



M

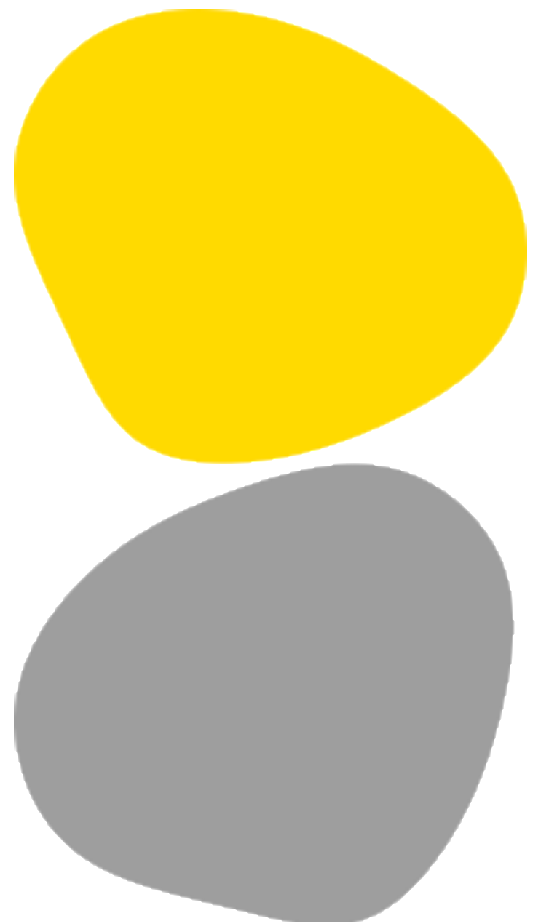
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA

A importância das razões neutrófilo–linfócito, linfócito–monócito e plaqueta–linfócito na resposta ao tratamento do cancro da mama triplo negativo

Mariana Simões Pereira

09/2025





A importância das razões neutrófilo–linfócito, linfócito–monócito e plaqueta–linfócito na resposta ao tratamento do cancro da mama triplo negativo

Autor

Mariana Simões Pereira

Orientadores

Professora Doutora Diana Martins, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico de
Coimbra

Professor Doutor Fernando Mendes, Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico de
Coimbra

Professora Doutora Regina Silva, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia** – Ramo de **Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*



Agradecimentos

Em primeiro lugar agradecer aos meus orientadores, Professora Doutora Diana Martins, Professor Doutor Fernando Mendes e Professora Doutora Regina Silva, pelo apoio, ajuda e disponibilidade.

Aos meus pais e irmã, por todo o apoio e força incondicional nos momentos difíceis.

Agradecer ao meu companheiro de vida Miguel, pela presença, paciência e incentivos diários.

À minha prima Ana, companheira neste desafio, pela força, amizade e presença durante todo este percurso, por não me deixar desistir, nem duvidar, obrigada.

À minha filha Madalena, que foi crescendo, dentro e fora da minha barriga, dando-me a força e resiliência que não sabia ter.



Resumo

O carcinoma da mama triplo-negativo (CMTN) caracteriza-se pela ausência de expressão de recetores de estrogénio e progesterona, ausência de sobre expressão de *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER2) e pior prognóstico. Nos últimos anos, diversos marcadores hematológicos inflamatórios, como o rácio neutrófilo-linfócito (NLR), o rácio plaqueta-linfócito (PLR) e o rácio linfócito-monócito (LMR), têm sido investigados como potenciais biomarcadores prognósticos, dada a sua simplicidade, baixo custo e associação com a resposta imunitária tumoral. Este estudo retrospectivo avaliou a relação entre NLR, PLR e LMR e as características clínico-patológicas e a resposta ao tratamento em doentes com CMTN, em diferentes momentos de seguimento (pré-tratamento, 6, 12 e 24 meses).

Verificou-se que valores elevados de NLR ($\geq 2,6$) associaram-se, no pré-tratamento, a maior tamanho tumoral, estádios avançados e presença de metástases, mantendo relação com invasão ganglionar aos 24 meses. O LMR baixo ($< 3,4$) correlacionou-se no pré-tratamento com estágio avançado e metástases, surgindo uma tendência para valores mais elevados nos respondedores aos 24 meses. O PLR não apresentou associações significativas em nenhum momento.

Conclui-se que NLR e LMR demonstraram maior relevância prognóstica, refletindo a interação entre inflamação sistémica e progressão tumoral, enquanto o PLR mostrou utilidade limitada. Estudos prospetivos com maior amostra são necessários para validar estes achados.

Palavras-chave: Terapêutica; Inflamação; TNM; Metástase; Biomarcador.



Abstract

Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of estrogen and progesterone receptors, lack of Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2) overexpression, and overall poorer prognosis. In recent years, several inflammatory hematological markers, such as the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), and lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR), have been investigated as potential prognostic biomarkers, given their simplicity, low cost, and link with the tumor immune response. This retrospective study evaluated the association between NLR, PLR, and LMR with clinicopathological characteristics and treatment response in TNBC patients at different time points (baseline, 6, 12, and 24 months).

Elevated NLR values (≥ 2.6) were associated at baseline with larger tumor size, advanced stage, and the presence of metastases, and remained related to lymph node invasion at 24 months. Low LMR (< 3.4) correlated at baseline with advanced stage and metastases, and a trend toward higher values was observed in responders at 24 months. PLR showed no significant associations at any time point.

In conclusion, NLR and LMR demonstrated stronger prognostic relevance, reflecting the interplay between systemic inflammation and tumor progression, while PLR showed limited utility. Prospective studies with larger cohorts are required to validate these findings.

Keywords: Therapy; Inflammation; TNM; Metastasis; Biomarker.



Índice

1.	Introdução.....	1
1.1.	Epidemiologia.....	1
1.2.	Classificação do cancro da mama	1
1.3.	Cancro da Mama Triplo Negativo.....	3
1.3.1	Diagnóstico e Tratamento do TNBC.....	4
1.4.	Inflamação e Cancro.....	6
1.4.1	O papel da inflamação e sistema imunitário na carcinogénese	6
1.4.2	Células inflamatórias e mediadores do microambiente tumoral.....	8
1.5.	Objetivos	12
1.5.1	Objetivos Específicos.....	12
2.	Métodos.....	13
2.1.	Amostras.....	13
2.2.	Crítérios de Inclusão e Exclusão.....	14
2.3.	Comissão de Ética.....	14
2.4.	Análise de dados.....	15
3.	Resultados.....	16
3.1.	Caracterização da amostra	16
3.2.	Razão Neutrófilo-Linfócito	18
3.3.	Razão Linfócito-Monócito.....	19
3.4.	Razão Plaqueta-Linfócito.....	20
3.5.	Sobrevida.....	21
3.5.1.	NLR e Sobrevida.....	21
3.5.2.	LMR e Sobrevida.....	22
3.5.1.	PLR e Sobrevida	23
3.6.	Associação entre os ratios NLR, LMR e PLR com a resposta à terapêutica.....	24
4.	Discussão.....	26
5.	Conclusão.....	29
	Referências Bibliográficas.....	30



