

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

BETINA VOLLBRECHT

**PERFIL DE RISCO IMUNOLÓGICO
DE IDOSAS COM CÂNCER DE MAMA**

Porto Alegre

2015

BETINA VOLLBRECHT

**PERFIL DE RISCO IMUNOLÓGICO
DE IDOSAS COM CÂNCER DE MAMA**

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Gerontologia Biomedica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Frasson

Porto Alegre

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

V923p Vollbrecht, Betina

Perfil de risco imunológico de idosas com câncer de mama. / Betina Vollbrecht. – Porto Alegre, 2015.

74f. tab.; il. Inclui um artigo científico submetido à publicação.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Doutorado em Gerontologia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Frasson

1. Geriatria. 2. Neoplasias da Mama - Imunologia. 3. Prognóstico. 4. Linfócitos T CD4-Positivos. 5. Linfócitos T CD8-Positivos. I. Frasson, Antonio. II. Título.

CDD 618.976994

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

BETINA VOLLBRECHT

**PERFIL DE RISCO IMUNOLÓGICO
DE IDOSAS COM CÂNCER DE MAMA**

Tese doutorado defendida e aprovada em 02 de março de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Daniela Dornelles Rosa (Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS)

Prof. Dr. João Alfredo Piffero Steibel (Departamento de Ginecologia FAMED – PUCRS)

Prof. Dr. Ângelo José Bós (Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS)

“A rigor, o aparecimento do câncer no mundo é produto de uma dupla negativa: ele só se torna comum quando todas as outras doenças mortais são combatidas. Médicos do século XIX costumam associar o câncer a civilização: o câncer, eles pensavam, era causado pela correria da vida moderna, que de alguma forma estimulava o crescimento patológico no corpo. A associação era correta, porém a casualidade não: **a civilização não é a causa do câncer, mas, ao prolongar a vida humana, ela o desvela.**”

Siddhartha Mukherjee

No livro: O imperador de todos os males – uma biografia do câncer.

(São Paulo, Companhia das Letras – 2012; página 65)

Para *Daniel Vollbrecht Bueno Telles*, meu filho,
por me mostrar o verdadeiro sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ter iluminado meu caminho e por ter sempre colocado ótimas pessoas ao meu lado.

Meus sinceros agradecimentos as **pacientes** com câncer de mama do Centro de Mama da PUCRS que literalmente “doaram seu sangue” para contribuir com a nossa pesquisa.

Obrigada ao **Professor Dr Antonio Frasson**, meu orientador, por todas as oportunidades de ensino e aprendizado, pelo exemplo de médico mastologista, pela amizade.

Minha eterna gratidão, a todos os meus professores; aos colegas e médicos residentes do **Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da PUCRS**; a equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da PUCRS, em especial a **Professora Dra Cristina Bonorino**.

Obrigada ao acadêmico de medicina **Thiago Willers** pelo auxílio na coleta e organização dos dados. Agradeço também a enfermeira **Elenize Flores**, pela amizade e auxílio na documentação necessária para este projeto de pesquisa.

Com carinho agradeço a toda minha família, em especial aos meus afilhados: **Ana Beatriz Souza, Bruno Popien, Catarina Del Fabbro Vollbrecht e Gabriela Dominicis**.

Aos meus pais, **Erni Arthur Vollbrecht e Elida Vollbrecht**, sou grata pelo amor e apoio em todos os momentos, por terem me ensinado desde criança o prazer de estudar e ensinar.

Ao meu esposo, **João Pedro Bueno Telles**, agradeço a paciência, ao amor, e estímulo na busca dos meus sonhos. Acima de tudo, obrigada por ter permitido que eu sinta a melhor experiência de vida - ser mãe.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS Sociedade Americana de Cancerologia

BLS Biópsia de Linfonodo Sentinela

CD4+ linfócitos T CD4-positivo

CD8+ linfócitos T CD4-positivo

CEMA Centro de Mama

CEP Comitê de ética em pesquisa

CDI carcinoma ductal invasor

CLI carcinoma lobular invasor

CMV citomegalovírus

EA esvaziamento axilar

HER-2/NEU fator de crescimento epidérmico humano

INCA Instituto Nacional do Câncer

KLRG1 killer cell lectin-like receptor G1

QT quimioterapia

RE receptor de estrogênio

RH receptores hormonais

RPG receptor de progesterona

RT radioterapia

SBM Sociedade Brasileira de Mastologia

SUS Sistema único de saúde

PUCRS Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Rotina de coleta dos dados (página 23)

FIGURA 2: Eventos adversos no seguimento de 19,1 meses (página 28)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Perfil sociodemográfico, tratamento e características tumorais (página 27)

TABELA 2: Relação de células T CD4+/CD8+ em pacientes jovens, idosas, axila positiva e negativa para metástases (página 28)

TABELA 3: Relação de células T CD4+/CD8+ com o tamanho tumoral menor ou maior que 2cm (página 29)

TABELA 4: Perfil imunohistoquímico do tumor e a relação com o perfil imunológico de risco de pacientes com câncer de mama (página 29)

TABELA 5: Eventos adversos no seguimento médio de 19,1 meses e os valores de CD4+/CD8+ (página 30)

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Relação de células T CD4/CD8 em pacientes com mais de 60 anos, comparando os grupos com receptores hormonais (RH) positivos e Her-2/neu negativo; Her-2/neu positivo; triplo negativo (RH e Her-2/neu negativo) (página 33)

PERFIL DE RISCO IMUNOLÓGICO DE IDOSAS COM CÂNCER DE MAMA

RESUMO

A população de idosos é hoje a que mais cresce no mundo. O sistema imune torna-se comprometido com a idade, sendo menos eficaz no combate a neoplasias malignas. Uma taxa alterada de células T CD8 positivo (CD8+), aumentada em relação às células CD4 positivo (CD4+) (normalmente mais freqüentes no sangue) define o conceito de perfil de risco imunológico no idoso (relação menor que 1). Nesta pesquisa, estudamos o perfil imunológico de 58 mulheres com câncer de mama, determinando a relação das células T CD4+/CD8+ no sangue periférico. Comparamos esta relação em grupos conforme a idade da paciente (menos ou mais que 60 anos), o comprometimento linfonodal, o tamanho do tumor, o perfil imunohistoquímico, e a ocorrência de eventos adversos (recidiva local, axilar e metástases). A proporção de linfócitos T CD4+/CD8+ média foi 1,87 (1,1 a 3,32), portanto, nenhuma paciente apresentou por conceito perfil imunológico de risco. Comparando os grupos conforme a idade, a presença de metástases linfonodal, tumores menores versus maiores que 2cm não houveram diferenças estatisticamente significativas. No entanto, a relação CD4+/CD8+ em pacientes positivos para o fator de crescimento epidérmico humano (Her-2/neu) foi mais elevada do que em amostras de pacientes com carcinomas receptor hormonal positivos e Her-2/neu negativo ($p=0,036$). Tanto quanto foi possível pesquisar, estes são os primeiros dados sobre células T CD4+ e CD8+ especificamente em uma população com câncer de mama. O aumento do número de linfócitos T CD4+/CD8+ circulante evidenciado nestas mulheres com carcinoma Her-2/neu positivo, parece sinalizar uma ativação do sistema imunológico em mulheres com tumores de pior prognóstico.

PALAVRAS CHAVES: geriatria, neoplasias da mama, prognóstico, imunologia, linfócitos T CD4 positivo, linfócitos T CD8 positivo.

IMMUNE RISK PROFILE OF ELDERLY WITH BREAST CANCER

ABSTRACT

The elderly population is now the fastest growing in the world. The immune system becomes compromised with age, being less effective in fighting malignancies. An amended fee of CD8 T cells, increased compared to CD4 cells (usually more frequent in the blood) defines the concept of immune risk profile in the elderly (less than 1 ratio). In this research, we studied the immunological profile of 58 women with breast cancer, determining the ratio of CD4+/CD8+ in peripheral blood. We compare this link into groups according to age of the patient (less or more than 60 years), lymph node involvement, tumor size, the immunohistochemical profile, and the occurrence of adverse events (local recurrence, axillary recurrence and metastasis). The ratio of CD4+/CD8+ lymphocytes average was 1.87 (1.1 to 3.32), therefore, no patient had a concept immune risk profile. Comparing the groups according to age, the presence of lymph node metastases, tumors smaller or higher than 2 cm, were no statistically significant differences. However, the CD4 / CD8 ratio in patients positive for human epidermal growth factor (HER-2 / neu) was higher than in samples of patients with hormone receptor positive carcinoma and Her-2 / neu negative ($p = 0.036$). As far as was possible to search, these are the first data on CD4+ and CD8 T+ cells specifically in a population with breast cancer. The increase in the number of CD4+/CD8+ current evidenced in these women with Her-2 carcinoma / neu positive, seems to signal an activation of the immune system in women with poor prognosis of tumors.

KEYWORDS: geriatrics, breast cancer, prognostic, immunology, linfocitos CD4 positive, linfocitos CD8 positive.

SUMARIO

	Página
I- Introdução _____	13
II- Revisão da Literatura _____	14
II. 1- Envelhecimento populacional	
II. 2- Imunosenescência	
II. 3- Células T e infecção pelo Citomegalovírus	
II. 4- Perfil imunológico de risco	
II.5- Câncer de mama em mulheres idosas	
III- Justificativa _____	20
IV – Objetivos _____	21
V - Metodologia _____	22
VI – Análise Estatística _____	24
VII – Resultados _____	25
VIII - Discussão _____	31
IX- Conclusões _____	34
X- Referências Bibliográficas _____	35
XI – Anexos _____	39
ANEXO 1 – Ficha com dados pessoais e demográficos	
ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	
ANEXO 3 - Carta de aprovação da pesquisa pela Comissão Científica do IGG	
ANEXO 4- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS	
ANEXO 5- Artigo Publicado	
ANEXO 6 – Artigo enviado para Publicação	
ANEXO 7 – Comprovante do envio do artigo para a revista J Cancer Res Clin Oncol	

I. INTRODUÇÃO

A população de idosos é hoje a que mais cresce no mundo. O sistema imune torna-se comprometido com a idade, sendo menos eficaz no combate a neoplasias malignas. Isso resulta em maior índice de tumores malignos na população idosa, além de maior morbidade e mortalidade por causas oncológicas (1- 4). A função das células T nos idosos está comprovadamente afetada, e é característica do envelhecimento uma diminuição no repertório desses linfócitos, com expansão de alguns clones com especificidade restrita. Uma taxa alterada de células T CD8 positivo (CD8+), aumentada em relação às CD4 positivo (CD4+) (normalmente mais freqüentes no sangue) vem sendo associada com risco imunológico no idoso, e evidências recentes sugerem que as infecções virais por vírus da família herpesviridae, como o Citomegalovírus (CMV), recorrentes ao longo da vida e normalmente assintomáticas, podem ser determinantes nessas alterações (5,6).

Neste intenso processo de envelhecimento populacional, sabemos que a população idosa é predominantemente feminina. Com o avançar da idade aumentam as chances de determinadas doenças, como as patologias cardíacas, respiratórias e alguns tipos de câncer. Especificamente na população feminina idosa a neoplasia de maior incidência é de mama (1 – 4). O câncer de mama é uma doença crônica degenerativa de grande impacto social e emocional na população feminina e sua incidência aumenta proporcionalmente com a idade (4). A chance de diagnosticarmos um câncer de mama em uma mulher de 30 anos de idade é de um caso em 2212 mulheres; já com 60 anos um caso a cada 23 mulheres, e com mais de 80 anos um caso a cada 8 mulheres (1).

Alterações no sistema imune podem ser responsáveis por este aumento de neoplasia mamária nas mulheres com mais de 60 anos de idade (1,5). Assim, nós propomos analisar o perfil de risco imunológico de mulheres idosas e testar se esse pode ser um fator preditivo confiável para determinar tipos de tratamento e seguimento oncológico. Os resultados obtidos aqui poderão fornecer elementos para elaboração de novas políticas de saúde de atenção ao idoso.

II. REVISÃO DA LITERATURA:

II. 1- Envelhecimento populacional

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea. Este fenômeno ocorreu inicialmente em países desenvolvidos, mas, mais recentemente é nos países em desenvolvimento que o envelhecimento da população tem ocorrido de forma mais acentuada. No Brasil, o número de idosos (60 anos ou mais de idade) passou de 3 milhões em 1960, para 7 milhões em 1975 e 14 milhões em 2002 (um aumento de 500% em quarenta anos) e estima-se que alcançará 32 milhões em 2020 (4).

As perdas e alterações que ocorrem nas células, quando atingem a senescência, aumentam a vulnerabilidade do organismo para doenças. Assim, nos últimos anos as pesquisas para entender como as células envelhecem, como perdem a capacidade de desempenhar corretamente as suas funções e como morrem têm auxiliado a entender melhor determinadas doenças, como as neoplasias que atingem os idosos. Existem diversas teorias do envelhecimento, entre elas podemos citar: teoria das mutações somáticas, do erro catastrófico, do dano oxidativo e dos radicais livres, genética, neuroendócrina, imunológica e metabólica.

Nesta pesquisa focamos especificamente na teoria imunológica do envelhecimento. Esta teoria tem como base que com a idade a capacidade do organismo de produzir anticorpos diminui, além de produzir em determinadas situações erroneamente anticorpos contra proteínas normais do organismo levando a perda da homeostase. Acredita-se que o declínio da resposta imune está associado a involução do timo, órgão responsável pela maturação dos linfócitos T (6-8).

