

NÍVEIS SÉRICOS DE IL-10, sPD1 E sPDL1 NO SANGUE DE
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO
ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

SERUM LEVELS OF IL-10, sPD1 AND sPDL1 IN BLOOD OF WOMEN
WITH LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER BEFORE AND
AFTER NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

Marina Santaliz de Godoy Moreno^{1,3}; Marcelo Ramos Tejo Salgado, MD⁴; Marina Cadena da Matta, PhD^{1,2}; Leticia Telles Sales^{1,3}; Gabriela Delgado Soriano^{1,3}; Kleber das Neves Jatahy^{1,2}, Leuridan Cavalcante Torres, PhD^{1,2,4}

¹ Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

² Translational Research Laboratory Prof CA Hart do IMIP

³ Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS)

⁴ Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP)

Reconhecimento de apoio ao estudo: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)

Autor correspondente: Marina Santaliz de Godoy Moreno

Telefone pessoal: (81) 99524-5000

E-mail: marinasantaliz@hotmail.com

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse no desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os níveis séricos de IL-10, sPD1 e sPDL1 nas pacientes com câncer de mama localmente avançado antes e após quimioterapia neoadjuvante. **Métodos:** Entre 2017 e 2018, foi realizada uma coorte prospectiva em pacientes com câncer de mama atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco. Foram avaliadas 21 pacientes (51,5 anos \pm 6,30) com diagnóstico de câncer de mama localmente avançado antes e após tratamento quimioterápico neoadjuvante (QT Neo). De acordo com o subtipo tumoral, havia 10 pacientes Triplo Negativo (TN) e 11 HER2+. Como grupo controle, 20 voluntárias saudáveis (44,7 anos \pm 11,05) da comunidade e sem história familiar de câncer de mama. No programa Graphpad V 7.0, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para análise dos valores de medianas entre os grupos e o teste de Wilcoxon para análise pareada antes e após tratamento. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. A concentração sérica de IL-10, sPD1 e sPDL1 foi determinada por ensaio imunoenzimático. **Resultados:** Foram observados níveis séricos elevados de IL-10 nas pacientes com câncer dos subtipos HER2+ e TN quando comparadas aos controles ($p=0,001$ e $p=0,01$, respectivamente). Não houve diferença significativa dos níveis dessa citocina entre os subtipos tumorais. Nas análises de sPD1, verificou-se níveis reduzidos da molécula nas pacientes com câncer de mama subtipos HER2+ e TN quando comparadas ao grupo controle ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente). Não foi encontrada diferença significativa entre os subtipos do câncer. Na análise pareada dos níveis de IL-10 antes e após a quimioterapia neoadjuvante, verificou-se expressão mais elevada na fase pré-QT Neo ($p=0,005$). Entretanto, ao comparar os níveis de PD-1 e PD-L1 solúvel das pacientes com câncer de mama antes e após QT-Neo, foi observado que não houve diferença significativa entre eles. **Conclusão:** O estudo da expressão de IL-10 e sPD1 se mostra igualmente importante para avaliar seu papel no processo de desenvolvimento tumoral, assim como o das possibilidades clínicas e terapêuticas decorrentes dos achados.

Palavras-chave: Câncer de mama, PD1, PDL1, IL-10, Imunidade.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the serum levels of IL-10, sPD1 and sPDL1 in patients with breast cancer. **Methods:** A prospective cohort study was performed between 2017 and 2018 in patients with breast cancer treated at the Cancer Hospital of Pernambuco Cancer Hospital of Pernambuco. Twenty-one patients (51.5 years \pm 6.30) with diagnosis of locally advanced breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy treatment (QT Neo) were evaluated. The patients were divided according to the tumor subtype: 10 patients with triple negative (TN) and 11 with HER2 +. As a control group, 20 healthy volunteers (44.7 years \pm 11.05) from the community and no family history of breast cancer. The Kruskal-Wallis test was used to analyze the median values between the groups. For paired analysis comparing the samples before and after treatment, the Wilcoxon test was used. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The analyzes were performed in the Graphpad V7.0 program. The serum concentration of IL10, sPD1 and sPDL1 was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Elevated serum IL-10 levels were observed in patients with BC HER2 + and Triple Negative subtypes compared to controls ($p = 0.001$ and $p = 0.01$, respectively). There was no significant difference in the levels of this cytokine between breast cancer subtypes. In the analyzes of sPD-1, there were reduced levels of these molecules in patients with breast cancer HER2 + and TN when compared to control group ($p = 0.02$ and $p = 0.01$, respectively). No significant difference was found between HER2 + and TN subtypes. In the paired analysis of IL-10 levels before and after neoadjuvant chemotherapy, there was a significant difference ($p = 0.005$), the expression of IL-10 was higher in the pre-QT Neo phase when compared to post-QT Neo. However, when comparing the soluble levels of PD-1 and PD-L1 in breast cancer patients before and after QT Neo, no significant difference between them. **Conclusion:** The study of the expression of IL-10 and sPD1 is equally important to evaluate its role in the process of tumor development, as well as the clinical and therapeutic possibilities resulting from this finding.