Índice de Abreviaturas

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
ASCO	<i>American Society for Clinical Oncology</i>
BLIS	Subtipo molecular basal imunossuprimido
BRCA 1	<i>Breast cancer 1 (gene)</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2 (gene)</i>
CC	Cirurgia conservadora
CD163	<i>Cluster of differentiation 163</i>
CD204	<i>Cluster of differentiation 204</i>
CD206	<i>Cluster of differentiation 206</i>
CD4+	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD40L	<i>CD40 ligand</i>
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
CD8+	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico/deoxyribonucleic acid</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Statistics</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
ICI	Inibidores de checkpoint imunológico
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IM	Subtipo molecular imunomodulador



IPOC	Instituto Português de Oncologia de Coimbra
ki67	Marcador de proliferação celular
LAR	Subtipo molecular luminal com expressão de recetor de androgénio
LMR	<i>Lymphocyte-monocyte ratio</i>
MES	Subtipo molecular mesenquimal
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NA	Neoadjuvante
NK	<i>Natural killer</i>
NLR	<i>Neutrophil-lymphocyte ratio</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PDL-1	<i>Programmed death D-ligand 1</i>
PLR	<i>Platelet-lymphocyte ratio</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSGL1	<i>P-selectin glycoprotein Ligand-1</i>
QT	Quimioterapia
RA	Recetor de androgénio
RE	Recetor de estrogénio
RM	Ressonância magnética
ROC	<i>Receiver operating characteristics</i>
RP	Recetor de progesterona
RT	Radioterapia
SG	Sobrevida global
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TAMs	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	Células T auxiliares do tipo 1
Th2	Células T auxiliares do tipo 2
TILs	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>



TNF- α	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNM	<i>Tumor-nodule-metastasis</i>
ULSBM	Unidade Local de Saúde do Baixo Mondego
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>



1. Introdução

1.1. Epidemiologia

O cancro da mama é a neoplasia maligna mais frequente nas mulheres (1), na vasta maioria dos países, assim como a sua principal causa de morte por cancro na mulher (2). De acordo com os dados mais recentes da *Global Cancer Statistics* (GLOBOCAN), o cancro da mama lidera no que respeita à incidência global estimada, ocupando o quarto lugar no que diz respeito à mortalidade (3). Relativamente aos dados de 2022, foram diagnosticados 2 308 897 novos caso de cancro da mama em mulheres (11,6% dos casos de cancro mundial) e 665 684 mulheres morreram em todo o mundo com esta patologia (3). Ainda assim, em Portugal, foram diagnosticados, em 2022, cerca de 8 954 novos casos de cancro da mama e 2 211 mulheres morreram com esta patologia (3,4).

As estimativas epidemiológicas para as próximas décadas indicam um aumento substancial na incidência global de cancro, apontando para um acréscimo de 24,6% até 2030 e de 49,7% até 2040. Nas últimas décadas, a introdução de estratégias de prevenção e avanços terapêuticos contribuíram para uma redução da mortalidade em cancro da mama, em diversas regiões, particularmente na Europa Ocidental. Especificamente no que se refere ao cancro de mama, prevê-se um crescimento de 17,9% na incidência até 2030 e de 33,8% até 2040, o que se justifica não só pela deteção precoce associada ao rastreio populacional, como também pelo aumento da esperança média de vida. Paralelamente a essa tendência, estima-se que, até 2040, o número de novos casos ultrapasse os três milhões por ano e as mortes associadas excedam um milhão (3).

1.2. Classificação do cancro da mama

O carcinoma da mama compreende um grupo de neoplasias epiteliais malignas muito heterogéneo do ponto de vista clínico, morfológico e molecular. Neste sentido, é importante a sua divisão em vários subtipos que possam refletir esta heterogeneidade.

A classificação do cancro da mama é realizada através do exame anatomopatológico, de acordo com o tipo e grau histológico e o estágio TNM (5). O tipo histológico, segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), refere-se ao tipo de células que compõem o tumor (5), sendo o carcinoma invasivo sem outra especificação (40 a 75%) e o carcinoma lobular invasivo (5 a 15%) os tipos histológicos mais frequentes (5).



Tumores menos frequentes como o carcinoma mucinoso puro, o carcinoma tubular, o carcinoma cribriforme e o carcinoma adenoide cístico estão associados a um melhor prognóstico, enquanto o carcinoma metaplásico está associado a um pior prognóstico (5). O grau histológico é conseguido através de uma contagem baseada na soma dos valores de três características histológicas: formação de ductos, pleomorfismo nuclear e número de mitoses. Desta forma, os cancros invasivos podem ser classificados como grau 1 ou bem diferenciado, grau 2 ou moderadamente diferenciado e grau 3 ou pouco diferenciado (6). O grau histológico apresenta um valor prognóstico e preditivo relativamente à resposta à terapêutica, uma vez que tumores com graus histológicos mais elevados tendem a ter um prognóstico menos favorável (5).

O sistema TNM, que permite o estadiamento do cancro da mama, tem em consideração o tamanho do tumor (T), a invasão locorregional de gânglios linfáticos (N), assim como a presença de metástases à distância (M) (7). Os fatores prognósticos do carcinoma da mama incluem ainda a expressão dos recetores hormonais, como o recetor de estrogénio (RE) e progesterona (RP), a sobre-expressão do recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) assim como o marcador de proliferação celular Ki67 (8).

Os avanços recentes nas tecnologias moleculares permitiram a classificação destes carcinomas da mama em quatro subtipos distintos, com base no seu perfil molecular intrínseco, fornecendo informações tanto preditivas como prognósticas. O carcinoma da mama pode ser caracterizado por diferentes subtipos moleculares de acordo com a expressão destes recetores hormonais e do HER2, sendo eles os luminais A e B, o HER2 positivo e o triplo negativo (9,10).

Os luminais representam cerca de 70% dos casos de cancro da mama. Os do subtipo Luminal A caracterizam-se pela expressão de RE e/ou RP e ausência de HER2. Estes apresentam uma baixa expressão de genes relacionados com a proliferação celular e, por isso, são considerados, clinicamente, de baixo grau, de crescimento lento e tendem a ter melhor prognóstico. Em contraste, os do subtipo Luminal B são considerados de grau superior, apresentando um pior prognóstico. Caracterizam-se pela expressão de RE, podendo ser negativos para RP e/ou positivos para HER2. Apresentam ainda uma elevada expressão de genes relacionados com a proliferação celular (8,11).