II 2- Imunosenescência

O envelhecimento das funções do sistema imunológico é conceitualmente chamando de imunosenescência. A maioria dos estudos sobre imunosenescência têm focado principalmente o envelhecimento relacionado às funções das células T. Estudos anteriores relatam defeitos nas rotas de sinalização, diminuição na taxa de proliferação

em resposta a antígenos específicos, aumento nos fenótipos de memória, alteração na produção de citocinas, diminuição das respostas por células T citotóxicas (7 - 9).

Um fenômeno relacionado a essas observações é a diminuição do repertório das células T no idoso, ou seja, a expansão de alguns clones com especificidade restrita, em detrimento da variabilidade clonal que se observa na juventude (8). A restrição de especificidades do repertório T leva à diminuição da capacidade do indivíduo de responder a novas e variadas infecções. A expansão clonal observada no envelhecimento é principalmente de células T CD8+, as principais envolvidas no combate a infecções virais e tumores (7,9,10).

O fenômeno da expansão clonal de células T CD8+ com a idade já é conhecido em camundongos há muitos anos (9). Este evento começa a ser observado em camundongos a partir dos 16 meses de idade, e a existência de populações clonais em camundongos velhos influencia totalmente o perfil da resposta imune obtida em resposta a antígenos nesses animais (9 - 13). Um fato interessante é que essas células clonais não são malignas, nem em humanos nem em camundongos, e não aumentam o número total de células T CD8+ circulantes em um indivíduo como um tumor de célula T CD8+ o faria. Isso sugere que há fatores que limitam o crescimento dessas e das demais células T CD8+ num indivíduo, assim como sugere que vírus como o CMV influenciam o desenvolvimento dessas células agindo sobre um mecanismo específico. Estudos de bloqueio por anticorpos sugerem que a proliferação dessas células está ligada à produção de IL-15 e IL-2 (14).

II. 3- Células T e infecção pelo Citomegalovírus (CMV)

Mais recentemente, novas ferramentas de análise de populações clonais de células T CD8+ em humanos revelou que esses clones possuem um fenótipo alterado, não necessariamente de memória ou naive. Além disso, foi reportado que as células T CD8+ resultantes de infecções repetidas por CMV apresentam um fenótipo semelhante, suscitando a hipótese de que as repetidas infecções virais seriam a força por trás dessas alterações imunes associadas com a idade (15).

Clinicamente, a infecção por CMV é geralmente assintomática em indivíduos normais, com a memória por células T sendo rapidamente estabelecida e mantida indefinidamente, mesmo em neonatos. A importância crucial de manter uma defesa constante contra tal infecção assintomática é dramaticamente demonstrada em pessoas

imunossuprimidas, como transplantados e pacientes com HIV, em que o escape viral pode ser fatal. Contudo, mesmo pessoas imunocompetentes e saudáveis podem apresentar sintomas de infecção por CMV mais comumente do que é compreendido, sendo a idade implicada como um fator de risco (7, 16 - 18). Contudo em geral mesmo os idosos parecem manter uma imunovigilância aceitável contra o CMV sem sintomas agudos, contrariamente ao que acontece com outro herpesvirus, o Varicella Zoster. Este vírus é responsável pela catapora na infância mas pode reativar, normalmente com a idade, causando sintomas altamente dolorosos, algo relacionado á diminuição da imunidade com o envelhecimento (18 - 20).

Estudos em células T CD8⁺ reconhecedoras de terâmeros (reagentes fluorescentes que coram apenas as células que carregam receptores antigênicos específicos para um epítipo) ligantes de HLA-A2/pp65 (495–503) demonstraram que essas células estão aumentadas em idosos, e que a proporção dessas células que co-expressam CD27 e CD28 (marcadores de ativação funcional e co-estimulação) está muito diminuída nos idosos comparados com jovens (19). No caso mais dramático, cerca de 27% das células T CD8⁺ de um indivíduo eram específicas para um epítipo de CMV. Nos jovens, uma proporção significativa de células T CD8⁺ específicas para CMV é naive (CCR7⁺CD45RA⁺), ou seja, nunca experimentou contato com antígeno. Mas em indivíduos idosos, essas células possuem fenótipo efetor associado com memória (CCR7^{null} CD45RA^{low} or CCR7^{null} CD45RA⁺). Existe uma expansão associada com a idade de células de memória que não expressam CD27, CD28, CCR7, ou CD45RA (17).

Em relação á integridade funcional dessas células anti-CMV expandidas com a idade, vê-se que o número dessas células que são funcionais (respondem ao desafio com peptídeo viral in vitro fazendo interferon-gama) é semelhante em idosos e jovens (10). Contudo, o número dessas células específicas que não são funcionais, ou seja, respondem a desafio com mitógeno in vitro mas não a peptídeos de CMV, é altamente elevado nos idoso. Essas células expressam o receptor killer cell lectin-like receptor G-1 (KLRG1⁺), um marcador de diferenciação e resistência à apoptose(19). Essas células alterada então proliferam em detrimento de células funcionais, contribuindo para o perfil generalizadamente inflamatório descrito em idosos, resultando na incapacidade do indivíduo de montar respostas policlonais adequadas à medida que envelhece (18-21).

II. 4- Perfil imunológico de risco

O conceito de perfil imunológico de risco tem sido considerado quando há uma relação de células T CD4+ e CD8+ menor que 1 (um), associado com sorologia positiva para CMV. A literatura descreve a prevalência de risco imunológico entre 15 - 20% da população em geral (5,16-18,21). Não há dados na literatura, até a presente data, sobre a análise da relação de células T CD4+/CD8+ e a sorologia para CMV especificamente em mulheres idosas com neoplasia mamária.

II- 5. Câncer de mama em mulheres idosas

Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se que 58 mil novos casos de câncer de mama sejam diagnosticados em 2015. No Rio Grande do Sul, é a neoplasia maligna de maior incidência na população feminina (não considerando o câncer de pele não melanoma). Em torno de dois terços dos casos de câncer de mama ocorre em mulheres acima dos 60 anos de idade (27,32).

O câncer de mama na mulher idosa apresenta características consideradas de menor risco se comparadas com aquelas observadas em mulheres jovens, tais como: baixos índices de proliferação celular, expressão normal do gene p53, DNA diplóide, receptores hormonais (RH) positivos, receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her-2/neu) negativo (1,26,27). Com isso, a tendência é apresentar uma evolução mais lenta, com maior diferenciação histológica e melhor resposta hormonal, tornando o tumor menos agressivo. Como existem poucos estudos focados especificamente no tratamento adjuvante de mulheres idosas com câncer de mama, estas pacientes recebem muitas vezes um tratamento excessivo, conceitualmente hoje chamado de “*overtreatment*” (28).

O tipo histológico mais comum é o carcinoma ductal invasor (CDI). Tem sido citados ainda outros tipos histológicos na população idosa, de evolução mais favorável, como: carcinoma mucinoso, papilífero e tubular. O carcinoma mucinoso representa 1% dos casos de câncer de mama nas mulheres pré-menopáusicas, entretanto, representa 5% dos casos nas mulheres entre 75 e 85 anos, e cerca de 7% nas mulheres com mais de 85 anos. Este tipo histológico apresenta ótimo prognóstico em diversos estudos (29).

O quadro clínico é semelhante ao de outros grupos etários. Frequentemente, apresenta-se como um nódulo endurecido palpável, de evolução lenta. A neoplasia

maligna também pode se apresentar clinicamente com alterações na pele da mama, retração de mamilo ou até descarga papilar espontânea. Na idosa, são relatadas taxas significativamente baixas de metástase linfonodal axilar (1,26,27).

A sensibilidade e a especificidade da mamografia para detectar câncer aumentam com a idade devido ao aumento da radiotransparência dos tecidos mamários, processo de lipossustituição que ocorre com a idade. Dessa forma, a mamografia ocupa uma posição central dentro dos métodos diagnósticos na população idosa. A Sociedade Americana de Cancerologia (ACS) e a Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM) recomendam que o rastreamento mamográfico anual do câncer de mama seja sugerido a todas as pacientes com expectativa de vida maior ou igual a 5 anos (1,26).

O tratamento do câncer de mama nas idosas começa com uma boa avaliação pré-operatória. Nesta avaliação, além do risco da cirurgia, é importante uma análise objetiva da expectativa de vida, da capacidade física e mental, das comorbidades, do estado nutricional e das medicações usadas. Esses fatores são importantes para definir o tratamento em qualquer idade, mas principalmente nas pacientes idosas. Todos esses fatores, juntamente com o respeito à opinião do paciente, podem influenciar na escolha do tratamento (26 – 27).

As taxas de mortalidade da cirurgia para o tratamento do câncer de mama nessas pacientes é baixa, sendo menores que 0,3%. As indicações para cirurgia conservadora ou mastectomia seguem às mesmas definidas para as pacientes mais jovens, levando em conta principalmente a proporção tamanho da mama / tamanho do tumor (26). A cirurgia ainda é alternativa principal para o tratamento se a expectativa de vida for superior a cinco anos (1,27).

A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) será indicada nos casos de axila clinicamente negativa, proporcionando menor morbidade, com as mesmas vantagens prognósticas e terapêuticas do esvaziamento axilar convencional (27).

A indicação de radioterapia deve levar em conta o estado geral da paciente, risco de morte por suas comorbidades (principalmente cardíacas e vasculares) e o risco de recorrência local (26,27).

A escolha pela terapia hormonal adjuvante será determinada considerando o risco de recorrência local, a biologia tumoral e os efeitos adversos. Para as pacientes idosas com câncer de mama com receptores hormonais (RH) positivos, a terapia endócrina adjuvante, com tamoxifeno ou inibidor da aromatase, deve ser considerada. As

exceções para o uso da terapia endócrina são comorbidades importantes que contradizem seu emprego ou uma expectativa de vida reduzida (26,29).

O tratamento quimioterápico deve ser individualizado, levando em consideração o benefício absoluto estimado, a expectativa de vida e a tolerância ao tratamento. A idade por si só não é um fator limitante quanto aos benefícios da quimioterapia. Embora os benefícios pareçam diminuir com o avançar da idade das pacientes, percebe-se que em pacientes com linfonodos positivos e receptores hormonais negativos, a quimioterapia traz um benefício real na sobrevida. Pacientes idosas com BLS negativo e receptores de estrogênio positivo têm baixo benefício com o emprego de quimioterapia (1,27,29).

Em estudo publicado em 2006, que inclui mulheres com mais de 70 anos com câncer de mama estágio I e II, mostrou que pacientes com tumores receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2/NEU) positivo apresentaram taxas maiores de recorrência em 5 anos se comparadas às HER-2/NEU negativo (30% *versus* 3%) e menores taxas de sobrevida livre de doença (86% *versus* 98%). Desta forma, ressalta-se a importância de selecionar as idosas que apresentam tumores HER-2 positivo que podem se beneficiar com a adjuvância com trastuzumab . Além disso, estes dados deixam claro o pior prognóstico pacientes idosas com tumores HER-2/NEU positivo (39).

III. JUSTIFICATIVA:

Este projeto de pesquisa se justifica pelo envelhecimento populacional, pela alta incidência de câncer de mama nas idosas e pela falta de dados na literatura para determinar um perfil imunológico especificamente nas mulheres idosas com neoplasia mamaria maligna.

Os resultados obtidos poderão fornecer elementos para a decisão do tratamento cirúrgico, quimioterápico e seguimento do câncer de mama. Poderemos, por exemplo, utilizar o perfil imunológico das pacientes na tomada de decisão sobre a necessidade de quimioterapia. Idosas sem perfil imunológico de risco poderiam, muitas vezes, ser poupadas da medicação anti-neoplásica.

Nós propomos analisar o perfil de risco imunológico de mulheres idosas com câncer de mama e testar se este pode ser um fator preditivo confiável para escolha de tratamentos complementares e seguimento destas pacientes. Se a hipótese for confirmada, poderemos estender os testes hoje realizados CD4/CD8 nos pacientes HIV positivo para identificar as mulheres com mais risco de eventos adversos como recorrência local, metástases à distância e óbito.

IV. OBJETIVOS:

Objetivo Principal:

- Estudar o perfil imunológico das mulheres idosas com câncer de mama, determinando a relação das células T CD4+/CD8+ e a sorologia para CMV.

Objetivos secundários:

- Comparar a relação das células T CD4+/CD8+ das idosas (mulheres com mais de 60 anos no momento do diagnóstico) verso as pacientes jovens com câncer de mama.
- Verificar o perfil imunológico das pacientes com câncer de mama conforme o comprometimento linfonodal.
- Verificar se o perfil imunológico da paciente tem relação com o tamanho do tumor na mama.
- Verificar se o perfil imunológico da paciente tem relação com o tipo histológico do tumor.
- Verificar se o perfil imunológico da paciente tem relação com o perfil imunohistoquímico do tumor.
- Verificar se existe um perfil imunológico, considerando a relação células T CD4+/CD8+ e a sorologia para CMV, de maior risco para recidiva local, recidiva axilar e metástases nas pacientes com neoplasia mamária.

V. METODOLOGIA

Delineamento:

Estudo de coorte.

População:

Mulheres com diagnóstico de câncer de mama que realizaram tratamento cirúrgico no Centro de Mama da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEMA PUCRS) pelo Sistema Único de Saúde (SUS) entre dezembro de 2012 e janeiro de 2014.