Keywords: Breast cancer; PD1; PDL1; IL-10; Immunity.

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Mama (CM) permanece como a segunda neoplasia maligna mais comum entre mulheres no mundo¹. A mortalidade por CM tem diminuído nos EUA desde 1970, em parte devido melhoras no rastreamento e tratamento adjuvante². Em contraste, mudanças no padrão reprodutivo, aumento da obesidade e diminuição da atividade física têm contribuído para aumento da incidência de CM em países em desenvolvimento³.

O câncer de mama pode ser classificado de acordo com o padrão de imunohistoquímica baseado na expressão dos receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), expressão de *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER-2) e índice de proliferação celular Ki67. Portanto, com base na imunohistoquímica, os quatro subtipos de câncer de mama são: I) Luminal A: considerado o subtipo mais comum, possui baixo grau histológico, crescimento lento e um bom prognóstico⁴; II) Luminal B: compreende de 15% a 20% dos tumores de mama, possui fenótipo agressivo e pior prognóstico quando comparado ao Luminal A⁴; III e IV) HER2+ e Triplo Negativo: considerados os de pior prognóstico, ambos correspondendo cerca de 20% do câncer de mama⁵. Detalhes na Tabela 1.

A maioria dos pacientes com tumor de mama localmente avançado pode receber quimioterapia neoadjuvante. O objetivo é induzir uma resposta antitumoral antes da cirurgia e possibilitar a cirurgia conservadora, permitindo uma avaliação precoce da efetividade do tratamento sistêmico⁶. Além desses objetivos clínicos, a quimioterapia neoadjuvante traz oportunidades de pesquisas através da coleta de material sanguíneo e tumoral antes e após o tratamento, possibilitando a identificação de biomarcadores de resposta, específicos da paciente.

Nos últimos anos, o escape imunológico tem sido visto como fator de pior prognóstico para neoplasias. Quando a imunovigilância não realiza por completo a remoção das células após transformação maligna, ocorre uma “pressão seletiva” imposta pelas células imunes, ou seja, a formação de clones das células sobreviventes, capazes de conter/neutralizar respostas anticancerígenas. Ao superar o controle imunológico, ocorre a proliferação e expansão⁷. Uma das estratégias utilizadas pelas células neoplásicas consiste em aumentar a produção de citocinas imunorreguladoras, como a interleucina 10 (IL-10), gerando, entre outros efeitos, a inibição da resposta imune. Para vários tipos de câncer, os níveis séricos elevados de IL-10 têm sido associados a um pior prognóstico⁹.

Durante a ativação da resposta imune celular frente aos antígenos tumorais, as células dendríticas residentes no tecido migram para os linfonodos que drenam a região e apresentam os antígenos para células T, promovendo ativação dos linfócitos TCD4+. No processo de reconhecimento antigênico, as células TCD8+, chamadas de linfócitos T citotóxicos (CTL), são ativadas e capazes de promover a lise de células tumorais¹⁰.

Nesse contexto, outro mecanismo de escape é a expressão de ligantes que regulam negativamente a proliferação e atividade funcional dos linfócitos T citotóxicos. A molécula PD-1 expressa na superfície de células imunes efetoras (células T, B, NK, monócitos e dendríticas) é um membro da família dos receptores CD28 e, mediada pela interação com os ligantes PD-L1 e PD-L2, atenua as respostas imunes. Especialmente a interação PD-1/PD-L1 leva a diminuição da produção de citocinas, indução à anergia dos linfócitos T e apoptose celular¹¹. Em condições normais, a via desempenha um papel importante na manutenção da tolerância periférica, entretanto, a expressão de PD-L1 por células tumorais parece ser um dos principais meios para o escape imunológico¹².