Os cancros da mama com sobre-expressão de HER2 representam 10-15% dos cancros da mama. São caracterizados pela elevada expressão de HER2 e ausência de RE e RP, expressam ainda genes e proteínas relacionadas com a proliferação celular. Este subtipo molecular é conhecido por ter um crescimento mais rápido que os luminais e, até à introdução das terapias dirigidas para HER2, era considerado o de pior prognóstico (8,12).



1.3. Cancro da Mama Triplo Negativo

O cancro da mama triplo-negativo (TNBC, do inglês *Triple Negative Breast Cancer*) é um subtipo de cancro da mama caracterizado pela ausência de expressão de RE e RP, bem como pela ausência de amplificação do gene do HER2 (13). Esta definição imunohistoquímica distingue o TNBC de outros subtipos, conferindo-lhe particularidades biológicas e clínicas relevantes. O TNBC representa cerca de 10 a 15% de todos os casos de cancro da mama invasivos e ocorre mais frequentemente em mulheres jovens, quando comparados com outros subtipos moleculares (13). Os TNBC são bastante heterogéneos, tanto a nível clínico como histológico e molecular (14), evidenciam maior taxa proliferativa e maior incidência de recidiva e metástases (pulmonares, fígado e cérebro) (1,2,9,15). Tendem a ser biologicamente agressivos e estão frequentemente associados a um pior prognóstico, quando comparados com subtipos luminais ou HER2-positivo (16). A incidência é relativamente mais elevada em portadoras de mutações germinativas nos genes BRCA1/2, bem como em algumas populações específicas (2,9). Do ponto de vista clínico, o TNBC apresenta geralmente um risco elevado de recorrência nos primeiros 3–5 anos após o diagnóstico, seguido de uma diminuição mais acentuada, em contraste com o padrão de recaídas tardias observado em tumores luminais. A sobrevivência global a 5 anos é inferior à dos restantes subtipos, refletindo a agressividade intrínseca da doença e a ausência de terapias alvo eficazes disponíveis em larga escala (17).

Nos últimos anos, esta definição, baseada em estudos imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ*, tem sido desafiada pela identificação de outras entidades dentro dos tumores triplo negativos (18).

A diversidade dos TNBC reflete-se na sua subdivisão heterogénea, com base em estudos genómicos, classificada inicialmente em 2011 por Lehmann *et al.* (19), que identificou seis subtipos moleculares de TNBC, e revista por Liu e colaboradores, que sugeriram quatro subgrupos moleculares (20): Luminal com expressão de recetor de androgénio (LAR), Mesenquimal (MES), Imunomodulador (IM) e Basal imunossuprimido (BLIS). Embora nestes diferentes estudos tenham sido utilizadas plataformas distintas, a análise de um determinado conjunto de genes sugere que os TNBC englobam estes quatro grandes subtipos distintos (21,22). Os tumores de cada subtipo molecular de TNBC têm comportamento biológico semelhante, assim como alterações genéticas recorrentes em comum, sugerindo que a identificação e deteção destas alterações genéticas pode levar ao desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (21).



Os carcinomas LAR são caracterizados pela expressão de recetores de androgénio (RA). Embora os RA sejam expressos na maior parte dos casos de cancro da mama, incluindo tumores RE-positivos, o subgrupo LAR é caracterizado por ser positivo para RA e negativo para RE, RP e HER2. Estão associados a um grau histológico mais baixo, a uma diferenciação apócrina e a um baixo índice proliferativo (21,23). Estes carcinomas têm um comportamento biológico similar aos tumores luminais, com uma metastização preferencialmente óssea e uma menor resposta à quimioterapia neoadjuvante. Estão associados a uma idade mais avançada, apresentando, contudo, melhor sobrevida comparativamente aos restantes subtipos (24).

O subtipo MES está mais frequentemente associado a carcinomas do tipo metaplásico. Este carcinoma tem sido também descrito como associado a um perfil de células estaminais e estes tumores apresentam sinais morfológicos e moleculares de transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*) (25), características associadas ao subgrupo MES. Este subtipo está associado a mulheres mais jovens, a uma maior agressividade e a uma metastização preferencialmente sistémica. O subtipo IM é caracterizado pela expressão abundante de genes envolvidos na resposta imunitária e está associado a carcinomas invasivos de grau 3, com abundante infiltrado linfóide no estroma. É o subtipo com melhor prognóstico e está associado a uma boa resposta à quimioterapia neoadjuvante (21).

O subtipo BLIS está associado a carcinomas invasivos de grau 3, sem infiltrado linfóide no estroma. Representa o grupo de pior prognóstico, apresentando, contudo, boa resposta à quimioterapia neoadjuvante (21).

Estes subtipos estão na base de vários ensaios clínicos com terapêuticas dirigidas às alterações moleculares identificadas (26). A identificação dessas alterações abre a possibilidade de novas estratégias terapêuticas para o TNBC.

1.3.1 Diagnóstico e Tratamento do TNBC

O diagnóstico do TNBC obedece à classificação da OMS para o diagnóstico anatomopatológico e ao sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) TNM, devendo incluir tipo e grau histológicos, assim como o estudo imuno-histoquímico (IHQ) para avaliação dos RE e RP, expressão de HER2 e o marcador de proliferação celular Ki67. No que respeita ao tratamento, o TNBC é o subtipo mais agressivo de carcinoma de mama e as opções de tratamento para este grupo de tumores são ainda escassas. A quimioterapia (QT) continua a ser a base do tratamento sistémico para o TNBC. Em doentes com diagnóstico de TNBC, privilegia-se a realização do tratamento sistémico antes da intervenção