Critérios de inclusão:

- 1- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido
- 2- Sexo feminino
- 3- Diagnóstico de câncer de mama

Critério de exclusão:

- 1- Diagnóstico de HIV positivo
- 2- Imunossupressão após transplante de órgãos
- 3- Realização de quimioterapia neoadjuvante

Rotina da coleta de dados e seguimento:

Foram convidadas a participar da pesquisa as pacientes do CEMA PUCRS conforme os critérios de inclusão, durante a consulta de pré-operatório (quadro 1). Através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2) as pacientes recebiam o conhecimento dos objetivos do estudo, riscos e seguimento. A pesquisa iniciou após aprovação do Comitê e Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS (anexo 4).

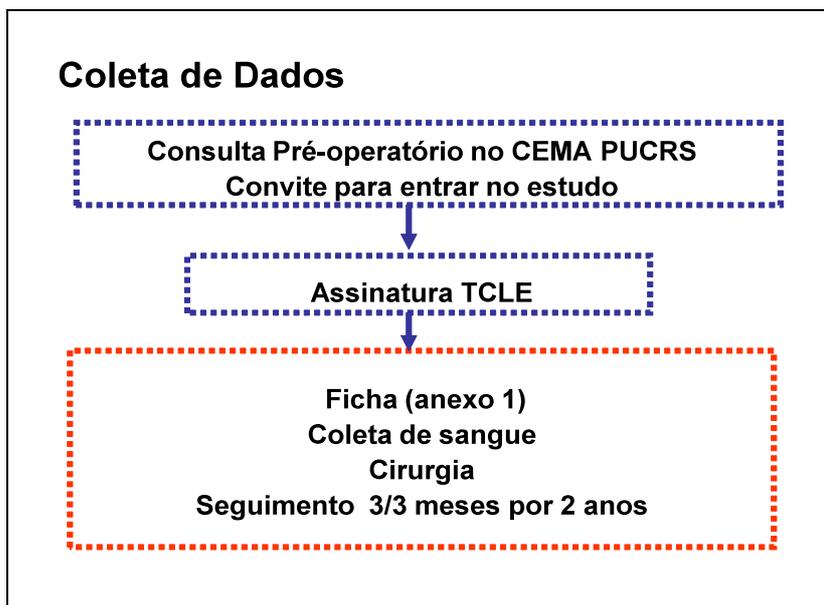
A ficha (anexo 1) com informações de identificação, tratamento e comorbidades foi preenchida pelo pesquisador com os dados do prontuário. As pacientes que concordaram em participar do estudo realizaram o seguimento de rotina no CEMA

PUCRS (3/3 meses por dois anos) para detectar eventos adversos: recidiva local do câncer de mama, metástases e óbito.

A pesquisa iniciava após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2). Foram coletadas amostra de 10 ml de sangue venoso no pré-operatório. O sangue foi processado para isolamento de células mononucleares e isolamento de plasma no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da PUCRS. Todas as pacientes tiveram suas células marcadas com anticorpos CD4+ / CD8+ e sorologia para CMV.

Os dados foram armazenados em planilhas de Excel para determinação do perfil de risco e posterior cruzamento com os dados obtidos no seguimento. Nos casos que apresentaram recidiva local do tumor de mama, recidiva axilar ou lesões metastáticas forma coletadas uma nova amostra de sangue para dosagem de células T CD4+ / CD8+ e sorologia para CMV.

FIGURA 1: Rotina de coleta dos dados



VI - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Abordagem Analítica

Os dados coletados foram tabulados e analisados através de computador utilizando o programa Microsoft Office Excel e o programa Epi Info de acordo com a metodologia descrita.

- Estatística descritiva: para as variáveis quantitativas de distribuição normal foram calculados média, desvio padrão, valor mínimo e máximo. Os dados qualitativos foram sumariados através de frequência em cada classe e percentagem.
- Análise univariada: os testes estatísticos que foram utilizados são o teste “t” de Student para amostras pareadas e independentes e variáveis quantitativas; teste não paramétrico de Mann Whitney para variáveis quantitativas que não satisfizeram as exigências do teste “t”; teste de Wilcoxon - Mann- Whitney (WMW) para amostras independentes; teste do qui-quadrado, para variáveis categóricas; teste “Exato de Fisher”, para categóricas dicotômicas que não satisfizeram as exigências do qui-quadrado.

São considerados significativos valores p menores que 0,05.

VII. RESULTADOS

Conforme os critérios de inclusão foram selecionadas a participar da pesquisa 58 mulheres entre dezembro de 2012 e janeiro de 2014, com idade média de 60,27 (mínimo 30 – máximo 87) anos no momento do diagnóstico do câncer de mama. No grupo das pacientes jovens (com menos de 60 anos) (grupo 1) há 15 mulheres e no grupo das pacientes idosas há 43 mulheres (grupo 2). O perfil sociodemográfico, o tratamento realizado e as características tumorais estão resumidas na TABELA 1.

O tratamento cirúrgico da mama foi uma ressecção segmentar em 29 (50%) pacientes, mastectomia em 23 (39,6%) pacientes e adenomastectomia em 6 (10,4%) pacientes. A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) foi realizada em 55 pacientes e 3 pacientes foram submetida diretamente ao esvaziamento axilar completo por apresentar uma axila clinicamente positiva no momento da cirurgia. Destas 55 pacientes que realizaram BLS, em 15 (27,3%) pacientes o linfonodo sentinela foi positivo para metástases, e o esvaziamento axilar completo foi então realizado em 10 pacientes. As 5 pacientes com linfonodo sentinela positivo e que não realizaram esvaziamento axilar apresentavam critérios de tratamento axilar conforme estudo ACOSOG Z0011 (23).

O laudo anatomopatológico descreve 44 (75,8%) carcinomas ductais invasores, 10 (17,2%) carcinomas lobulares, 2 (3,5%) carcinomas medulares e 2 (3,5%) carcinomas tubulares.

Os tumores foram considerados RH positivo se pelo menos 1% dos núcleos esta corado no receptor de estrogênio (RE) ou receptor de progesterona (RPG) (24) e classificados para ser HER-2/NEU positivo se imunohistoquímica foi de 3 ou 2 e FISH foi positivo de acordo com as diretrizes da ASCO (25). Assim, neste grupo há 48 tumores RH positivos, 19 tumores HER-2/NEU positivos e 10 triplo negativos (RH e HER-2/NEU negativo).

Como tratamento adjuvante, todas as pacientes que realizaram cirurgia conservadora de mama e adenomastectomia receberam radioterapia; das pacientes mastectomizadas (n = 23), a radioterapia complementar foi realizada em 12 casos. Todas as mulheres com RH positivos (n= 48 / 82,75%) receberam hormonioterapia, assim como todas HER-2/NEU positivo (n= 19 / 32,75%)

receberam trastuzumab. E a quimioterapia adjuvante foi aplicada em 37 (63,8%) pacientes (TABELA 1).

Em um seguimento médio de 19,1 (1 - 24) meses, ocorreu uma (1,72%) recidiva local, uma (1,72%) recidiva axilar e uma (1,72%) paciente foi diagnosticada com metástases ósseas (FIGURA 1). Todas as pacientes incluídas no estudo estão vivas no seguimento de rotina do CEMA PUCRS.

A relação dos linfócitos T CD4+ / CD8+ média foi de 1,87 (mínimo 1,1 – máximo 3,32). Todas as pacientes (100%) apresentaram IgG reagente para CMV.

Comparando a relação linfócitos T CD4+ / CD8+ entre pacientes jovens (grupo 1) e idosas (grupo 2), encontramos no grupo 1 uma média de 1,84 e no grupo 2 uma média de 1,72 ($p = 0,21$). As pacientes com axila negativa para metástases apresentaram a relação linfócitos T CD4+ / CD8+ média de 1,58. Enquanto que, nas pacientes com axila positiva para metástases, esta relação foi de 1,98 ($p = 0,40$) (TABELA 2).

Nas 27 pacientes com tamanho tumoral menor que 2 cm, a relação CD4+ / CD8+ foi de 1,6. Já nas 31 pacientes com tumores maiores que 2 cm, foi de 1,79 ($p = 0,26$) (TABELA 3). E quando analisamos o perfil imunológico, temos uma relação de CD4+ / CD8+ para RH positivo de 1,51; Her-2/neu de 1,89 e nos tumores triplos negativos (RH negativo e Her-2/NEU negativo) de 1,71 ($p=0,22$) (TABELA 4).

No seguimento deste grupo de pacientes ocorreram 3 (três) eventos adversos, os valores de CD4+ /CD8+ no momento do diagnóstico do câncer de mama e do evento estão descritos na TABELA 5.

TABELA 1: Perfil sociodemográfico, tratamento e características tumorais (n= 58)

<u>Grupos de estudo</u>	
Idade	60,27 (30 – 87) anos
• grupo 1 = jovens (n= 15)	41,32 (30 – 59) anos
• grupo 2 = idosas (n = 43)	69,45 (60 – 87) anos
Cirurgia	
Mama	
- ressecção segmentar	29 (50%) pacientes
- mastectomia	23 (39,6%) pacientes
- adenomastectomia	6 (10,4%) pacientes
Axilar	
- Linfonodo Sentinela	55 pacientes
- Esvaziamento axilar	13 pacientes
Tipo histológico	
- Carcinoma Ductal invasor	44 (75,8%) tumores
- Carcinoma Lobular invasor	10 (17,2%) tumores
- Carcinoma Medular	2 (3,5%) tumores
- Carcinoma Tubular	2 (3,5%) tumores
Perfil Imunohistoquímico	
- RH positivo	48 tumores
- HER-2/NEU positivo	19 tumores
- Triplo negativo	10 tumores
Radioterapia	47 (81%) pacientes
Quimioterapia	37 (63,8%) pacientes

FIGURA 2: Eventos adversos no seguimento de 19,1 meses (n = 58).

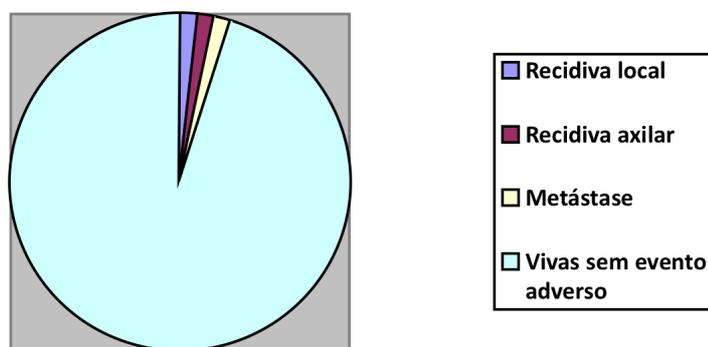


TABELA 2: Relação de células T CD4+/CD8+ em pacientes jovens, idosas, axila positiva e negativa para metástases (N = número de pacientes; P = valor de p).

	CD4+/CD8+	N	P
Jovens (grupo 1)	1,84	15	0,21
Idosas (grupo 2)	1,72	43	
Axila negativa	1,58	40	0,40
Axila positiva	1,98	18	

TABELA 3: Relação de células T CD4+/CD8+ com o tamanho tumoral menor ou maior que 2cm. (N = número de pacientes; p = valor de p)

	N	CD4+/CD8+ (p=0,26)
Tumor <2cm	27	1,6
Tumor >2cm	31	1,79

TABELA 4: Perfil imunohistoquímico do tumor e a relação com o perfil imunológico de risco de pacientes com câncer de mama (N = número de pacientes; p = valor de p).

	N	CD4+/CD8+ (p=0,22)
RH positivo	48	1,51
HER-2/NEU positivo	19	1,89
Triplo negativo	10	1,71

TABELA 5: Eventos adversos no seguimento médio de 19,1meses e os valores de CD4+/CD8+.

Evento adverso	CD4+:CD8+ no diagnostico	CD4+:CD8+ no evento
Recidiva local	1,5	1,7
Recidiva axilar	2,2	2,6
Metástase óssea	1,6	1,7

VIII. DISCUSSÃO

O grupo de pacientes incluídos na nossa pesquisa, por ser na maioria idosa, apresenta características tumorais de bom prognóstico. O tipo histológico mais comum foi CDI, RH positivos e HER-2/NEU negativo; exatamente como esperado nesta faixa etária (26,27). Para este grupo apresentar eventos como recidiva local, recidivas axilares e/ou metástases é necessário um seguimento longo. Nosso seguimento foi curto (médio de 19 meses), logo ocorreram poucos eventos adversos (total de 3, conforme TABELA 5). Assim, o objetivo de verificar se o perfil imunológico das pacientes pode ser usado como fator preditivo e/ou prognóstico em câncer de mama ficou prejudicado.

Outro ponto que merece destaque neste grupo de pacientes é o tamanho tumoral. Na maioria das pacientes, o tumor media mais de 2cm. Isto reflete um diagnóstico de lesões mais avançadas, uma falha nos programas de rastreamento. Todas as pacientes deste estudo foram tratadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o que infelizmente justifica esta falha no diagnóstico precoce.

A relação dos linfócitos T CD4+ / CD8+ média foi de 1,87 (1,1 – 3,32). Todas as pacientes (100%) apresentaram IgG reagente para CMV. Portanto, nenhum paciente apresentou por conceito perfil imunológico de risco (15,30).