A taxa de expressão de PD-L1 na superfície de células tumorais está associada a progressão do tumor e pior prognóstico¹³, como também a presença de células T PD1+ no infiltrado tumoral¹⁴. Nos tumores sólidos da mama, o aumento da expressão de PDL1 na superfície das células tumorais tem se mostrado associado a grande tamanho, alto grau, alto índice de proliferação e aos subtipos TN e HER-2+ (inversamente correlacionados a sobrevida no câncer de mama)¹².

As moléculas PD-1 e PDL1, assim como outros co-receptores de inibição, podem ser encontrados em duas formas: como receptores expressos na superfície das células e na forma de proteínas solúveis (sPD1 e sPDL1), produzidas através da clivagem dessas moléculas na superfície celular. As formas solúveis têm um importante papel na regulação dos sinais coinibidores. Estudos têm demonstrado que sPD1 promove a resposta de células T, através do bloqueio da via PD-1/PD-L1, não permitindo interação com o ligante da célula tumoral¹⁵. O estudo em questão avaliou os níveis séricos de IL-10, sPD1 e sPDL1 nas pacientes com câncer de mama localmente avançado com subtipos HER2+ e triplo negativo antes e após quimioterapia neoadjuvante.

2 MÉTODOS

Entre 2017 a 2018, foi realizado um estudo de coorte prospectivo em pacientes com câncer de mama atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco. Foram avaliadas 21 pacientes (51,5 anos \pm 6,30) com diagnóstico de câncer de mama localmente avançado antes e após tratamento quimioterápico neoadjuvante (QT Neo). As pacientes foram distribuídas em dois grupos, de acordo com o subtipo tumoral: 10 pacientes com triplo negativo (TN) e 11 com HER2+. A maioria das pacientes apresentava tumor em estágio IIB e III. Foram critérios de exclusão: diagnóstico prévio de câncer, metástase à distância diagnosticada por método de imagem, gestantes e lactentes, portadoras de comorbidades que contraindicassem o uso de quimioterapia, usuárias de medicamentos imunossupressores, história clínica de HIV e HTLV, portadoras ou história familiar de doença autoimune e sinais clínicos de infecção. Como grupo controle, foram incluídas 20 voluntárias saudáveis (44,7 anos \pm 11,05) da comunidade e sem história familiar de câncer de mama.

A coleta de dados clínicos foi realizada durante a anamnese por médico oncologista e nas consultas realizadas durante o tratamento quimioterápico. Foram realizadas duas coletas de amostra de sangue periférico antes do tratamento e após quimioterapia neoadjuvante, sendo antes do tratamento cirúrgico. A análise do sangue periférico, coletado no dia de admissão, foi realizada no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP.

Este estudo faz parte do projeto âncora “Investigação dos efeitos da quimioterapia neoadjuvante na resposta imune celular nos tumores de mama HER2+ e triplo-negativo localmente avançado”, cuja pesquisadora responsável é a Profa. Leuridan Cavalcante Torres. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres

Humanos do IMIP e Hospital de Câncer de Pernambuco sob os números CAAE 39967014.3.3002.5201 e CAAE39967014.3.0000.5205, respectivamente.

2.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A concentração de sPD1 (PD1 solúvel) e sPDL1 (PDL1 solúvel) foi determinada em amostras de soro, sendo realizada a dosagem por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando Human PD-1 DuoSet ELISA e Human PD-L1/B7-H1 DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), respectivamente, de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração da IL-10 foi determinada nas amostras de sobrenadante de cultura celular, utilizando o kit de ELISA Human IL-10 Sets (BD Bioscience). As concentrações foram expressas em pg/mL.

2.2 Análises Estatísticas

O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a distribuição das amostras. Para análise dos valores de medianas entre os grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. Para análise pareada comparando as amostras antes e após tratamento, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa Graphpad V 7.0.

3 RESULTADOS

3.1 Análises dos níveis de IL-10, sPD1 e sPDL1 dos pacientes e controles

Foram observados níveis séricos elevados de IL-10 nas pacientes com câncer dos subtipos HER2+ e Triplo Negativo quando comparado aos controles ($p=0,001$ e $p=0,01$, respectivamente). Não houve diferença significativa dos níveis dessa citocina entre os subtipos de câncer de mama (Figura 1A).

Nas análises de sPD1, verificou-se reduzidos níveis dessas moléculas nas pacientes com câncer de mama subtipos HER2+ e TN quando comparado ao grupo controle ($p=0,02$ e $p=0,01$, respectivamente). Não foi encontrada diferença significativa entre os subtipos HER2+ e TN (Figura 1B). Ao realizar as análises dos níveis de PD-L1 solúvel (sPDL1), não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 1C).