cirúrgica, ou seja, num regime neoadjuvante (NA), com a possível exceção de tumores em estádios muito precoces ou de subtipos histológicos especiais de baixo risco como o carcinoma cístico secretor ou adenoide (27). As *guidelines* norte-americanas da *American Society for Clinical Oncology* (ASCO) recomendam o tratamento neoadjuvante nos doentes com TNBC com pelo menos 1 cm (T1c) e/ou gânglio axilar positivo para invasão (28). Até recentemente, a utilização de terapêutica com inibidores de *checkpoint* imunológico (ICI) em neoadjuvância não estava recomendada para o TNBC (28). Em 2021 foi publicada uma atualização no que concerne à utilização de inibidores de *checkpoint* imunológico, passando a ser recomendada a sua utilização como tratamento de primeira linha em doentes positivos para o Ligando 1 da Morte Programada (PD-L1, do inglês *Programmed Death Ligand-1*) (28,29). O tratamento com intuito curativo no cancro da mama, de uma forma global, obriga ainda à realização da sua resseção cirúrgica, quer seja através da cirurgia conservadora (CC) da mama ou da mastectomia. No TNBC, previamente ao início da QT NA, está recomendada a realização de ressonância magnética (RM) e marcação do tumor, através de clips ou carbono, para que seja possível identificar o leito tumoral no momento da intervenção cirúrgica. Para avaliação da resposta imagiológica à terapêutica neoadjuvante, deve ser realizada uma nova RM antes desta intervenção. Atualmente, preconizam-se as técnicas de cirurgia oncoplástica, que diminuiram o número de mastectomias, alargando a possibilidade de realização de CC sem comprometimento do resultado estético da mama (30). A adequação da doente para CC recai sobre a relação entre o volume tumoral e o volume da mama que permita uma tumorectomia com margens livres. A doente deverá ainda deter condições para realização de radioterapia (RT) adjuvante (27). Em doentes com risco genético ou mutação no gene do cancro da mama 1/2 (BRCA1/2, do inglês *Breast Cancer 1/2*) confirmada, a opção cirúrgica preferencial é a mastectomia (31). Atualmente, as técnicas de mastectomia preferenciais são, maioritariamente, as poupadoras de pele e/ou do complexo areolomamilar. Preconiza-se a reconstrução mamária, imediata ou pós-adjuvância (QT e/ou RT), nas doentes submetidas a mastectomia que o desejem, à exceção de doentes com carcinoma inflamatório, nas quais o risco de recidiva local na pele por infiltração dermatológica de células malignas é significativo (31).

A RT pós-operatória está indicada em todas as doentes submetidas a CC com margens livres, estando associada uma diminuição de 50% do risco relativo de recidiva local (32). A aplicabilidade da RT no caso específico dos TNBC, partindo do princípio preconizado em que estes são tratados com QT NA, deve ser individualizada e integrada numa consulta de grupo multidisciplinar (33).

No caso de doença metastática, no TNBC deve ocorrer a identificação de marcadores “teragnósticos”, isto é, a identificação de uma estratégia de tratamento que combina terapêutica com diagnóstico. Neste



sentido, está indicada a avaliação de PD-L1 por IHQ e mutações germinativas de BRCA (34). A associação do TNBC a um maior envolvimento do sistema imunitário, assim como a elevada carga mutacional e o elevado grau histológico são as bases para a utilização da imunoterapia nos doentes TNBC metastático, pelo que já foi aprovada nestes doentes a combinação de um inibidor de checkpoint imunológico com QT como primeira linha de tratamento, em doentes com expressão de PD-L1 (34). O TNBC constitui um desafio significativo devido à sua agressividade, heterogeneidade molecular e impacto desproporcional em populações vulneráveis. A investigação atual procura identificar biomarcadores prognósticos e preditivos, bem como desenvolver terapias alvo personalizadas, que possam melhorar o prognóstico e reduzir a mortalidade associada a este subtipo.

1.4. Inflamação e Cancro

1.4.1 O papel da inflamação e sistema imunitário na carcinogénese

A inflamação consiste numa resposta biológica complexa de reposição da homeostasia após uma agressão, entendendo-se como agressão qualquer processo capaz de provocar lesão celular ou tecidual. Existem dois tipos principais de inflamação: inflamação aguda e inflamação crónica. A inflamação aguda consiste na resposta inflamatória inicial, de curta duração e resulta da ativação da imunidade inata, enquanto a inflamação crónica resulta da persistência de inflamação por um longo período. Embora a inflamação esteja associada a diversas patologias, nomeadamente doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, doenças pulmonares e doenças neurológicas, a associação entre a inflamação e o cancro foi identificada por Rudolph Virchow, há mais de um século, ao identificar leucócitos infiltrados em tecidos tumorais e sugerir que a inflamação induz a proliferação celular (35).

Desde esta descoberta no século XIX, a inflamação passou a ser reconhecida como uma das seis características biológicas envolvidas no desenvolvimento tumoral e um *hallmark* do cancro, estando relacionada tanto com a iniciação como com a progressão e a metastização tumorais (36).

A inflamação desempenha um papel central no desenvolvimento do cancro, uma vez que um ambiente inflamatório favorece alterações genéticas e epigenéticas nas células (37). Durante processos inflamatórios prolongados, mediadores como citocinas, espécies reativas de oxigénio e fatores de crescimento podem induzir lesões no DNA, aumentar a taxa de mutações e comprometer os mecanismos de reparação celular (38). Essas alterações genéticas acumuladas podem ativar oncogenes, inativar genes supressores de tumor e promover a instabilidade genómica, criando condições



favoráveis à transformação maligna. Além disso, a inflamação pode estimular a proliferação celular, a angiogénese e a evasão do sistema imunitário, todos processos cruciais para a progressão tumoral (39). A inflamação é uma resposta fundamental do sistema imunitário (40) que envolve tanto a imunidade inata como a adquirida. A imunidade inata atua como a primeira linha de defesa do organismo, caracterizada pela rápida resposta à agressão, independentemente do estímulo prévio (40). É influenciada por fatores solúveis como as proteínas do complemento, e diversas células efetoras como basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas (igualmente apresentadoras de antígenos) e células *natural killer* (NK) (41,42). Os principais mecanismos na imunidade inata são a fagocitose, a libertação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do complemento e a síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (43). A resposta imunitária inata é ativada através de estímulos específicos, representados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) presentes na superfície dos microrganismos invasores, e ausentes nas células normais do hospedeiro, por interação com diferentes recetores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*), localizados nas membranas ou no interior das células/fatores solúveis que atuam na resposta imunitária inata (43). Esta resposta não apresenta a diversidade nem a capacidade adaptativa características da resposta imunitária adquirida, pois apenas reconhece os PAMPs que estão programados no código genético (43). A imunidade adquirida é caracterizada por uma resposta mais lenta, mas com aumento de especificidade e diversidade de reconhecimento antigénico, memória, especialização da resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. É influenciada por moléculas solúveis, como os anticorpos, e por células B e T (CD4⁺ e CD8⁺) (41,43,44). A resposta imunitária adquirida depende da ativação, expansão e diferenciação de leucócitos, e das moléculas solúveis que estes produzem (anticorpos, citocinas e quimiocinas). As células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cells*) desempenham um papel fundamental na ativação dos leucócitos, pois possuem a capacidade de apresentar antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) às células T (43).

Contudo, a inflamação e o sistema imunitário têm um papel duplo no cancro (36), podendo tanto proteger como favorecer o desenvolvimento tumoral. Em condições normais, as células imunitárias reconhecem e eliminam células alteradas ou potencialmente malignas através da imunovigilância. No entanto, em contextos de inflamação crónica, a presença contínua de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento pode criar um microambiente tumoral favorável à sobrevivência e proliferação das células neoplásicas. Macrófagos associados ao tumor, células T reguladoras e outras células do



sistema imunitário podem ser recrutados e reprogramados para suprimir respostas imunitárias antitumorais, enquanto promovem a angiogénese, a invasão e a metastização. Assim, a relação entre a inflamação e o sistema imunitário no cancro é complexa, envolvendo um equilíbrio delicado entre mecanismos protetores e processos que, inadvertidamente, impulsionam a progressão da doença(45,46).

