoterapia com agonistas de 4-1BB, no CMTN.

## REFERÊNCIAS

1. Dogra D, Phan VA, Zhang S, Gavrilovici C, DiMarzo N, Narang A, et al. Modulation of NMDA receptor signaling and zinc chelation prevent seizure-like events in a zebrafish model of SLC13A5 epilepsy. *PLoS Biol.* 2025;23(4):e3002499. doi: 10.1371/journal.pbio.3002499.

2. American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 8th ed. Chicago: Springer; 2018.
3. World Health Organization (WHO). World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs. Geneva: WHO; 2020.
4. Untch M, von Minckwitz G. Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Breast Care (Basel)*. 2011;6(6):417-22. doi: 10.1159/000335444.
5. Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, et al. Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res*. 2012;72(19):4920-30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0925.
6. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
7. Suzuki S, Ishida T, Yoshikawa K, Ueda R. Current status of immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2016;46(3):191-203. doi: 10.1093/jjco/hyv201.
8. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2010;235(1):172-89. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00903.x.
9. Anderson AC. Tim-3: an emerging target in the cancer immunotherapy landscape. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(5):393-8. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0039.
10. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sánchez-Fueyo A, Zheng XX, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2003;4(11):1102-10. doi: 10.1038/ni988.
11. Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, Domenig C, Zheng XX, Sabatos CA, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*. 2003;4(11):1093-101. doi: 10.1038/ni987.
12. Matsuzaki J, Gnjjatic S, Mhaweche-Fauceglia P, Beck A, Miller A, Tsuji T, et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(17):7875-80. doi: 10.1073/pnas.1003345107.

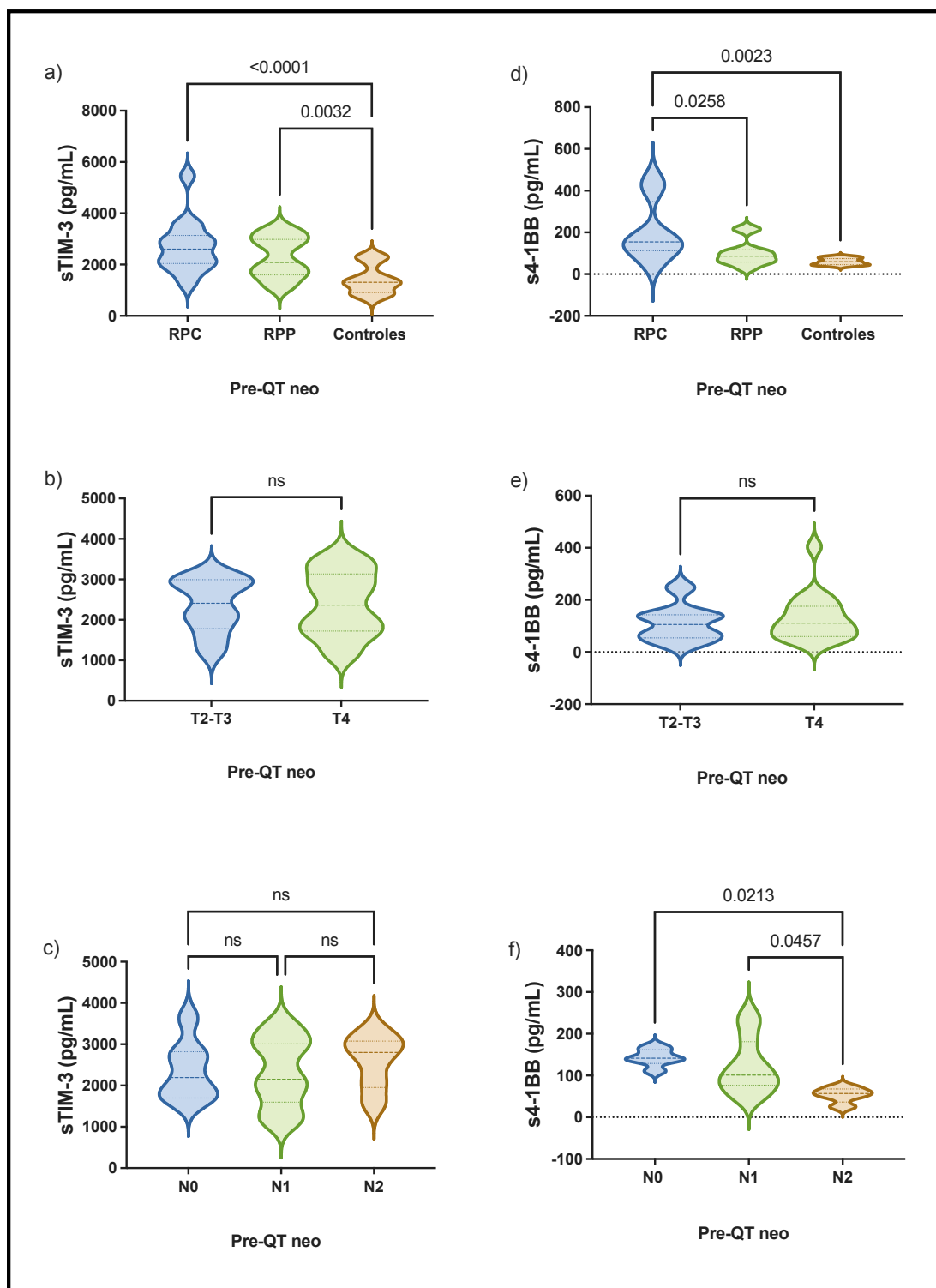
13. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):227-42. doi: 10.1038/nri3405.
14. Schmied S, Gostick E, Price DA, Abken H, Assenmacher M, Richter A. Analysis of the functional WT1-specific T-cell repertoire in healthy donors reveals a discrepancy between CD4(+) and CD8(+) memory formation. *Immunology*. 2015;145(4):558-69. doi: 10.1111/imm.12477.
15. Harao M, Forget MA, Roszik J, Gao H, Babiera GV, Krishnamurthy S, et al. 4-1BB-enhanced expansion of CD8<sup>+</sup> TIL from triple-negative breast cancer unveils mutation-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(6):439-45. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0287.
16. Wu W, Zhang X, Tian Y, Lu L, Zhou D, Li F, et al. Expression of Tim-3 in gastric cancer tissue and its relationship with prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):7643-52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25550801/>.
17. Zhou E, Liao Y, Li H, Wei Z, Fu Y, Geng L, et al. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Exp Med*. 2017;17(4):501-9. doi: 10.1007/s10238-016-0440-7.