3.2 Análises pareadas dos níveis de IL-10, sPD1 e sPDL1 das pacientes com câncer de mama antes e após quimioterapia neoadjuvante (QT Neo)

Na análise pareada dos níveis de IL-10 antes e após à quimioterapia neoadjuvante, verificou-se uma diferença significativa ($p=0,005$; Figura 2A). A expressão de IL10 foi mais elevada no pré-QT Neo quando comparada ao pós-QT Neo. Entretanto, ao comparar os níveis de PD-1 e PD-L1 solúvel das pacientes com câncer de mama antes e após quimioterapia neoadjuvante, foi observado que não houve diferença significativa entre eles (Figura 2B e 2C).

4 DISCUSSÃO

Nesse estudo, ao comparar os níveis basais de IL-10 entre as pacientes com câncer dos subtipos HER 2+ e Triplo Negativo e controle, foi observado um aumento na expressão dessa citocina nas pacientes quando comparada aos controles. Esses resultados sugerem que pacientes com câncer de mama localmente avançado apresentem um aumento dos níveis séricos de IL-10 devido ao processo inflamatório crônico nessa fase da doença, onde possivelmente ocorra a exaustão da resposta imune frente à contínua exposição aos antígenos tumorais.

Na análise pareada da expressão de IL-10 em pacientes com câncer de mama antes e após quimioterapia neoadjuvante, observou-se uma redução considerável dos níveis da citocina após o tratamento. Ao contrário das células normais, as células neoplásicas secretam grandes quantidades de IL-10, bem como proteínas angiogênicas, promovendo o escape imunológico e mantendo um microambiente favorável à progressão e proliferação do tumor⁸. Isso sugere que a quimioterapia pode modular a resposta imune, ativando-a, com aumento de linfócitos T efetores ativados, cujos principais mecanismos de resposta inflamatória sejam de linfócitos T do tipo Th1, causa da redução dos níveis séricos de IL-10.

A presença de células T PD-1+ no infiltrado tumoral tem sido associada a progressão tumoral e mau prognóstico¹⁴. Entretanto, ao avaliar as moléculas PD1 solúveis, resultantes da clivagem dessas moléculas da membrana celular, foi observado uma redução no plasma de sPD1 nas pacientes. Isso sugere que as moléculas de sPD1 levariam a um aumento da ativação de linfócitos por ser antagonista das interações PD1-PDL1, ocupando a fenda do ligante e, com isso, bloqueando as interações celulares entre os linfócitos através da expressão de PD1 na superfície dos linfócitos T e de PDL1 nas células tumorais¹⁵.

Quanto aos níveis de PD-L1 solúvel, não foram observadas alterações nos níveis dessas moléculas nas pacientes. A literatura não é clara sobre qual seria o envolvimento do ligante na resposta antitumoral. Alguns trabalhos mostram um valor prognóstico e preditivo paradoxal do PD-L1^{15, 16}. François Bertucci et al (2016) relataram que níveis séricos elevados de PD-L1 foram associados ao pior prognóstico no câncer de mama. Por outro lado, a expressão elevada de PD-L1 na superfície celular entre os subtipos de pior prognóstico no câncer de mama esteve associada a melhor sobrevida livre de progressão e resposta patológica completa.

Ao comparar os níveis de PD-1 e PD-L1 solúvel das pacientes antes e após serem submetidas à terapia neoadjuvante, não houve diferença significativa entre os grupos. Portanto, sugere-se que quimioterapia neoadjuvante não parece exercer efeitos na produção de PD-1 e PDL-1 solúveis.

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados encontrados, conclui-se que o estudo sobre a expressão de IL-10 como marcador preditivo no câncer de mama deve ser ampliado. O estudo da expressão de IL-10 e sPD1 se mostra igualmente importante para avaliar seu papel no processo de desenvolvimento tumoral, assim como o das possibilidades clínicas e terapêuticas decorrentes desse achado. É necessária a visualização de novos alvos para tratamentos de tumores de mama, uma vez que o tratamento quimioterápico ainda é desafiador, levando em consideração a prevalência de comorbidades, baixa tolerância a esquemas tóxicos e, por vezes, de baixa eficácia e alto custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality World wide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- 2- Kohler BA, Sherman RL, Howlander N, Jemal A, Ryerson AB et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Mar 30;107(6):djv048. doi: 10.1093/jnci/djv048.
- 3- Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
- 4- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006; 295(21):2492.
- 5- Andreo poulou E, Schweber SJ, Sparano JA, McDaid HM. Therapies for triple negative breast cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2015 May; 16(7):983-98.
- 6- Gralow JR, Burstein HJ, Wood W, Hortobagyi GN, Gianni L, et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 10;26(5):814-9.
- 7- Burkholder B, Huang R, Burgess R. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. Elsevier B.V. 2014;
- 8- Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature America Inc,* 1999;