1.4.2 Células inflamatórias e mediadores do microambiente tumoral

As respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro no tumor e do seu microambiente podem influenciar a formação e progressão do cancro a nível molecular (47,48). Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que a resposta inflamatória sistémica desempenha um papel importante na progressão de diversos tipos de tumores (49). Alguns marcadores hematológicos sistémicos, que representam a resposta inflamatória do organismo, têm sido utilizados como fator de prognóstico associados à progressão tumoral, incluindo a contagem de neutrófilos, linfócitos e plaquetas e os valores de proteína C reativa.(49). O papel prognóstico destes marcadores, na maioria dos estádios dos tumores, é atribuído à infiltração das células do sistema imunitário, como neutrófilos e linfócitos, nos tumores sólidos e à inflamação.

Os leucócitos, que englobam principalmente linfócitos, neutrófilos e monócitos, desempenham um papel importante na resposta imunitária contra a infeção e danos tecidulares (50). Os linfócitos, em particular, são também elementos importantes na resposta imunitária contra o cancro. Na fase que precede o tratamento em vários tipos de cancro, um nível elevado de linfócitos está associado a um melhor prognóstico (50). O nível de neutrófilos, por outro lado, encontra-se elevado no processo de crescimento tumoral e de metastização, estando associado à estimulação da angiogénese tumoral e à mediação da imunossupressão (50). A elevação do nível de neutrófilos deve-se à libertação de citocinas pelas células tumorais que levam à estimulação da libertação de neutrófilos na medula óssea. Neste sentido, um nível de neutrófilos elevado, quer sanguíneo, quer no local do tumor, está associado a um pior prognóstico (51). Os monócitos circulantes têm a capacidade de se diferenciar em macrófagos ou células dendríticas quando atingem a matriz extracelular, participando na defesa e regeneração tecidual (52). Podem exercer funções antitumorais, como a fagocitose e a secreção de mediadores antitumorais, mas dentro do microambiente tumoral são frequentemente reprogramados em células que promovem o crescimento do cancro, como macrófagos associados ao tumor (TAMs, do inglês *Tumor-Associated Macrophages*) ou células dendríticas monocíticas. Esses TAMs promovem a angiogénese, a



remodelação extracelular, o recrutamento de células imunossupressoras e o intravasamento tumoral (53). O nível de monócitos elevado pré-operatório ($> 0,48 \times 10^9/L$) foi identificado como fator de prognóstico independente de pior sobrevida, especialmente nos tipos mais agressivos de cancro da mama como o Luminal B, o HER-2 positivo e o TNBC (54).

As plaquetas são consideradas, tradicionalmente, como componentes celulares importantes na hemostasia e na trombose. No entanto, as interações complexas entre as células tumorais e as plaquetas circulantes desempenham um papel importante no crescimento e na disseminação tumoral, pois fornecem uma superfície pró-coagulante, promovendo a amplificação da coagulação relacionada com o cancro e podem ser recrutadas para envolver as células tumorais, protegendo-as das respostas imunológicas e facilitando o processo de metastização (55). Em diversos tipos de cancro, a trombocitose (plaquetas $> 400 \times 10^9/L$) está associada a uma sobrevida global de cinco anos significativamente menor e está correlacionada com estádios TNM mais avançados (III e IV) (56). A trombocitopenia, por sua vez, está associada à diminuição do potencial metastático dos tumores (57).

Na resposta imunitária tumoral, observam-se alterações nas relações entre os valores de neutrófilos, linfócitos e monócitos no sangue periférico, representados sob a forma de razões (58). Estudos indicam que uma maior razão entre neutrófilos e linfócitos (NLR, do inglês *Neutrophil to Lymphocyte Ratio*) está associada a um prognóstico tumoral desfavorável. Alterações nas razões entre linfócitos e monócitos (LMR, do inglês *Lymphocyte to Monocyte Ratio*) e entre plaquetas e linfócitos (PLR, do inglês *Platelet to Lymphocyte Ratio*) também refletem um desequilíbrio entre o sistema imunitário adaptativo e o sistema imunitário inato e carência de atividade antitumoral (58).

Neste sentido, estas três razões, NLR, LMR e PLR, têm sido estudadas e propostas como fator de prognóstico em diferentes tipos de cancro (8), podendo ser facilmente calculadas a partir de testes de sangue simples, facilmente acessíveis, de baixo custo e já realizados rotineiramente (59). O papel prognóstico destes marcadores, na maioria dos estádios dos tumores, é atribuído à infiltração das células do sistema imunitário, como neutrófilos e linfócitos, nos tumores sólidos e à inflamação.

Razão Neutrófilo-Linfócito (NLR)

A razão neutrófilo-linfócito, uma combinação de dois marcadores independentes de inflamação, é considerada um marcador simples e inespecífico de inflamação. Assim, uma NLR elevada está associada a uma redução na sobrevida global (SG) em muitos doentes com neoplasias malignas, sendo que no contexto do cancro da mama, é mais evidente nas doentes com TNBC (8,60).



Os mecanismos subjacentes a esta associação ainda são pouco compreendidos. A neutrofilia inibe o sistema imunitário ao suprimir a atividade citolítica das células imunitárias, como os linfócitos, as células T ativadas e as células NK. A importância dos linfócitos tem sido destacada, pelo fato de a infiltração crescente de tumores com linfócitos estar associada a uma melhor resposta ao tratamento citotóxico e, conseqüentemente, a um melhor prognóstico. Uma NLR elevada tem sido associada a um aumento na infiltração peritumoral de macrófagos e a um aumento da interleucina 17 (60).

Estudos que analisaram o valor prognóstico da NLR revelaram existir uma relação inversa significativa entre NLR e a sobrevivência em diversos tipos de cancro, incluindo o cancro da mama. Os linfócitos atuam na imunovigilância do cancro da mama, tendo um papel vital na defesa, inibindo a proliferação, invasão e migração das células tumorais (8,47). Por outro lado, os neutrófilos suprimem a atividade citolítica dos linfócitos, facilitando a adesão das células tumorais e metastização em órgãos distantes através da secreção de fatores de crescimento tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*)(47), originando um aumento da angiogénese e conseqüentemente um aumento no crescimento e progressão tumorais (8).