Analisando por faixa etária, embora não houve diferenças estatisticamente significativas, o grupo das pacientes jovens apresentou a relação CD4+ /CD8+ maior que as pacientes idosas. Conforme os dados da literatura, este é o comportamento esperado destas células com a imunoscenecência. Uma taxa alterada de células T CD8+, aumentada em relação às CD4+ (normalmente mais freqüentes no sangue) parece estar associada com o risco imunológico no idoso (30,31). Mesmo nas pacientes jovens desta pesquisa, a relação CD4+ /CD8+ foi menor que a esperada para esta faixa etária. Para sabermos se esta alteração do sistema imunológico pode ser um dos responsáveis pelo desenvolvimento de uma neoplasia mamária maligna, mais estudos, com maior número de pacientes é imprescindível.

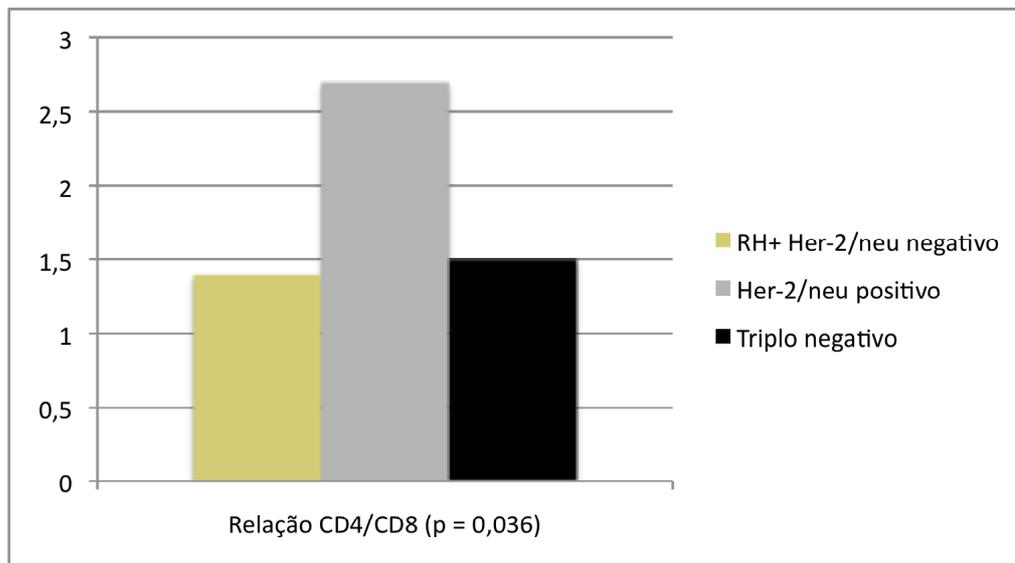
Por outro lado, em todos os grupos comparados nesta pesquisa, a relação CD4+ /CD8+ foi maior nas pacientes com pior prognóstico: tamanho tumoral maior que 2cm, axila positiva, tumores HER-2/NEU positivo. Inclusive nos 3 eventos adversos, esta relação aumentou no momento do diagnóstico da recidiva local e axilar, a no diagnóstico da metástase óssea. Estes dados parecem demonstrar um aumento da

atividade do sistema imunológico nas pacientes de pior prognóstico. Tanto quanto foi possível pesquisar, até este momento não há dados na literatura especificamente sobre a taxa CD4+ /CD8+ no sangue periférico de mulheres com diagnóstico de câncer de mama.

Existem estudos sobre as células T-reg no sangue periférico de pacientes com diversas neoplasias malignas (33 -35). Em uma pesquisa conduzida por Decker et al, analisaram o número de células T-reg no sangue periférico de 292 pacientes recentemente diagnosticados com câncer da mama, os números de T-reg no sangue periférico de pacientes HER-2/NEU positivo foram mais elevados do que em amostras de pacientes com RH positivos e HER-2/NEU negativo (34). Os mecanismos que levam a expansão das células T-regs em pacientes com HER-2/NEU positivo não foi definido na literatura até este momento. No entanto, alguns estudos já demonstraram que as células de câncer de mama HER-2/NEU positivo são especialmente capazes de estimular respostas imunológicas (36,37).

Considerando estes estudos, analisamos especificamente nosso grupo de pacientes HER-2/NEU com mais de 60 anos de idade, comparando com as pacientes RH positivo, HER-2/NEU negativo e as triplo negativas (n= 43). Houve uma diferença estatisticamente significativa entre estes grupos, mostrando uma maior taxa de células T CD4+/CD8+ nas pacientes HER-2/NEU positivo (p = 0,036) (Figura 2). O oncogene HER-2/NEU é um dos fatores mais relevantes prognósticos e preditivos para pacientes com câncer de mama. A superexpressão HER-2/NEU, que ocorre em 20% de todos os cânceres de mama, tem sido associada a um mau prognóstico (29). No nosso grupo de pacientes idosas, houve associação estatisticamente significativa entre o aumento da relação CD4+/ CD8+ e tumores com um prognóstico ruim (HER-2/NEU positivo) (GRÁFICO 1). A discussão sobre estes dados é o principal objetivo do nosso artigo submetido para publicação na revista *JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY* (ANEXO 6 E 7).

GRAFICO 1: Relação de células T CD4/CD8 em pacientes com mais de 60 anos, comparando os grupos com receptores hormonais (RH) positivos e Her-2/neu negativo; Her-2/neu positivo; triplo negativo (RH e Her-2/neu negativo) ($p = 0,036$)



IX. CONCLUSÕES

- No grupo de pacientes estudadas nenhuma pacientes apresentou perfil imunológico de risco considerando a relação de células T CD4+/CD8+ e a sorologia para CMV no sangue periférico.
- A relação das células T CD4+/CD8+ das idosas foi menor que das pacientes jovens com câncer de mama, embora sem diferença estatisticamente significativa.
- Pacientes com linfonodos positivos para metástases e tumor maior que 2 cm, apresentaram uma maior taxa CD4+/ CD8+ no sangue periférico, quando comparado com os casos de linfonodo negativo para metástase e tumor menor que 2 cm.
- Nos 3 eventos adversos que ocorreram neste seguimento médio de 19 meses, a relação CD4+/CD8+ aumentou, sinalizando uma ativação do sistema imunológico.
- A relação de células T CD4+/ CD8+ foi maior nas pacientes idosas com carcinoma mamário HER-2/NEU positivo ($p = 0,036$) em relação aos outros perfis imunohistoquímicos.
- O sistema imunológico, neste estudo focado na relação dos linfócitos T CD4+/CD8+ dosados no sangue periférico, parece estar ativado em pacientes com tumores de pior prognóstico. A utilização destas células como fator preditivo e/ou prognóstico necessita de estudos com maior número de pacientes e maior tempo de seguimento.

X- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crivellari D, Aopro M, Leonard R, et al. Breast Cancer in the Eldery. *Jour Clin Oncology* 2007; 25 (14): 1882 – 90.
2. Kaufmann M, Morrow M, Mickwitz G, et al. Locoregional Treatment of Primary Breast Cancer. *Cancer* 2010; 0: 1-8.
3. Hansen D, Viegas J, Vollbrecht B, et al. Câncer de Mama em Mulheres Idosas. *Atualizações em Geriatria e Gerontologia II: Abordagens Multidisciplinares e Interdisciplinares*. Porto Alegre: EdiPUCRS 2009; 47 – 63.
4. Abdo C. *Estudo Populacional do Envelhecimento no Brasil*. São Paulo: Segmento Farma; 2009
5. Saltzman RL, Peterson PK. Immunodeficiency of the elderly. *Rev Infect Dis* 1987;9(6):1127-39.
6. Schwanke CHA, Gomes I, Pedro REL, et al. *Atualizações em Geriatria e Gerontologia II: Abordagens Multidisciplinares e Interdisciplinares*. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2009.
7. HayFlick, L. *Como e por que envelhecemos*. Rio de Janeiro: Campos; 1997
8. Bynoe MS, Bonorino P, Viret C. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ suppressor T cells: peripheral versus in situ immunoregulation. *J Neuroimmunol* 2007;191(1-2):61-9.
9. Paula C, Motta A, Schmitz C, Nunes CP, Souza AP, Bonorino C. Alterations in dendritic cell function in aged mice: potential implications for immunotherapy design. *Biogerontology* 2009;10(1):13-25.
10. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 2002;169(4):1984-92.
11. Callahan JE, Kappler JW, Marrack P. Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. *J Immunol* 1993;151(12):6657-69.
12. Clambey ET, van Dyk LF, Kappler JW, Marrack P. Non-malignant clonal expansions of CD8+ memory T cells in aged individuals. *Immunol Rev* 2005;205:170-89.

13. Clambey ET, Kappler JW, Marrack P. CD8 T cell clonal expansions & aging: a heterogeneous phenomenon with a common outcome. *Exp Gerontol* 2007;42(5):407-11.
14. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8⁺ T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004;200(7):825-34.
15. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev* 2005;205:257-68.
16. Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, et al. Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* 2003;102(5):1779-87.
17. Koch SD, Kempf J, Pawelec G. T Cell Immunity and Aging. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005 (48):37.
18. Fulop T, Larbi A, Wikby A, Mocchegiani E, Hirokawa K, Pawelec G. Dysregulation of T-cell function in the elderly: scientific basis and clinical implications. *Drugs Aging* 2005;22(7):589-603.
19. Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi AI, et al. Large numbers of dysfunctional CD8⁺ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol* 2003;23(4):247-57.
20. Derhovanessian E, Theeten H, Hahnel K, Van Damme P, Cools N, Pawelec G. Cytomegalovirus associated accumulation of late differentiated CD4 T cells correlates with poor humoral response to influenza vaccinations. *Vaccine* 2013 (31): 685 - 90.
21. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 2002;7:d1056-183.
22. Barrilas DU, Salazar HAV, Rangel DG, Cabrero IA, Aguirella P, Delagno AG, et al. Is human cytomegalovirus associated with breast cancer progression? *Infections Agents and Cancer* 2013 (8): 1-5.
23. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary Dissections vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastases - a randomized clinical trial. *JAMA* 2011; 305 (6): 569 - 75.

24. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC (2010) American Society of Clinical Oncology/ College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 28:2784–2795
25. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF (2009) Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 27:1323–1333
26. Wildiers H, Kunkler I, Biganzoli L, Fracheboud J, Vlastos G, Bernard-Marty C, Hurria A, Extermann M, Girre V, Brain E, Audisio RA, Bartelink H, Barton M, Giordano SH, Muss H, Aapro M; International Society of Geriatric Oncology. Management of breast cancer in elderly individuals: recommendations of the International Society of Geriatric Oncology. *Lancet Oncol.* 2007 Dec;8(12):1101-15.
27. Lima LNB, Vollbrecht B, Machado LS, Millen E, Frasson A. Câncer de mama em mulheres idosas. In: Doenças da mama: guia de bolso baseado em evidências. São Paulo, Atheneu, 2013: 379 - 382
28. Veronesi U, Stafyla V, Luimi A, Veronesi P (2012) Breast cancer: from “maximum tolerable” to “minimum effective” treatment. *Front Oncol* 2:125 doi: 10.3389/fonc.2012.00125.
29. Viale G (2013) Specifics of breast cancer diagnosis in everyday practice. *Arkh Patol* 75(4):54-61.
30. Pawelec G. (2012) Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 9(1):15.
31. Pawelec G, Effros RB, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R (1999) T cells and aging. *Front Biosci* 4:216–269
32. <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.html>
33. Sellitto A, Galizia G, De Fanis U, Lieto E, Zamboli A, Orditura M, De Vita F, Giunta R, Lucivero G, Romano C (2011) Behavior of circulating CD4+ CD25+

Foxp3+ regulatory T cells in colon cancer patients undergoing surgery. *J Clin Immunol* 31:1095–1104

34. Decker T, Fischer G, Bucke W, Bucke P, Stotz F, Gruneberger A, Gropp-Meier M, Wiedemann G, Pfeiffer C, Peschel C, Gotze K (2012). Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138 (11): 1945-50 doi: 10.1007/s00432-012-1258-3
35. Wilke CM, Wu K, Zhao E, Wang G, Zou W (2010) Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int J Cancer* 127:748–758
36. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24:5373–5380
37. Baxevanis CN, Voutsas IF, Gritzapis AD, Perez SA, Papamichail M (2010) HER-2/neu as a target for cancer vaccines. *Immunotherapy* 2:213–226
38. Luz Correa B, Ornaghi AP, Cerutti Muller G, Engroff P, Pestana Lopes R, Gomes da Silva Filho I, Bosch JA, Bonorino C, Bauer ME. The Inverted CD4:CD8 Ratio Is Associated with Cytomegalovirus, Poor Cognitive and Functional States in Older Adults. *Neuroimmunomodulation*. 2014 Feb 6;21(4):206-212
39. Poltinnikov IM, Rudoler SB, Tymofyeyev Y, Kennedy J, Anne PR, Curran WJ Jr. Impact of Her-2 Neu overexpression on outcome of elderly women treated with wide local excision and breast irradiation for early stage breast cancer: an exploratory analysis. *Am J Clin Oncol*. 2006 Feb;29(1):71-9.

XI - ANEXOS

ANEXO 1 – Ficha com dados pessoais e demográficos

ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

ANEXO 3 - Carta de aprovação da pesquisa pela Comissão Científica do IGG

ANEXO 4- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS

ANEXO 5- Artigo Publicado

ANEXO 6 – Artigo enviado para Publicação

ANEXO 7 – Comprovante do envio do artigo para a revista *JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY* .