- 9-** Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L, et al. TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Feb;106(2):djt36.
- 10-** Burkholder B, Huangb R, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, et al. Tumorinduced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2014; 1845: 182–201
- 11-** Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *AnnuRevImmunol.* 2008;26:677-704
- 12-** European Society For Medical Oncology. *ESMO Handbook of Translational Research.* 2. ed. Switzerland: ESMO Press, p. 92-102, 2015.
- 13-** French JD, Kotnis GR, Said S, et al. Programmed death-1+ T cells and regulatory T cells are enriched in tumor-involved lymphnodes and associated with aggressive features in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E934-E943.
- 14-** Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:2443-54.
- 15-** Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D, Mamessier E. The PD1/PDL1 axis, a promising therapeutic target in aggressive breast cancers. *Oncoimmunology.* 2015 Aug31;5(3):e1085148. eCollection 2016.
- 16-** Tsang J, Aul W, Lo K, et al. PD-L1 expression and tumor infiltrating PD-1+ lymphocytes associated with outcome in HER2+ breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;10.1007/s10549-016-4095-2.

TABELAS

Tabela 1

Critérios de classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama de acordo com perfil de imunohistoquímica¹¹

Subtipo	RE	RP	HER2	Ki 67
Luminal A	+	+	-	< 14%
Luminal B	+	+	+ /-	>14%
HER2	-	-	+	Variável
Triplo negativo	-	-	-	Variável