Razão Linfócito–Monócito (LMR)

Tem sido reportada uma associação entre a razão LMR e o prognóstico dos doentes para diversos tipos de cancro. Os linfócitos e monócitos são células inflamatórias essenciais na resposta inflamatória sistémica (54). Os linfócitos possuem uma atividade antitumoral, capaz de induzir a morte celular citotóxica e inibir a proliferação celular, podendo adquirir o papel de supressor tumoral. Por outro lado, os monócitos estão envolvidos na tumorigénese. No contexto do microambiente tumoral (TME, do inglês *Tumor Microenvironment*) os TAMs são as células imunitárias predominantes e podem adquirir funções antitumorais ou pró-tumorais(61). Os TAMs antitumorais, ativados por citocinas como o interferão-gama (IFN- γ , do inglês *Interferon-gama*), o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α , do inglês *Tumor necrosis factor alpha*) ou o fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), promovem respostas de células T auxiliares do tipo 1 (Th1), expressam proteínas de superfície específicas (CD68, CD80 e CD86) e segregam moléculas pró-inflamatórias para combater as células neoplásicas (61). Por outro lado, as TAMs pró-tumorais, estimuladas por IL-10 ou Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *Transforming growth factor beta*), promovem respostas Th2, expressam diferentes marcadores proteicos (CD163, CD204 e CD206) e produzem citocinas anti-inflamatórias, contribuindo para o crescimento tumoral (61).



No microambiente tumoral, as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β e os radicais livres segregados pelos monócitos e macrófagos estão associados à angiogénese, invasão das células tumorais e metastização (62).

Investigadores demonstraram que níveis baixos de LMR estão associados a valores inferiores de sobrevivência global em doentes com TNBC, por outro lado, verificou-se que níveis elevados de LMR em doentes com cancro da mama não metastizado sob quimioterapia neoadjuvante, estão associados a uma sobrevivência livre de doença mais favorável (8).

Razão Plaqueta-Linfócito (PLR)

A razão plaqueta-lyfócito tem emergido como um marcador inflamatório e imunológico de interesse no contexto oncológico. Estudos revelam que em diversos tipos de cancro, a contagem elevada de plaquetas está associada a um mau prognóstico e aumento da metastização (8,47). As plaquetas desempenham papel vital não só na função hemostática clássica, mas também na criação de um ambiente hipercoagulável que pode mediar a progressão do tumor (47). A angiogénese e o crescimento tumoral podem ser estimulados pela secreção de fatores de crescimento derivados das plaquetas, como o fator de crescimento endotelial vascular, o fator de crescimento transformador beta e o fator plaquetário 4 (8).

As plaquetas contêm moléculas pró-inflamatórias e citocinas (P-selectina, CD40L, e interleucinas IL-1, IL-3 e IL-6) e várias citocinas anti-inflamatórias. A entrada de células neoplásicas na circulação sanguínea leva à ativação plaquetária, uma vez que estas células expressam uma glicoproteína ligante de P-selectina 1 (PSGL1, do inglês *P-selectin glycoprotein ligand-1*) e secretam altos níveis de fator tecidual (57). As interações entre as plaquetas e as células neoplásicas e o desenvolvimento de trombose intravascular induzida pelo cancro podem inibir o reconhecimento e a eliminação pelo sistema imunitário. Além disso, esta formação de trombos pode levar à fixação das células neoplásicas ao endotélio, promovendo a sobrevivência destas células e o seu potencial invasivo (57).

Um estudo de meta-análise que investigou a importância prognóstica do PLR, revela que, apesar do valor prognóstico do PLR não ter sido determinado para os subtipos moleculares de cancro da mama, foi encontrada uma associação entre a PLR e as características clinicopatológicas do tumor, como tamanho, metastização ganglionar e metastização à distância (8).



1.5. Objetivos

Este projeto de investigação tem como objetivo principal relacionar as razões NLR, LMR e PLR com o tratamento neoadjuvante e adjuvante como valores de prognóstico no cancro da mama triplo negativo. A determinação destas razões constitui um indicador passível de refletir a atividade da doença, podendo fornecer suporte adicional à estratificação prognóstica dos doentes e à definição da estratégia terapêutica.

1.5.1 Objetivos Específicos

- Investigar a relação entre *NLR*, *PLR* e *LMR* do sangue periférico pré- e pós-tratamento e a taxa de sobrevivência de doentes com cancro da mama triplo negativo.
- Investigar a associação entre *NLR*, *PLR* e *LMR* e as características clinicopatológicas.
- Investigar o papel prognóstico de *NLR*, *PLR* e *LMR* no cancro da mama triplo negativo em respondedores e não respondedores à terapêutica neoadjuvante.



2. Métodos

2.1. Amostras

Este projeto de investigação constitui um estudo retrospectivo, sem intervenção e teve como objetivo principal relacionar as razões NLR, LMR e PLR com o tratamento neoadjuvante e adjuvante como valores de prognóstico no TNBC, que inclui 98 mulheres (n=98).

Após a aprovação pelas Comissões de Ética da Unidade Local de Saúde do Baixo Mondego (ULSBM) e do Instituto Português de Oncologia de Coimbra (IPOC), foi realizado um levantamento de uma amostra de indivíduos destas duas instituições com o diagnóstico de TNBC, confirmado histologicamente, que receberam cirurgia, precedida de terapêutica neoadjuvante (n=80) ou seguida de terapêutica adjuvante (n=18).

Esta amostra foi caracterizada e foram extraídos dos respetivos registos, assim como os valores sanguíneos de neutrófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas. As razões NLR, LMR e PLR foram calculadas a partir destes valores sanguíneos.

A NLR foi definida como a razão entre a contagem absoluta de neutrófilos e a contagem absoluta de linfócitos no sangue periférico, a LMR foi definida como a razão entre a contagem absoluta de linfócitos e a contagem absoluta de monócitos no sangue periférico e a PLR foi definida como a razão entre a contagem absoluta de plaquetas e a contagem absoluta de linfócitos no sangue periférico. Os valores foram calculados a partir dos dados laboratoriais obtidos aquando do diagnóstico do carcinoma da mama primário, assim como nos 6, 12 e 24 meses de tratamento. O valor de corte do NLR, LMR e PLR foi determinado através da análise da curva *receiver operating characteristics* (ROC).

As características sociodemográficas e anatomopatológicas recolhidas foram as seguintes: idade, tipo histológico, estadiamento, grau histológico, tamanho do tumor, invasão ganglionar, presença de metástases, tratamento e sobrevida. O tratamento realizado foi ajustado à realidade de cada doente, de acordo com as recomendações da *European Society for Medical Oncology* (ESMO) (27).

Foram definidas como respondedoras à terapêutica neoadjuvante aquelas doentes em que não há evidência de células neoplásicas viáveis na peça operatória obtida na resseção cirúrgica. Os não respondedores correspondem àqueles em que se identificaram células neoplásicas pertencentes ao tumor inicial na peça operatória, mesmo que parcialmente.