ANEXO 1: Ficha com dados pessoais e demográficos

IDENTIFICAÇÃO: Nome _____

Nº na pesquisa _____ Idade _____ Registro _____

Fone: _____ e-mail _____

TRATAMENTO:

Cirurgia ___ / ___ / ___ Tipo de cirurgia:

Patologia - Tipo histológico _____ Tamanho (cm) _____

Grau _____ Invasão linfovascular _____ RE _____

RP _____ HER 2 _____ Ki67 _____

Linfonodo: BLS () não realizado () negativo () positivo –
EA _____

Quimioterapia () não () sim data de inicio ___ / ___ / ___

Esquema: _____

Radioterapia () não () sim () ELIOT

Hormonioterapia () não () sim data de inicio ___ / ___ / ___

Qual? _____

IMUNOLOGIA:

DATA	CD 4	CD 8	CMV IGG;IGM	E.Barr IGG;IGM

COMORBIDADES / MEDICAÇÃO:

() HAS

/

() DM /

() Cardiopatia isquêmica /

Dislipidemia /

Outras

SEGUIMENTO

DATA	SEM DOENÇA	RECIDIVA LOCAL	METÁSTASE (local)

ÓBITO: __ / __ / __

Motivo: _____

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Titulo da Pesquisa:

PERFIL DE RISCO IMUNOLÓGICO DE IDOSAS COM CÂNCER DE MAMA

Você esta sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre câncer de mama e defesas imunológicas do corpo humano. Nós estamos desenvolvendo esta pesquisa com o objetivo aumentar a eficácia do tratamento do câncer de mama. Nosso objetivo é monitorar as defesas do seu corpo contra o tumor e alguns tipos de vírus (citomegalovírus e vírus Epstein Barr).

O meio que vamos usar para realizar este trabalho será analisar em seu sangue a quantidade de suas células de defesa (células T CD 4+ e CD 8+), bem como analisar suas defesas contra os vírus.

O principal desconforto que você pode ter é a dor na picada da agulha e experimentar um pouco de tonteira pela coleta de sangue. Serão coletados 10 ml de sangue no dia da cirurgia. Após a coleta pode ocorrer um hematoma no local da punção e dor local. Contudo, sua participação será fundamental para podermos talvez desenvolver um tratamento melhor para o câncer de mama.

Para análise da pesquisa, serão coletados dados do seu prontuário médico: data de nascimento, características do tumor da mama, tratamento realizado, outras patologias associadas. Poderá ser necessario uma nova coleta de sangue no seu acompanhamento rotineiro no Centro de Mama da PUCRS se ocorrer algum efeito adverso (retorno do tumor, metástases) em um seguimento de dois anos.

Ressaltamos também que a concordância em participar deste estudo não implica necessariamente em qualquer modificação no tratamento que já está sendo feito para você. Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

Eu,
(paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do tratamento recebido e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. O Dr. Antônio Frasson, a Dra. Cristina

Bonorino e a aluna Betina Vollbrecht certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Se eu tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar o Dr. Antonio Frasson no telefone (51) 3320 3000 ramal 2298 ou Dra. Cristina Bonorino no telefone (51) 3320 3000 ramal 2725. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar a aluna Betina Vollbrecht no telefone (51) 99135578. Além disso, posso fazer contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS pelo telefone (51) 3320 3345.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

_____	_____	_____
Assinatura do Paciente	Nome	Data

_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Nome	Data

Este formulário foi lido para _____

(nome do paciente) em ___/___/_____(data) pelo _____
(nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

_____	_____	_____
Assinatura de testemunha	Nome	Data

ANEXO 3 – Carta de Aprovação da Pesquisa pela Comissão Científica do IGG



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 11 de maio de 2012.

Senhor (a) Pesquisador (a) Betina Vollbrech,

A Comissão Científica do IGG apreciou e aprovou seu protocolo de
"Perfil de risco imunológico de idosas com câncer de mama"

Solicitamos que providencie os documentos necessários para o
encaminhamento do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em
Pesquisa da PUCRS. Salientamos que somente após a aprovação deste
Comitê o projeto deverá ser iniciado.

Atenciosamente,

Profa. Carla Helena Schwanke

Coordenadora da CC/IGG

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL IMUNOLÓGICO DE RISCO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: ANTONIO LUIZ FRASSON

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 05679012.6.0000.5336

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUC/RS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 154.305

Data da Relatoria: 22/11/2012

Apresentação do Projeto:

Este projeto de doutorado pretende avaliar a existência de um perfil imunológico em pacientes com câncer de mama através da dosagem quantitativa de células T CD4 + e CD8 + no sangue periférico de mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama. Envolverá cerca de 100 pacientes no universo de pacientes atendidas no centro de mama do HSL. Os critérios de inclusão e de exclusão estão bem definidos.

Tem como hipótese a confirmação ou não de um perfil imunológico nas pacientes com câncer de mama (relação de células T CD 4/ CD8).

As pacientes farão seguimento de rotina (3/3 meses por dois anos) para detectar eventos adversos: recidiva local do câncer de mama, metástases e óbito.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar o perfil imunológico das mulheres idosas com câncer de mama, determinando a relação das células T CD4+/CD8+ no sangue.

Objetivo Secundário:

-Verificar se existe um perfil imunológico, considerando a relação células T CD4+/CD8+, de maior risco para recidiva local e metástases nas pacientes com neoplasia mamária.

- Comparar a relação das células T CD4+/CD8+ das idosas (mulheres com mais de 60 anos no

momento do diagnóstico) verso as pacientes jovens com câncer de mama.

- Verificar as sorologias para citomegalovírus (CMV) e vírus Epstein Barr (VEB) nas pacientes incluídas no estudo, e a relação destas sorologias com as células T CD4+/CD8+.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para a presente pesquisa somente será colhido sangue de uma veia periférica e preenchidos questionários e realizadas as consultas trimestrais rotineiras no seguimento dessa patologia. Portanto, o risco é mínimo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, executável, com previsão clara de sua efetividade. O número de sujeitos de pesquisa é de 100. O TCLE está claro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A documentação obrigatória está anexada.

Recomendações:

Sob o ponto de vista ético, somos pela aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

pela aprovação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer de acordo com a reunião do colegiado.

PORTO ALEGRE, 26 de Novembro de 2012

Assinador por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)320--3345

Fax: (51)320--3345

E-mail: cep@pucls.br

Perfil de risco imunológico de idosas com câncer de mama: os primeiros 37 casos

Immune risk profile of elderly women with breast cancer: the first 37 cases

Betina Vollbrecht^{1,2}, Felipe Pereira Zerwes^{2,3,4}, Janáina Ferreira Viegas^{2,3}, Thiago Willers^{2,4}, Ana Paula Ornaghi⁵,
Cristina Bonorino⁵, Antonio Luiz Frasson^{1,2,4}

Perfil de risco imunológico de idosas com câncer de mama: os primeiros 37 casos

Profile of immune risk of elderly with breast cancer: the first 37 cases

Betina Vollbrecht ^{1,2}, Cristina Bonorino ³, Felipe Pereira Zerwes ^{2,4,5}, Janaína Ferreira Viegas ^{2,4}, Thiago Willers ^{2,5}, Ana Paula Ornaghi ³, Antonio Luiz Frasson ^{1,2,5}

¹ Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS.

² Centro de Mama, Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS.

³ Faculdade de Biociências e Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS, Porto Alegre, RS.

⁴ Instituto do Câncer do Sistema de Saúde Mãe de Deus, Porto Alegre, RS.

⁵ Faculdade de Medicina da PUCRS, Porto Alegre, RS.

Endereço para correspondência/Corresponding Author:

BETINA VOLLBRECHT

Av. Ipiranga 6690, sala 712

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Fone (51) 33391679

E-mail: betina.v@me.com

RESUMO

OBJETIVOS: Avaliar o perfil imunológico de risco em idosas com câncer de mama e testar se este pode ser um fator preditivo confiável para determinar tipos de tratamento e seguimento oncológico.

MÉTODOS: Foram pesquisadas a relação das células T CD4+/CD8+ e a sorologia para citomegalovírus no sangue periférico de mulheres com 60 anos ou mais de idade no momento do diagnóstico da neoplasia mamária, que realizaram tratamento cirúrgico no Centro de Mama da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo Sistema Único de Saúde. Foram excluídas da pesquisa pacientes com sorologia positiva para HIV, com imunossupressão após transplante de órgãos e as que realizaram quimioterapia neoadjuvante. Os dados foram comparados em grupos conforme o comprometimento axilar, o tamanho tumoral, o perfil imunohistoquímico do tumor e a ocorrência de eventos adversos (recidiva axilar, recidiva local do tumor e/ou metástases). Nos casos de eventos adversos, uma nova dosagem de CD4+ e CD8+ foi realizada.

RESULTADOS: Foram incluídas 37 pacientes, entre as quais 10 pacientes tiveram metástases axilares. As pacientes com axila positiva para metástases apresentaram uma relação CD4+/CD8+ maior que nos casos de axila negativa para metástases ($p=0,04$). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação ao tamanho e perfil imunohistoquímico do tumor. No seguimento médio de 14,3 meses, ocorreram dois eventos adversos (uma recidiva axilar e um caso de metástases ósseas), quando se observou um aumento na relação das células T pesquisadas.

CONCLUSÕES: A relação das células T CD4+/CD8+ parece aumentar nos casos de câncer de mama de pior prognóstico. Tanto quanto foi possível pesquisar na literatura, estes são os primeiros dados sobre células T CD4+ e CD8+ no sangue periférico de mulheres idosas com câncer de mama. Um seguimento maior poderá determinar o valor destas células como fator prognóstico e/ou preditivo.

DESCRITORES: LINFÓCITOS T CD4-POSITIVOS; LINFÓCITOS T CD8-POSITIVOS; RELAÇÃO CD4-CD8; CÂNCER DE MAMA/IMUNOLOGIA; GERIATRIA.

ABSTRACT

AIMS: To evaluate the immune risk profile of elderly women with breast cancer and testing whether this can be a reliable predictor to determine types of treatment and oncologic treatment.

METHODS: Serology for cytomegalovirus (CMV) and the ratio of CD4 + :CD8 + in the peripheral blood of 37 women aged 60 years or older at diagnosis of breast cancer cells were assessed. In this group there are 10 patients with axillary metastases. These data were tabulated and compared in groups according to axillary lymph node status, tumor size, immunohistochemical profile and the occurrence of adverse events (axillary recurrence, local recurrence of the tumor and / or metastases). In cases of adverse events, a new measurement of CD4 + and CD8 + T cells was performed.

RESULTS: The proportion of CD4+ :CD8+ average was 1.72 (1.1-2.32) with CMV serology reagent in 100% of cases . Comparing the groups , the patients with positive axillary metastases had a CD4+: CD8 + ratio greater than in cases of negative for axillary metastases ($p = 0.04$) . No statistically significant difference could be detected on these cells whereas tumor size and immunohistochemical profile of the tumor. At mean follow-up of 14.3 months, two adverse events (one axillary recurrence and one case of bone metastases) occurred when there was an increase in the ratio of T cells research.

CONCLUSIONS: The ratio of CD4+:CD8 + cells appear to increase in cases of breast cancer with the worst prognosis . As far as was possible to search , these are the first data on CD4 + and CD8 + peripheral blood of elderly women with breast cancer cells . A longer follow-up will determine the value of these cells as a prognostic and / or predictive factor.

KEY WORDS: CD4-POSITIVE T-LYMPHOCYTES; CD8-POSITIVE T-LYMPHOCYTES; CD4-CD8 RATIO; BREAST CANCER/IMMUNOLOGY; GERIATRICS.

INTRODUÇÃO

O sistema imune torna-se comprometido com a idade avançada, sendo menos eficaz no combate a neoplasias malignas. Isso resulta em maior índice de tumores malignos na população idosa, além de maior morbidade e mortalidade por causas oncológicas.¹⁻⁴ A função das células T nos idosos está comprovadamente afetada, sendo uma característica do envelhecimento a diminuição no repertório desses linfócitos, com expansão de alguns clones com especificidade restrita. Uma taxa alterada de células T CD8+, aumentada em relação às CD4+ (normalmente mais frequentes no sangue) vem sendo associada com risco imunológico no idoso, e evidências recentes sugerem que as infecções virais por vírus da família do citomegalovírus (CMV), recorrentes ao longo da vida, podem ser determinantes nestas alterações.^{5,6}

Nesse intenso processo de envelhecimento populacional, sabemos que a população idosa é predominantemente feminina. Com o avançar da idade aumentam as chances de determinadas doenças, como as patologias cardíacas, respiratórias e alguns tipos de câncer. Especificamente na população feminina idosa, a neoplasia de maior incidência é o câncer de mama, cuja incidência aumenta proporcionalmente com a idade.¹⁻⁴ A chance de diagnosticarmos um câncer de mama em uma mulher de 30 anos de idade é de um caso em 2212 mulheres; já com 60 anos é de um caso a cada 23 mulheres, e com mais de 80 anos de um caso a cada 8 mulheres.¹ Alterações no sistema imune podem ser responsáveis por este aumento de neoplasia mamária nas mulheres com mais de 60 anos de idade.^{1,5}

O conceito de perfil imunológico de risco tem sido considerado quando há uma relação de células T CD4+/CD8+ menor que 1, associado com sorologia positiva para CMV. A literatura descreve a prevalência de risco imunológico entre 15 - 20% da população em geral.^{5,16-18,21} Tanto quanto foi possível pesquisar, até este momento não há dados na literatura especificamente sobre a taxa CD4/CD8 no sangue periférico de pessoas com neoplasia maligna. Especificamente, não há dados na literatura, até a presente data, sobre a análise da relação de células T CD4+/CD8+ e a sorologia para CMV em mulheres idosas com neoplasia mamária.