## TABELA E FIGURAS

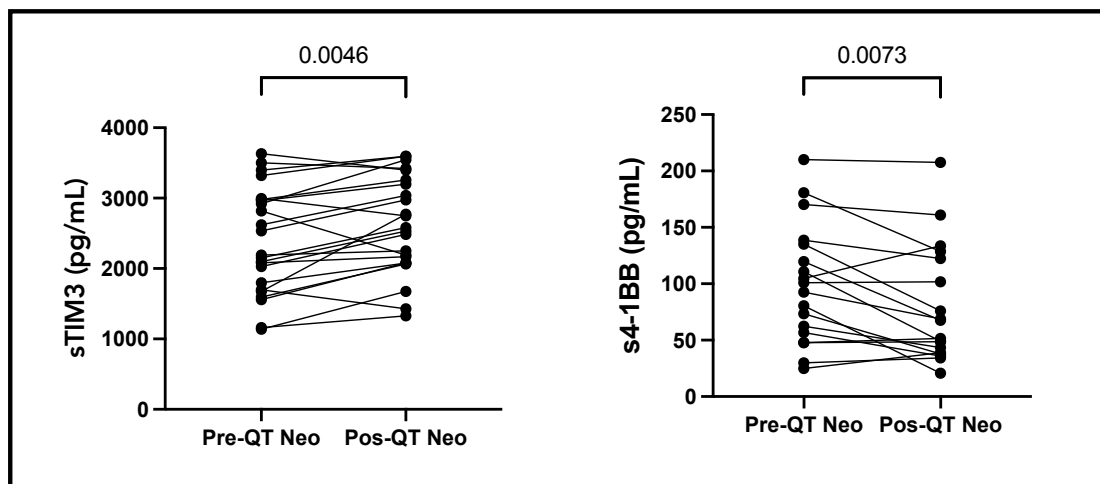
**Tabela 1** – Descrição das frequências das características clínicas, biológicas e anatomopatológicas de 29 pacientes com câncer de mama triplo negativo (CMTN).

| <b>Características</b>       | <b>CMTN</b> | <b>%</b> |
|------------------------------|-------------|----------|
|                              | <b>N</b>    |          |
| <b>Total</b>                 | 29          | 100      |
| <b>Idade ao diagnóstico</b>  |             |          |
| ≤ 35 anos                    | 8           | 27,58    |
| 36-45 anos                   | 7           | 24,13    |
| 46-55 anos                   | 11          | 37,93    |
| 56-70 anos                   | 3           | 10,34    |
| <b>Tipo Histológico</b>      |             |          |
| Carcinoma ductal             | 29          | 100      |
| Lobular                      | 0           |          |
| <b>Grau nuclear</b>          |             |          |
| II                           | 5           | 17,24    |
| III                          | 22          | 75,86    |
| Desconhecido                 | 2           | 6,89     |
| <b>Tamanho Tumoral</b>       |             |          |
| T2 – T3                      | 9           | 31,04    |
| T4                           | 20          | 68,96    |
| <b>Status Axilar</b>         |             |          |
| N0                           | 7           | 24,14    |
| N1                           | 16          | 55,17    |
| N2                           | 6           | 20,69    |
| <b>Resposta a QT</b>         |             |          |
| RPC                          | 14          | 48,28    |
| RPP                          | 15          | 51,72    |
| <b>Metástase a distância</b> |             |          |
| Sim                          | 5           | 17,24    |
| Não                          | 24          | 82,76    |

Abreviações: TN - tumor triplo negativo / RPC- resposta patológica completa / RPP – resposta patológica parcial



**Figura 1:** Análise dos níveis séricos de sTIM-3 e s4-1BB (pg/mL) no sangue de pacientes com câncer de mama triplo negativo (n=29) realizada antes da quimioterapia neoadjuvante dos grupos com resposta patológica completa (RPC), resposta patológica parcial (RPP) e controles saudáveis. Na classificação TNM, os grupos foram divididos em tamanho do tumor  $> 2 \leq 5$  e  $> 5$  cm (T2 e T3, respectivamente) e tumores que invadiram a parede torácica ou a pele (T4). No estado dos linfonodos, os grupos foram divididos em N0 - sem metástase ganglionar regional (n = 7); N1 - metástase em linfonodos axilares móveis (n = 16); e N2 - metástase em linfonodos axilares fixos (n = 6). Os gráficos foram representados em mediana e interquartil (25-75). ns: não significativo.



**Figura 2:** Análise pareada dos níveis sTIM-3 e s4-1BB de mulheres com câncer de mama triplo-negativo antes (Pré) e após (Pós) à quimioterapia neoadjuvante (QT Neo). Foi realizado o teste pareado não paramétrico de Wilcoxon. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ . ns: não significativa