2.2. Critérios de Inclusão e Exclusão

A definição de critérios de inclusão e exclusão é uma etapa essencial em qualquer investigação científica, pois permite garantir a qualidade, a relevância e o rigor dos dados analisados. Estes critérios ajudam a selecionar apenas os participantes que se enquadram nos objetivos da investigação, assegurando que a amostra é adequada e representativa.

Foram estudadas amostras de indivíduos com os seguintes critérios de inclusão: doentes do género feminino; idade superior a 18 anos; diagnóstico de cancro da mama triplo negativo realizado de 2015 a 2024, na ULSBM e no IPOC.

Foram excluídas as amostras de indivíduos com os seguintes critérios de exclusão: patologia oncológica prévia, intervenção cirúrgica e/ou tratamento oncológico prévio, portadores de doença autoimune ou inflamatória e tratamento imunossupressor prévio, grávidas e maiores incapazes.

2.3. Comissão de Ética

O estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética da ULSBM e do IPOC a 18-4-2024 e a 10-10-2024, respetivamente. O TNBC apresenta uma mortalidade com uma sobrevida relativa de 5 anos de 65% na doença regional e de 12% quando diagnosticado num estágio avançado, sendo expectável que a maioria destas doentes estejam falecidas. Foi obtido a dispensa de consentimento informado de acordo com a Lei da Investigação Clínica -LIC -Lei n.º 2 21/2014 de 16 de abril alterada pela Lei n.º 2 73/2015 de 27 de julho) - Dispensa de Consentimento Informado em estudos clínicos sem intervenção (Artigo 62, nº 2) e Lei n.º 12/2005 de 26 de janeiro (Art. 198, nº 6).

Foram ainda respeitados os princípios da Declaração de Helsínquia, no que se refere à gestão da informação clinicopatológica associada às amostras humanas e à garantia da confidencialidade das doentes.



2.4. Análise de dados

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS®) v.29 (SPSS Inc., Chicago, EUA) para Windows. Foi considerado um nível de significância de 5%. Procedeu-se ao cálculo de estatísticas descritivas relativamente a todas as características clínicas e patológicas da amostra, sendo utilizadas média e desvio padrão, bem como quartis para as variáveis quantitativas e frequências para as variáveis qualitativas.

Para avaliar a associação entre as razões entre neutrófilos, linfócitos e plaquetas e as características clinico-patológicas como: variáveis gânglios linfáticos, metástases, tipo de cirurgia, quimioterapia e imunoterapia, recorreu-se ao teste do Qui-quadrado de independência ou, sempre que aplicável, ao teste exato de Fisher. Relativamente à associação entre as razões e a classificação TNM e o estadiamento, foi utilizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney.



3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

Do total de 98 casos desta amostra, a média de idades corresponde a 58,12 anos, sendo a idade mínima de 27 anos e a máxima de 86 anos. No que respeita ao tamanho do tumor, 56% das doentes apresentavam um tumor de tamanho entre os 2 e os 5 cm (T2), como se pode observar na Tabela 1. A maioria das doentes não apresentava invasão dos gânglios linfáticos (59%) nem metástases à distância (93%). Relativamente ao estágio, 66% dos tumores foram caracterizados como estágio II, seguindo-se o estágio III com 21% dos casos. Os estágios I e IV nesta amostra foram menos frequentes, correspondendo a 5% e 7% dos casos, respetivamente. No que respeita às estratégias terapêuticas, 82% das mulheres foram submetidas a quimioterapia neoadjuvante, sendo que os restantes 18% dos casos foram submetidas a quimioterapia apenas em regime de adjuvância. Relativamente à imunoterapia, concomitante à quimioterapia, apenas 15% das mulheres foram submetidas a esta terapêutica (Tabela 1). No que respeita ao tipo de cirurgia, 31% foram submetidas a cirurgia conservadora (tumorectomia), 63% foram submetidas a mastectomia e 6% não foram submetidas a intervenção cirúrgica. No que respeita à resposta à terapêutica, 33% das doentes apresentaram resposta patológica completa na peça operatória e a sobrevida aos dois anos foi de 61%, como evidenciado na Tabela 1.



Tabela 1 – Caracterização clínico-patológica da amostra de 98 doentes deste estudo.

		n (%)
Média Idade (±DP)	58,12 ± 14,4 anos	
Mínimo e máximo de idades	27 – 86 anos	
Tamanho Tumor	T1	13 (13)
	T2	55 (56)
	T3	22 (22)
	T4	7 (8)
Gânglios Linfáticos	Negativo	58 (59)
	Positivo	39 (40)
Metástases	Negativo	91 (93)
	Positivo	7 (7)
Estádio	I	5 (5)
	II	65 (66)
	III	21 (21)
	IV	7 (7)
Quimioterapia	Neoadjuvante	80 (82)
	Adjuvante	18 (18)
Imunoterapia	Sim	15 (15)
	Não	83 (85)
Tipo de Cirurgia	Sem cirurgia	6 (6)
	Tumorectomia	30 (31)
	Mastectomia	62 (63)
Resposta à terapêutica	Respondedores	32 (33)
	Não Respondedores	66 (67)
Sobrevivência aos 2 anos	Vivo	60 (61)
	Morto	17 (17)

DP: (Desvio Padrão)



3.2. Razão Neutrófilo–Linfócito

Foram avaliadas as associações entre as NLR, categorizadas em $<2,6$ e $\geq 2,6$, em diferentes momentos (pré-tratamento, 6 meses, 12 e 24 meses após o primeiro tratamento), e as características clinicopatológicas e terapêuticas, como evidenciado na Tabela 2. Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre o tamanho do tumor e o NLR no momento pré-tratamento ($p < 0,001$). Doentes com tumores de menores dimensões (T1) apresentaram NLR $< 2,6$ em 17% dos casos, contrastando com apenas 3% com NLR elevado. Aos 12 meses, a associação manteve-se significativa ($p=0,048$), embora mais discreta. Aos 6 e 24 meses, não houve associação estatisticamente relevante ($p=0,103$ e $p=0,266$, respetivamente). Relativamente à invasão ganglionar, verificou-se que as doentes com NLR $\geq 2,6$ no momento do diagnóstico (Pré-NLR) apresentam uma maior probabilidade de apresentar invasão ganglionar (38% vs 24%), apesar desta associação não ser estatisticamente significativa ($p=0,131$). Aos 24 meses de seguimento ($p=0,026$), verificou-se uma associação significativa apenas com maior proporção de NLR $< 2,6$ entre os pacientes sem invasão ganglionar (88%). Nos restantes momentos, a associação não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$). A presença de metástases à distância evidencia uma associação estatisticamente significativa relativamente ao NLR no momento pré-tratamento ($p=0,023$), sendo observada uma proporção elevada de NLR $\geq 2,6$ entre os pacientes com presença de metástases (71% vs 26%). Aos 6, 12 e 24 meses, não foram encontradas associações estatisticamente significativas. Relativamente ao estágio do tumor, doentes em estádios mais avançados (III e IV) apresentam valores mais elevados de NLR no momento pré-tratamento ($p<0,001$). Doentes TNBC em estágio II apresentaram, de forma significativa, maior frequência de NLR $< 2,6$ no momento pré-tratamento ($p<0,001$), com 78%. Nas avaliações de 6, 12 e 24 meses, não foram observadas associações estatisticamente relevantes com o estadiamento (Tabela 2). Nas diferentes modalidades de tratamento cirúrgico (sem cirurgia, tumorectomia, mastectomia) não foi possível realizar nenhum teste estatístico, à exceção dos 24 meses, contudo, não se observa significância estatística. A presença de quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante não mostrou qualquer associação significativa com os valores de NLR ao longo do seguimento. Da mesma forma, o uso de imunoterapia também não esteve associado a variações no NLR em nenhum dos períodos avaliados.