Neste estudo propomos analisar o perfil de risco imunológico de mulheres idosas e testar se o mesmo pode ser um fator preditivo confiável para determinar tipos de tratamento e seguimento oncológico. Os resultados obtidos podem fornecer elementos para elaboração de novas políticas de saúde de atenção as idosas com câncer de mama. Assim, o objetivo principal do estudo foi estudar o perfil imunológico das mulheres idosas com câncer de mama, determinando a relação das células T CD4+/CD8+ e a sorologia para CMV. Como objetivos secundários, este estudo investigou a associação entre o perfil imunológico, o comprometimento linfonodal, o tamanho tumoral e o perfil imunohistoquímico. Avaliando se existe um perfil imunológico de maior risco para recidiva local e metástases, o estudo procurou determinar se a dosagem de células T CD4+ e CD8+ pode ser um fator preditivo e/ou prognóstico para neoplasia maligna de mama.

MÉTODOS

Este foi um estudo piloto, que incluiu mulheres com diagnóstico de câncer de mama que realizaram tratamento cirúrgico no Centro de Mama (CEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) pelo Sistema Único de Saúde (SUS) com 60 anos ou mais de idade no momento do diagnóstico. Foram excluídas da pesquisa pacientes com sorologia positiva para HIV, com imunossupressão após transplante de órgãos e as que realizaram quimioterapia neoadjuvante.

A pesquisa foi iniciada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (parecer substanciado de número 154.305). As pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, através do qual receberam o conhecimento dos objetivos do estudo, riscos e seguimento. As pacientes que concordaram em participar do estudo realizam o seguimento de rotina no CEMA PUCRS para detectar eventos adversos: recidiva local do câncer de mama, recidivas axilares, metástases e óbito.

Foram coletadas amostras de 10 ml de sangue venoso no pré-operatório. O sangue foi processado para isolamento de células mononucleares e isolamento de plasma no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da PUCRS. Todas as pacientes tiveram suas células marcadas com anticorpos CD4+ / CD8+ e sorologia para CMV. Nos casos

que apresentaram recidiva local, axilar e lesões metastáticas foram coletadas novas amostras de sangue.

Os dados foram tabulados e analisados através de computador utilizando o programa Microsoft Office Excel e o programa Epi Info. Para as variáveis quantitativas de distribuição normal foram calculados média, desvio padrão (DP), valor mínimo e máximo. Os dados qualitativos foram sumariados através de frequência em cada classe e porcentagem. Os testes estatísticos utilizados foram o teste “t” de Student para amostras pareadas e independentes e variáveis quantitativas; teste não paramétrico de Mann Whitney para variáveis quantitativas que não satisfizeram as exigências do teste “t”; teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para amostras independentes; teste do qui-quadrado, para variáveis categóricas; teste “Exato de Fisher”, para categóricas dicotômicas que não satisfizeram as exigências do qui-quadrado. Foram considerados significativos valores p menores que 0,05.

RESULTADOS

Conforme os critérios de inclusão foram selecionadas a participar da pesquisa 37 mulheres, com idade média de 64 anos, mediana de 67 anos (intervalo interquartil de 62 e 83 anos) no momento do diagnóstico do câncer de mama. O tratamento cirúrgico da mama foi uma ressecção segmentar em 19 (51,4%) pacientes, mastectomia em 15 (40,5%) e adenomastectomia em 3 (8,1%) pacientes. A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) foi realizada em 36 pacientes, das quais em 9 (25%) o linfonodo sentinela foi positivo para metástases, sendo que uma paciente foi submetida diretamente ao esvaziamento axilar completo por apresentar uma axila clinicamente positiva no momento da cirurgia (**Tabela 1**). O esvaziamento axilar completo foi realizado em 6 (16,7%) pacientes. As 3 (8,3%) pacientes com linfonodo sentinela positivo e que não realizaram esvaziamento axilar apresentavam critérios de tratamento axilar conforme o estudo ACOSOG Z0011.²³ O tamanho tumoral médio foi de 2,24 (0,2-8,5) cm, sendo em 16 (43,2%) casos foi menor que 2 cm. Os diagnósticos anatomopatológicos estão descritos na **Tabela 1**.

O perfil imunohistoquímico do tumor foi classificado conforme os receptores hormonais (RH), a expressão do oncogene Her-2/neu e do Ki67. A Tabela 2 descreve as frequências de cada perfil e a correspondência dos mesmos com a relação CD4+/CD8+ (**Tabela 2**).

Como tratamento adjuvante, todas as pacientes que realizaram cirurgia conservadora de mama e adenomastectomia receberam radioterapia; das pacientes mastectomizadas (n = 15), a radioterapia complementar foi realizada em 8 casos. Todas as mulheres com RH positivos (n=28; 75%) receberam hormonioterapia, todas Her-2/neu positivo (n=9; 24,3%) recebera trastuzumab. E a quimioterapia adjuvante foi aplicada em 23 (62,1%) pacientes.

No seguimento médio de 14 meses ocorreu uma (2,7%) recidiva axilar e uma (2,7%) paciente foi diagnosticada com metástases ósseas. Não ocorreram recidivas locais.

A relação dos linfócitos T CD4+ / CD8+ média foi de 1,72 (mínimo 1,1- máximo 2,32). Todas as pacientes (100%) apresentaram IgG reagente para CMV.

A comparação das médias da relação CD4+ / CD8+ conforme a positividade para metástases, o tamanho do tumor e o perfil imunohistoquímico do tumor está descrita na **Tabela 2**.

Ocorreram dois eventos adversos no decorrer do estudo. A paciente com recidiva axilar apresentava a relação de células T CD4+/CD8+ de 1,2 no momento do diagnóstico e 1,7 na recidiva axilar e sorologia positiva para CMV. Essa paciente tinha idade de 61 anos, recidivou em 14 meses, foi tratada com esvaziamento axilar radical e está viva sem evidência de doença há 6 meses. A paciente diagnosticada com metástases ósseas tinha 68 anos, apresentou no momento do diagnóstico do tumor mamário a relação CD4+/CD8+ de 1,9 e quando evidenciado as metástases ósseas esta relação foi de 2,2. No tempo de seguimento médio de 14,3 meses deste estudo, todas as pacientes incluídas estavam vivas e sem outros eventos adversos.

DISCUSSÃO

O grupo de pacientes incluídas neste estudo, por serem mulheres idosas, apresentam características tumorais de bom prognóstico. O tipo histológico mais comum foi o carcinoma ductal invasor (CDI), RH positivo e Her-2/neu negativo; exatamente como esperado nesta faixa etária.^{1,26,27} Para este grupo apresentar eventos adversos como recidiva local, recidivas axilares e/ou metástases é necessário um seguimento longo. O seguimento, até a conclusão do presente estudo, foi curto (média de 14 meses), o que pode influir na baixa ocorrência de eventos adversos. Assim, o objetivo de verificar se o perfil imunológico das pacientes pode ser usado como fator

preditivo e/ou prognóstico em câncer de mama ficou prejudicado pelo curto espaço de tempo observado.

Merece destaque neste grupo de pacientes o tamanho tumoral. Na maioria das pacientes, o tumor apresentou tamanho maior que 2 cm. Isto reflete um diagnóstico de lesões mais avançadas, uma falha nos programas de rastreamento. Infelizmente, verifica-se falha no diagnóstico precoce de câncer de mama no sistema de saúde pública do Brasil. Por serem pacientes idosas, o crescimento tumoral costuma ser lento, logo parece haver realmente um retardo no diagnóstico clínico e/ou por exame de imagem.

A relação dos linfócitos T CD4+/CD8+ mínima foi de 1,1 portanto, nenhuma paciente apresentou por conceito perfil imunológico de risco (relação CD4+/CD8+ menor que 1).^{15,21,28}

Em todos os grupos comparados nesta pesquisa, a relação CD4+/CD8+ foi maior nas pacientes com pior prognóstico: tamanho tumoral maior que 2cm, axila positiva, tumores Her-2/neu positivo. A diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos axila negativa e positiva para metástases ($p = 0,04$). Inclusive nos dois eventos adversos, esta relação aumentou no momento do diagnóstico da recidiva axilar, a no diagnóstico da metástase óssea. Estes dados parecem demonstrar um aumento da atividade do sistema imunológico nas pacientes de pior prognóstico. Tanto quanto foi possível pesquisar, até este momento não há dados na literatura especificamente sobre a taxa CD4+/CD8+ no sangue periférico de mulheres com diagnóstico de câncer de mama. Assim, não conseguimos comparar nossos dados com outras pesquisas.

Existem estudos sobre as células T-reg no sangue periférico de pacientes com diversas neoplasias malignas. Em uma pesquisa conduzida por Decker et al.,³⁰ foi analisado o número de células T-reg no sangue periférico de 292 pacientes recentemente diagnosticadas com câncer da mama. Os números de T-reg no sangue periférico de pacientes Her-2/neu positivo foram mais elevados do que em amostras de pacientes com RH positivos e Her-2/neu negativo.³⁰ Os mecanismos que levam à expansão das células T-regs em pacientes com Her-2/neu positivo não foi definido na literatura até este momento. No entanto, alguns estudos já demonstraram que as células de câncer de mama Her-2/neu positivo são especialmente capazes de estimular respostas imunológicas.²⁸⁻³⁰

Em conclusão, neste estudo piloto sobre o perfil imunológico de pacientes idosas com câncer de mama, houve um aumento na relação CD4+/CD8+ nas pacientes com axila positiva para metástases. Para determinar se a relação destas células pode ser

usada como um fator preditivo e/ou prognóstico para câncer de mama, estamos recrutando mais pacientes e realizando um seguimento mais longo. Por ser um trabalho pioneiro na literatura, acreditamos ser importante a publicação destes dados iniciais com o objetivo de estimular outros centros de mastologia e imunologia a pesquisarem também células T CD4+ e CD8+ associado com carcinoma de mama.

REFERÊNCIAS

- 1 Crivellari D, Aopro M, Leonard R, et al. Breast Cancer in the Eldery. Jour Clin Oncology 2007; 25 (14): 1882 – 90.
- 2 Kaufmann M, Morrow M, Mickwitz G, et al. Locoregional Treatment of Primary Breast Cancer. Cancer 2010; 0: 1-8.
- 3 Hansen D, Viegas J, Vollbrecht B, et al. Câncer de Mama em Mulheres Idosas. Atualizações em Geriatria e Gerontologia II: Abordagens Multidisciplinares e Interdisciplinares. Porto Alegre: EdiPUCRS 2009; p. 47-63.
- 4 Abdo C. Estudo Populacional do Envelhecimento no Brasil. São Paulo: Segmento Farma; 2009
- 5 Saltzman RL, Peterson PK. Immunodeficiency of the elderly. Rev Infect Dis 1987;9(6):1127-39.
- 6 Schwanke CHA, Gomes I, Pedro REL, et al. Atualizações em Geriatria e Gerontologia II: Abordagens Multidisciplinares e Interdisciplinares. Porto Alegre: EdiPUCRS; 2009.
- 7 HayFlick, L. Como e por que envelhecemos. Rio de Janeiro: Campos; 1997
- 8 Bynoe MS, Bonorino P, Viret C. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+ suppressor T cells: peripheral versus in situ immunoregulation. J Neuroimmunol 2007;191(1-2):61-9.

- 9 Paula C, Motta A, Schmitz C, Nunes CP, Souza AP, Bonorino C. Alterations in dendritic cell function in aged mice: potential implications for immunotherapy design. *Biogerontology* 2009;10(1):13-25.
- 10 Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 2002;169(4):1984-92.
- 11 Callahan JE, Kappler JW, Marrack P. Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. *J Immunol* 1993;151(12):6657-69.
- 12 Clambey ET, van Dyk LF, Kappler JW, Marrack P. Non-malignant clonal expansions of CD8+ memory T cells in aged individuals. *Immunol Rev* 2005;205:170-89.
- 13 Clambey ET, Kappler JW, Marrack P. CD8 T cell clonal expansions & aging: a heterogeneous phenomenon with a common outcome. *Exp Gerontol* 2007;42(5):407-11.
- 14 Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 2004;200(7):825-34.
- 15 Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Solana R, Grubeck-Loebenstien B, Wikby A. Human immunosenescence: is it infectious? *Immunol Rev* 2005;205:257-68.
- 16 Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, et al. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* 2003;102(5):1779-87.
- 17 Koch SD, Kempf J, Pawelec G. T Cell Immunity and Aging. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005;2005(48):pe37.