FIGURAS

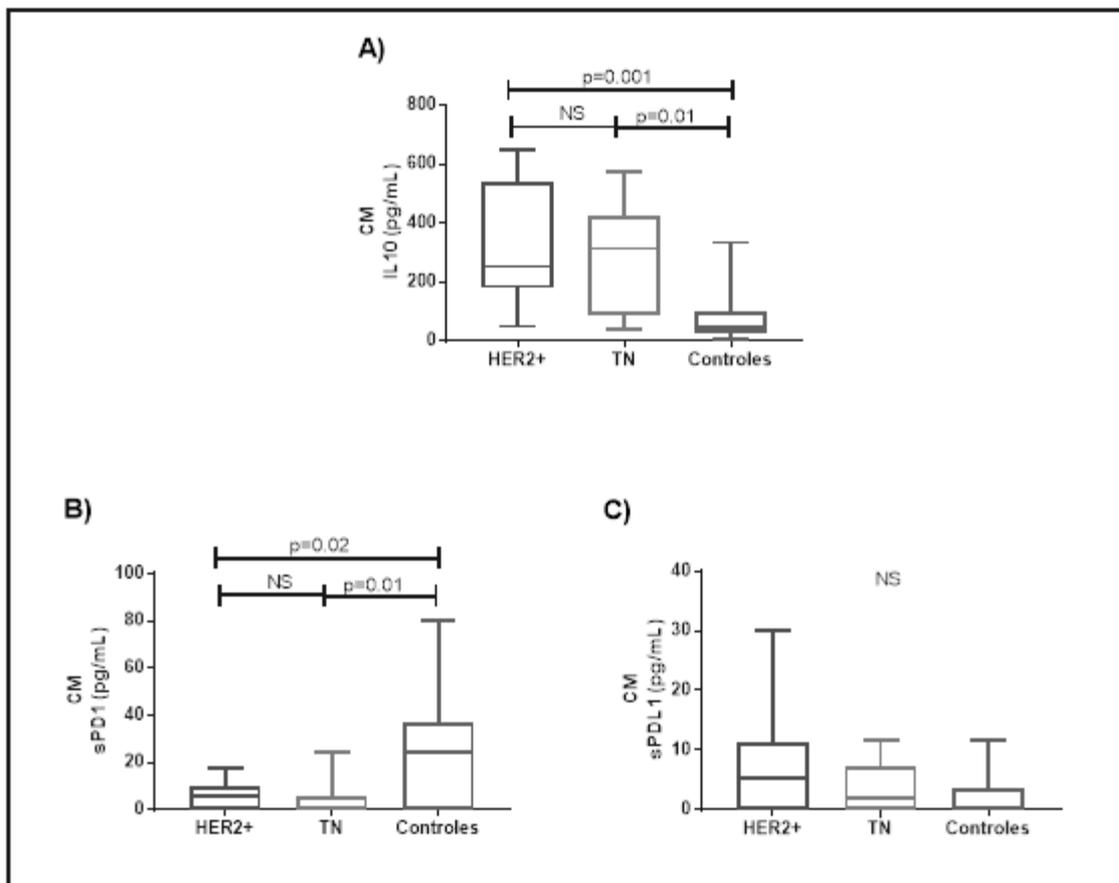


Figura 1: Análises dos níveis séricos de IL10, sPD1 e sPDL1 no sangue periférico de pacientes com câncer de mama subtipos HER2+ (n=11) e triplo negativo (TN; n=10) antes do tratamento. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil 25-75. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para análise dos valores de mediana entre os três grupos. Foi considerado significativo $P < 0.05$. NS: não significativo.

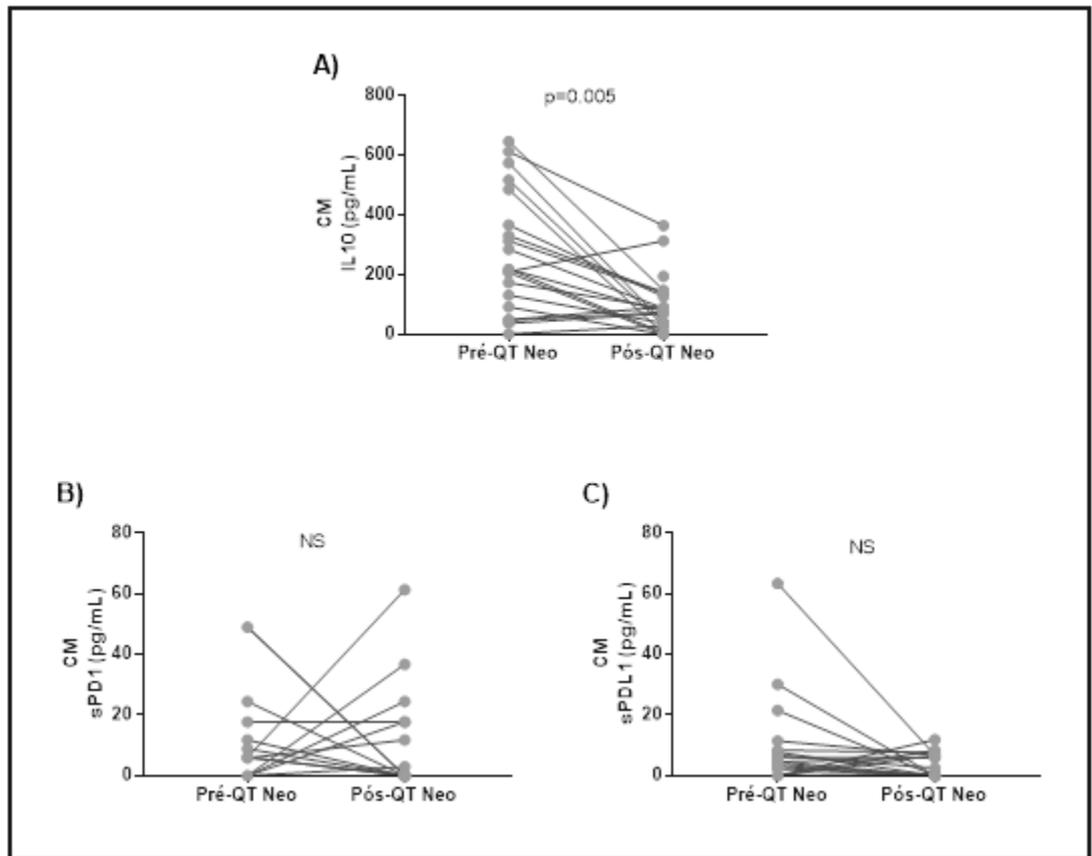


Figura 2: Análise pareada dos níveis séricos de IL10, sPD1 e sPDL1 antes da quimioterapia neoadjuvante (pré-QT Neo) e após a QT Neo (Pós-QT Neo) das pacientes com câncer de mama subtipos HER2+ (n=11) e triplo negativo (n=10). Foi realizado o teste de Wilcoxon. Foi considerado significativo $P < 0.05$. NS: não significativo. CM: câncer de mama.