- 18 Fulop T, Larbi A, Wikby A, Mocchegiani E, Hirokawa K, Pawelec G. Dysregulation of T-cell function in the elderly: scientific basis and clinical implications. *Drugs Aging* 2005;22(7):589-603.
- 19 Ouyang Q, Wagner WM, Wikby A, Walter S, Aubert G, Dodi AI, et al. Large numbers of dysfunctional CD8+ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old. *J Clin Immunol* 2003;23(4):247-57.
- 20 Derhovanessian E, Theeten H, Hahnel K, Van Damme P, Cools N, Pawelec G. Cytomegalovirus associated accumulation of late differentiated CD4 T cells correlates with poor humoral response to influenza vaccinations. *Vaccine* 2013 (31): 685 - 90.
- 21 Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 2002;7:d1056-183.
- 22 Barrilas DU, Salazar HAV, Rangel DG, Cabrero IA, Aguirella P, Delagno AG, et al. Is human cytomegalovirus associated with breast cancer progression? *Infections Agents and Cancer* 2013 (8): 1-5.
- 23 Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD, Whitworth PW, Blumencranz PW, et al. Axillary Dissections vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastases - a randomized clinical trial. *JAMA* 2011; 305 (6): 569 - 75.
- 24 Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 2009, 27:1323–1333
- 25 Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/ College Of American Pathologists guideline

- recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010, 28:2784–2795
- 26 Wildiers H, Kunkler I, Biganzoli L, Fracheboud J, Vlastos G, Bernard-Marty C, Hurria A, Extermann M, Girre V, Brain E, Audisio RA, Bartelink H, Barton M, Giordano SH, Muss H, Aapro M; International Society of Geriatric Oncology. Management of breast cancer in elderly individuals: recommendations of the International Society of Geriatric Oncology. *Lancet Oncol.* 2007; 8(12):1101-15.
- 27 Lima LNB, Vollbrecht B, Machado LS, Millen E, Frasson A. Câncer de mama em mulheres idosas. In: Doenças da mama: guia de bolso baseado em evidências. Frasson A. São Paulo, Atheneu, 2013: 379 - 382
- 28 Pawelec G. Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 2012, 9(1): 15.
- 29 Sellitto A, Galizia G, De Fanis U, Lieto E, Zamboli A, Orditura M, De Vita F, Giunta R, Lucivero G, Romano C. Behavior of circulating CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in colon cancer patients undergoing surgery. *J Clin Immunol* 2012, 31:1095–1104
- 30 Decker T, Fischer G, Bucke W, Bucke P, Stotz F, Gruneberger A, Gropp-Meier M, Wiedemann G, Pfeiffer C, Peschel C, Gotze K. Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138 (11): 1945-50

Tabela 1. Tratamento cirúrgico e características clínico-patológicas do câncer de mama em 37 pacientes idosas.

Características	n (%)
Tratamento cirúrgico da mama	
Ressecção segmentar	19 (51,4)
Mastectomia	15 (40,5)
Adenomastectomia	3 (8,1)
Metástases axilares	
Ausente	27 (73,0)
Presente	10 (27,0)
Diagnóstico anatomopatológico	
Carcinoma ductal invasor	32 (86,5)
Carcinoma lobular invasor	3 (8,1)
Carcinoma medular	1 (2,7)
Carcinoma tubular	1 (2,7)

Tabela 2 . Média da relação de células T CD4+/CD8+ em 37 pacientes idosas com câncer de mama, conforme presença ou ausência de metástases axilares, tamanho tumoral e perfil imunohistoquímico do tumor.

Características do tumor	n	Relação CD4+/CD8+	p*
Presença de metástases axilares			
Axila negativa para metástases	27	1,58	0,04*
Axila positiva para metástases	10	1,98	
Tamanho do tumor			
Tumor <2cm	16	1,60	0,26*
Tumor >2cm	21	1,79	
Perfil imunohistoquímico do tumor			
Luminal A	14	1,51	0,22*
Luminal B	10	1,71	
Her-2/neu positivo	9	1,89	
Triplo negativo	4	1,62	

* teste T de Student

ANEXO 6 – Artigo enviado para publicação na revista J Cancer Res Clin Oncol

**Increased number of CD4+:CD8+ ratio in the peripheral blood of
elderly patients with invasive ductal carcinoma
and Her-2/neu-positive breast cancer**

Betina Vollbrecht ^{1,2} *, Cristina Bonorino ³, Felipe Pereira Zerwes ², Janaína Ferreira Viegas ², Thiago Willers ^{2,3}, Ana Paula Ornaghi ³, Antonio Luiz Frasson ^{1,2}

¹ Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

² Centro de Mama, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

³ Faculdade de Biociências e Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

* Centro de Mama PUCRS, Avenida Ipiranda 6690, sala 714, CEP 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

e-mail address: betina.v@me.com

Telephone 55 51 99135578

Fax numbers 55 51 33392709

Abstract

Background

The elderly population is now the fastest growing in the world. The incidence and prevalence of most cancers increase with age. Although progress has been made in establishing prognostic factors in breast cancer, there remains an urgent need for better prognostic and predictive scores for older women with breast cancer. The important role of the immune system in controlling cancer progression is widely accepted. The frequencies of CD4:CD8 T cells have been reported in old people and in a variety of malignancies. However, little is known about the role these cells in the peripheral blood in the elderly population with breast cancer.

Methods

We analyzed CD4:CD8 ratio in the peripheral blood of 43 older women with newly diagnosed breast cancer by flow cytometry prior to planned breast surgery in a developing country.

Results

The ratio of lymphocytes T CD4:CD8 average was 1.72 (1.1 to 3.32). No difference could be detected in these cells ratio between nodal negative and nodal positive, well and poorly differentiated or small and locally advanced cancers. However, numbers of lymphocytes T CD4:CD8 were higher in patients with invasive ductal carcinomas as compared to invasive lobular cancers. In addition, CD4:CD8 ratio of human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2/neu) positive patients were higher than in samples from patients with hormone receptor positive, Her-2/neu-negative cancers.

Conclusions

As far as was possible search, these are the first data on CD4 and CD8 T cells in the elderly population with breast cancer. Increased numbers of circulating lymphocytes T CD4:CD8 was evidenced in older women with invasive ductal carcinoma and in cases of Her-2/neu positive. Therefore, there appears to be an activation of the immune system in tumors of poor prognosis.

Keywords: lymphocytes T CD4:CD8; breast cancer; prognostic, older women.

Introduction

In this intense process of population aging, we know that the elderly population is predominantly female. With advancing age increases the likelihood of certain diseases such as heart diseases, respiratory and some cancers. Specifically in the elderly female population increased incidence of breast cancer. There is very little information about breast cancer characteristics, treatment choices, prognostic and predictive parameter among elderly patients (Inal et al. 2014). Although many patients are cured by combined modality treatment including surgery, irradiation, adjuvant chemotherapy, anti-hormonal treatment and targeted approaches, relapses occur in a fraction of patients (Benson et al. 2009).

In breast cancer, the shift from “maximum tolerable” to “minimum effective” treatment has been evident since the 1970s (Veronesi et al 2012). Today, prognosis can be estimated on the basis of biologic characteristics of tumor cells, including expression of hormone receptor (HR) or human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2/neu) and gene array signature (Goldhirsch et al. 2013; Sotiriou and Pusztai 2009; Balduzzi et al 2013), but modern adjuvant or neoadjuvant treatment frequently results in over treatment in a large proportion of elderly patients (Katz SJ 2013).

Cells from the immune system constitute an important part of the microenvironment and are thought to be critical for cancer development and progression. These cells largely consist of tumor associated macrophages, NK cells, regulatory T cells (T-regs), CD8 cytotoxic T cells and CD4 helper T cells (Decker et al 2012; Grivennikov et al. 2010). As a group, the elderly had a significantly lower CD4:CD8 ratio compared to the young (Pawelec, 1999). There is no data in the literature to date on the analysis of the relationship of CD4:CD8 T cells specifically in older women with breast cancer. Therefore, we speculated that the ratio of lymphocytes T CD4:CD8 in the peripheral blood compartment may play an important role in the development of metastatic breast cancer and might serve as a prognostic or even predictive tool in the elderly.

In our present study, we analyzed the numbers of CD4 helper T cells and CD8 cytotoxic T cells in the peripheral blood of a cohort of patients with breast cancer and correlated CD4:CD8 ratio with biologic and clinic pathological features of the different tumors, and the follow-up.

Materials and methods

Between December 2012 and January 2014, patients with breast cancer and more than 60 years old admitted to the mastology departments of the hospital (*Centro de Mama do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil*) were asked to participate in our study. The exclusion criteria were patients diagnosed with HIV and who underwent neoadjuvant chemotherapy.

Written informed consent in accordance was obtained from all patients according to a protocol approved by the local Ethics Committee. After informed consent, 10 ml of heparinized blood was obtained from patients with a histologically proven (core biopsy) diagnosis of breast cancer before surgery. Blood samples were processed for isolation of mononuclear cells and isolation of plasma in the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology (*Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil*). All patients had their cells labeled with CD4+ and CD8+.

Patients who agreed to participate in the study underwent routine follow-up in the mastology center (3 - 3 months for two years) to detect adverse events: local recurrence of breast cancer, metastases and death.

Statistical methods

The collected data will be tabulated and analyzed by computer using the Microsoft Office Excel and Epi Info program. Data are presented as mean \pm CI (confidence interval). T tests were performed as indicated using Graph Pad prism 5.0. A p value of 0.05 was considered to be statistically significant. When more than two groups of data sets were compared, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed as described.

Results and discussion

Patient demographics and disease characteristics are shown in Table 1. Were selected to participate in the study 43 women. The mean age at diagnosis was 69 years (range 60 – 87). Most tumors were stage T1 or T2 and nodal negative.

Tumors were regarded to be hormone receptor (HR) positive if at least 1 % of nuclei stained positive in estrogen receptor (ER) or progesterone receptor (PgR) (Hammond et al. 2010). Tumors were classified to be human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2/neu) positive if immunohistochemistry was 3 or 2 and FISH was positive according to ASCO guidelines (Sauter et al. 2009).

To avoid a potential influence of major surgical procedures (Sellitto et al. 2011) as well as of adjuvant treatment, blood was drawn after core biopsy but before definitive surgery. CD4:CD8 ratio ranged from 1,1 to 3,32 (median 1,72). Flow cytometry was performed in a single laboratory (*Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, Porto Alegre, Brazil*) at the day the blood sample was obtained.

CD4:CD8 ratio of patients with small (T1) or locally advanced (T2-4), with well (G1) or poorly differentiated tumors (G2, G3) and tumors without, with limited (1-3) or extensive (3 or more) lymph node involvement were calculated. The results (mean \pm CI) are depicted in Table 2. Numbers of CD4:CD8 T cells between these groups were not statistically different.

Numbers of circulating lymphocytes T CD4:CD8 were higher in patients with invasive ductal carcinoma as compared to patients with invasive lobular carcinomas ($p = 0,046$) (Figure 1). Patients with medullary breast cancer also had very low numbers CD4:CD8 T cells (1,2 and 1,3 / $n = 2$). Interestingly, patients with both of these histological subtypes might have a better prognosis than patients with invasive ductal carcinoma (Sinn HP 2013; Viale G 2013). Thus, in our study seems to be an association between histological worse subtypes and stimulation of the immune system (increasing CD4:CD8 ratio).

In addition, CD4:CD8 ratio was significantly higher in samples from patients with Her-2/neu-positive tumors as compared to samples from patients with HR-positive/Her-

2/neu-negative disease. CD4:CD8 ratio was not increased in samples from patients with HR-negative/Her2/neu negative tumors (triple negative cells) ($p= 0,036$) (Figure 2). The Her-2/neu oncogene is one of the most relevant prognostic and predictive factors for breast cancer patients. Her-2/neu overexpression, which occurs in 20 % of all breast cancers, has been associated with a poor prognosis (Viale 2013, Natoli 2013). Therefore, in our group of patients there was a statistically significant association between increased CD4:CD8 ratio and tumors with a poor prognosis (Her-2/neu positive).

There is no data available in the literature specifically on CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood of elderly women with breast cancer. The mechanisms driving CD4+ and CD8+ T cells to expansion in patients with cancer HER 2 positive are not been defined in the literature up to this moment. However, some studies have already shown that Her-2/neu-positive breast cancer cells are especially able to stimulate immunologic responses (Baxevanis et al. 2010). This might contribute to the increased pool of CD4+ and CD8+ T cells in the peripheral blood of elderly patients with Her-2/neu positive tumors. In a search conducted by Decker et al, analyzed T-reg numbers in the peripheral blood of 292 patients with newly diagnosed early breast cancer, the T-reg numbers of Her-2/neu-positive patients were higher than in samples from patients with HR positive, Her-2/neu-negative cancers.

The immune system is a unique mechanism of defense against cancers, however there is evidence that the immune system of the aged is eroded, a phenomenon termed immunosenescence. Each arm of the immune system, innate and adaptive, is altered with aging, contributing to increased carcinogenesis (Fulop 2013, Grivennikov 2010). Traditionally, cross-sectional studies in industrialized countries have almost unanimously documented lower numbers of peripheral blood naïve CD8+ T cells in the elderly, whereas age effects on CD4+ T cells have been harder to pin down. Reciprocally, memory CD8+ T cells are more numerous in the elderly, again with lesser and more discordant effects reported for CD4 + T cells (Gruver 2007).

Most studies attempting to assess immunosenescence have focused on a single population, mostly “WEIRD” (ie Western, educated, industrialized, rich, democratic). These are not necessarily representative of the majority off the world’s populaion. There will not only be differences in genetics, but also in societal and psychological factors, nutritional status and access to health care (Pawelec G 2012). Our study was conducted

in southern Brazil, exclusively with patients attending the public health system. First try to characterize the relationship of CD4+ and CD8+ T cells in an elderly population with breast cancer.

Median follow-up was 17.3 months (range 1 - 24 months). During follow-up, 1 (2,3%) patient had local relapse, 1 (2,3%) had axillary recurrence, 1 (2,3%) had distant metastases and no deaths. CD4:CD8 ratio comparing the time of diagnosis to the time of the adverse event are shown in Table 3. There were no statistically significant differences. This is a pilot study with relatively few individuals and small group size. Is important the follow-up of this population over time and correlated CD4:CD8 ratio with the adverse event. From a clinical perspective, metastasis is the most critical aspect of tumor progression. Once metastatic cells enter the circulation, they need to survive in suspension or in a new microenvironment. The immune system in the peripheral blood might well support cancer cells during this crucial process (Grivennikov 2010).

In conclusion, taken together, our data represent a first database on CD4 helper T cells and CD8 cytotoxic T cells in breast cancer older patients. Our study shows a statistically significant relationship between increased CD4: CD8 ratio in tumors of poor prognosis: invasive ductal carcinoma and Her-2/neu positive. Therefore, we speculated that is a relationship between activation of the immune system in elderly patients with the worst prognosis. Longer follow-up of this prospective study will show whether CD4:CD8 ratio is a prognostic or predictive factor in patients with breast cancer.

Conflict of interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

Balduzzi A, Bagnardi V, Rotmensz N, Dellapasqua S, Montagna E, Cardillo A, Viale G, Veronesi P, Intra M, Luini A, Pruneri G, Mastropasqua G, Goldhirsch A, Colleoni M (2013) Survival Outcomes in Breast Cancer Patients With Low Estrogen/Progesterone Receptor Expression. *Clin Breast Cancer* - doi: 10.1016/j.clbc.2013.10.019

Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24:5373–5380

Baxevas CN, Voutsas IF, Gritzapis AD, Perez SA, Papamichail M (2010) HER-2/neu as a target for cancer vaccines. *Immunotherapy* 2:213–226

Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC (2009) Early breast cancer. *Lancet* 373:1463–1479

Beyer M, Schultze JL (2006) Regulatory T cells in cancer. *Blood* 108:804–811

Decker T, Fischer G, Bucke W, Bucke P, Stotz F, Gruneberger A, Gropp-Meier M, Wiedemann G, Pfeiffer C, Peschel C, Gotze K (2012). Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138 (11): 1945-50 doi: 10.1007/s00432-012-1258-3

Fulop T, Larbi A, Kotb R, Pawelec G (2013) Immunology of Aging and Cancer Development. *Cancer and Aging* 38: 38–48.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 24(9): 2206-23 doi: 10.1093/annonc/mdt303

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883–899

Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD (2007) Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 211:144–156.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC (2010) American Society of Clinical Oncology/ College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 28:2784–2795

Inal A, Akman T, Yaman S, Ozturk SC, Geredeli C, Bilici M, Inanc M, Harputoglu H, Demirci U, Balakan O, Cinkir HY, Alici S, Colak D, Sonmez OU, Goksel G, Dogu GG, Engin H, Unal OU, Tamoğlu T, Buyukberber S, Boruban CM, Isikdogan A (2014) Pathologic and clinical characteristics of elderly patients with breast cancer: a retrospective analysis of a multicenter study (anatolian society of medical oncology). *Int Surg* 99(1):2-7.

Katz SJ, Morrow M. (2013) Addressing overtreatment in breast cancer: The doctors' dilemma. *Cancer* 119(20):3584-8.

Natoli C, Vici P, Sperduti I, Grassadonia A, Bisagni G, Tinari N, Michelotti A, Zampa G, Gori S, Moscetti L, De Tursi M, Panebianco M, Mauri M, Ferrarini I, Pizzuti L, Ficorella C, Samaritani R, Mentuccia L, Iacobelli S, Gamucci T (2013) Effectiveness of neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy in HER2-overexpressing breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139(7):1229-40. doi: 10.1007/s00432-013-1436-y

Pawelec G. (2012) Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 9(1):15.

Pawelec G, Effros RB, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R (1999) T cells and aging. *Front Biosci* 4:216–269

Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF (2009) Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 27:1323–1333

Sellitto A, Galizia G, De Fanis U, Lieto E, Zamboli A, Orditura M, De Vita F, Giunta R, Lucivero G, Romano C (2011) Behavior of circulating CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in colon cancer patients undergoing surgery. *J Clin Immunol* 31:1095–1104

Sinn HP, Kreipe H (2013) A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care* 8(2):149-154.

Sotiriou C, Pusztai L (2009) Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 360:790–800

Veronesi U, Stafyla V, Luimi A, Veronesi P (2012) Breast cancer: from “maximum tolerable” to “minimum effective” treatment. *Front Oncol* 2:125 doi: 10.3389/fonc.2012.00125.

Viale G (2013) Specifics of breast cancer diagnosis in everyday practice. *Arkh Patol* 75(4):54-61.

TABLE 1: Patient characteristics

	No of patients	%
Tumor size		
T1	15	34,8
T2	16	37,2
T3	7	16,3
T4	5	11,7
Grading		
G1	16	37,2
G2	17	39,5
G3	10	23,3
Lymph nodes		
Negative	29	67,4
Positive 1 – 3	9	21
Positive > ou = 4	5	11,6
ER/PgR status		
Negative	7	16,3
Positive	36	83,7
Her2/neu status		
Negative	28	65,2
Positive	15	34,8
Histology		
Invasive ductal	29	67,4
Invasive lobular	8	18,6
Other	6	14

TABLE 2: CD4:CD8 ratio (mean – CI) of patients with: **(A)** small (T1) versus large tumors (T2–T4), **(B)** well differentiated (G1, G2) versus poorly differentiated (G3) and **(C)** node negative patients versus patients with limited or extensive lymph node metastasis. Groups were compared using T tests (**A, B**) and ANOVA (**C**).

Groups (n= 43)	CD4:CD8 ratio	P
A		
T1 (n = 15)	1,7 (1,3 – 3,1)	<i>0,41</i>
T2 – T4 (n = 28)	1,5 (1,1 – 2,9)	
B		
G1/G2 (n = 33)	1,6 (1,2 – 3,1)	<i>0,56</i>
G3 (n = 10)	1,9 (1,4 – 2,1)	
C		
Lymph nodes negative (n = 29)	1,5 (1,1 – 3,3)	<i>0,31</i>
Positive 1 – 3 (n= 9)	1,6 (1,5 – 1,9)	
Positive > ou = 4 (n = 5)	1,8 (1,6 – 2,8)	

TABLE 3: CD4:CD8 ratio comparing the time of diagnoses to the time of the adverse event.

Adverse Event	CD4:CD8 ratio at the diagnoses	CD4:CD8 ratio at adverse event
Local relapse	1,5	1,7
Axillary recurrence	2,2	2,6
Distant metástases	1,6	1,7

FIGURE 1: CD4:CD8 ratio of patients with invasive ductal carcinoma versus invasive lobular carcinoma (T test were performed to test for statistical significant differences) ($p = 0,046$) (T test)

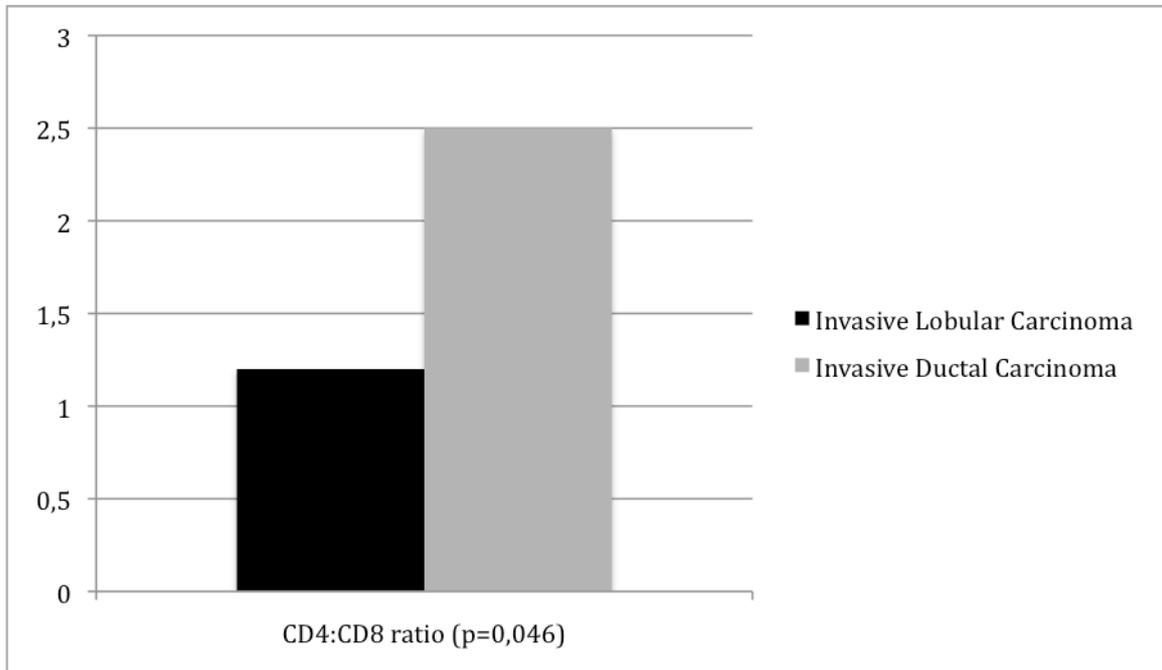
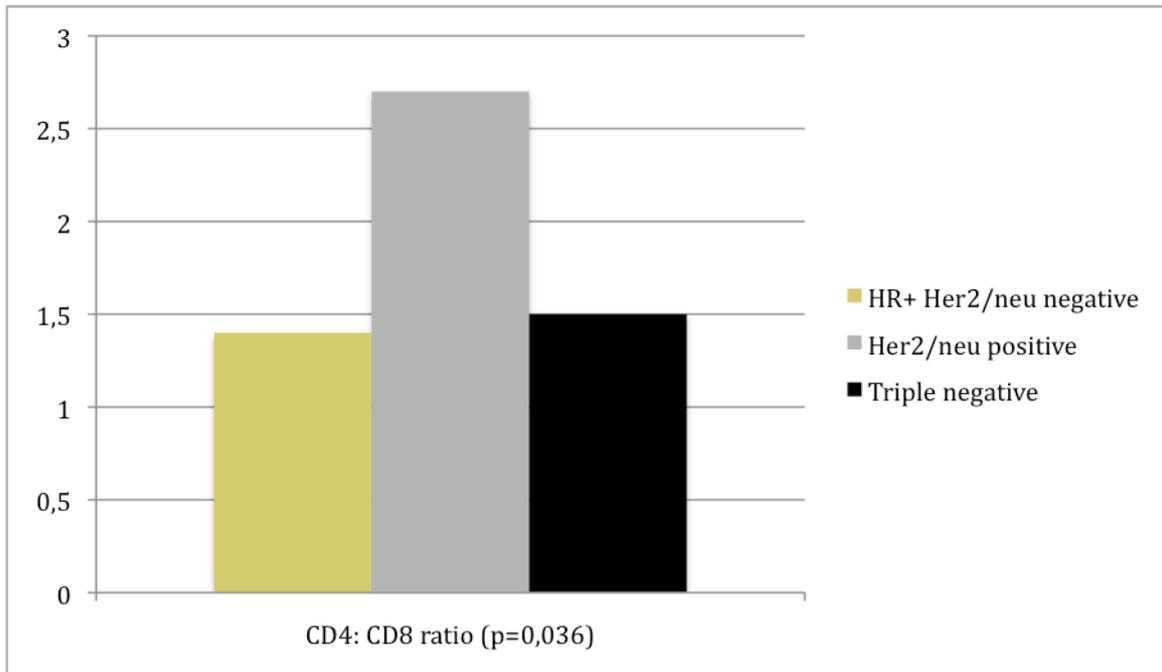


FIGURE 2: CD4: CD8 ratio of patients with hormone receptor positive (HR+) HER-2/neu negative, Her-2/neu positive and triple negative tumors (p = 0,036)(ANOVA)



ANEXO 7 – Comprovante do envio do artigo para a revista *JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY* (J Cancer Res Clin Oncol)

De: JOCR Editorial Office <em@editorialmanager.com>
Assunto: Submission Confirmation
Data: 1 de fevereiro de 2015 21:24:45 BRST
Para: BETINA VOLLBRECHT <betina.v@me.com>
Responder A: JOCR Editorial Office <santhi.natraj@springer.com>

Dear MRS BETINA VOLLBRECHT,
Thank you for submitting your manuscript,
"Increased number of CD4:CD8 ratio in the peripheral blood of elderly patients
with invasive ductal carcinoma and Her-2/neu-positive breast
cancer", to Journal o
Cancer Research and Clinical Oncology
During the review process, you can keep track of the status of your manuscript
by accessing the following web site:

<http://jocr.edmgr.com/>

Springer offers authors the option of making their articles available with open access via our Open Choice programme. We advise you to familiarise yourself with the details of Springer Open Choice in advance, to be able to decide quickly should your paper be accepted for publication. Further information can be found at www.springer.com/openchoice.

With kind regards,
Editorial Office
JOCR

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.