Tabela 2 – Relação entre NLR e as características clínico-patológicas



Características	NLR Pré		P	NLR 6 meses		P	NLR 12 meses		P	NLR 24 meses		P	
	< 2,6	≥ 2,6		< 2,6	≥ 2,6		< 2,6	≥ 2,6		< 2,6	≥ 2,6		
Tamanho Tumor	T1	12(17)	1(3)	<0,001	7(1)	6(12)	0,103	7(13)	5(17)	0,048	8(17)	1(8)	0,266
n(%)	T2	42(61)	13(45)		29(64)	24(49)		39(71)	11(4)		26(55)	7(54)	
	T3	13(19)	9(31)		6(13)	15(31)		7(13)	11(4)		11(23)	3(23)	
	T4	2(3)	6(21)		3(7)	4(8)		2(4)	3(10)		2(4)	2(15)	
Gânglios Linfáticos	Negativo	44(76)	14(24)	0,131	28(50)	28(50)	0,523	34(67)	17(33)	0,571	30(88)	4(12)	0,026
n(%)	Positivo	24(62)	15(38)		16(43)	21(57)		20(61)	13(39)		16(64)	9(36)	
Metastases n(%)	Negativo	67(74)	24(26)	0,023	44(49)	45(51)	0,364	52(63)	30(37)	0,549	46(79)	12(21)	0,389
	Positivo	2(29)	5(71)		1(20)	4(80)		3(100)	0(0)		1(50)	1(50)	
Estádio do Tumor	I	4(6)	1(3)	<0,001	3(7)	2(4)	0,133	2(4)	2(7)	0,592	2(4)	1(8)	0,256
n(%)	II	54(78)	11(38)		33(73)	31(63)		42(76)	19(63)		36(77)	7(54)	
	III	9(13)	12(41)		8(18)	12(25)		8(15)	9(30)		8(17)	4(31)	
	IV	2(3)	5(17)		1(2)	4(8)		3(6)	0(0)		1(2)	1(8)	
Tipo de Cirurgia	Sem cirurgia	4(67)	2(33)	0,665	1(2)	3(6)	0,354	0(0)	3(10)		-	-	0,736
n(%)	Tumorectomia	23(77)	7(23)		15(33)	14(29)		19(35)	8(27)		15(32)	3(23)	
	Mastectomia	42(68)	20(32)		29(64)	32(65)		36(66)	19(63)		32(68)	10(77)	
Quimioterapia	Neoadjuvante	57(71)	23(29)	0,700	38(84)	39(80)	0,541	46(84)	24(80)	0,674	37(79)	10(77)	1,00
n(%)	Adjuvante	12(67)	6(33)		7(16)	10(20)		9(16)	6(20)		10(21)	3(23)	
Imunoterapia	Sim	10(67)	5(33)	0,763	5(11)	10(20)	0,219	9(16)	3(10)	0,527	-	-	-
n(%)	Não	59(71)	24(29)		40(89)	39(80)		46(84)	27(90)		47(100)	13(100)	

3.3. Razão Linfócito-Monócito

Foram avaliadas as associações entre as LMR, categorizadas em <3,4 e ≥3,4, em diferentes momentos (pré-tratamento, 6 meses, 12 e 24 meses após o primeiro tratamento), e as características clinicopatológicas e terapêuticas, como evidenciado na Tabela 3. No momento pré-tratamento, verificou-se uma associação inversa estatisticamente significativa entre o LMR e o tamanho tumoral ($p=0,032$), sendo que as doentes com um LMR ≥ 3,4 apresentam tumores mais pequenos. Aos 6, 12 e 24 meses, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Não se verificaram diferenças significativas entre o LMR e a invasão ganglionar em nenhum dos momentos avaliados. Também não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o LMR e a presença de metástases (pré: $p=0,680$; 6 meses: $p=0,320$; 12 meses: $p=1,0$; 24 meses: $p=0,519$). Ainda assim, destaca-se que aos 6 meses todos os doentes com presença de metástases apresentavam LMR < 3,4. Houve associação significativa inversa entre o LMR e o estágio tumoral no pré-tratamento ($p=0,012$) e aos 6 meses ($p=0,014$), sendo que as doentes com um LMR ≥ 3,4 apresentam estádios menos avançados. Doentes



com LMR <3,4 apresentaram maior frequência de estádios II (56–62%) e III (34–26%), enquanto no grupo com LMR ≥3,4 prevaleceu o estágio II (71–84%). Aos 12 e 24 meses não se observaram diferenças relevantes. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o LMR e o tipo de cirurgia realizado nem a quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante, em nenhum dos momentos. Não se verificaram associações significativas entre o LMR e a imunoterapia no pré-tratamento ($p=0,767$) nem aos seis meses ($p=0,752$). Contudo, aos 12 meses observou-se uma associação marginalmente significativa ($p=0,051$), com maior proporção de doentes com LMR <3,4 a receber imunoterapia (20% vs 3%).

Tabela 3 – Relação entre LMR e as características clinicopatológicas

Características		LMR Pré		P	LMR 6 meses		P	LMR 12 meses		P	LMR 24 meses		P
		<3,4	≥3,4		<3,4	≥3,4		<3,4	≥3,4		<3,4	≥3,4	
Tamanho Tumor n(%)	T1	3(9)	10(15)	0,032	9(13)	4(16)	0,064	8(14)	4(13)	0,286	5(22)	4(11)	0,614
	T2	15(47)	40(61)		35(51)	18(72)		30(54)	20(69)		9(39)	24(65)	
	T3	8(25)	14(21)		19(28)	2(8)		14(25)	4(14)		6(26)	8(22)	
	T4	6(19)	2(3)		6(9)	1(4)		4(7)	1(3)		3(13)	1(3)	
Gânglios Linfáticos n(%)	Negativo	16(28)	42(72)	0,167	39(70)	17(30)	0,352	33(65)	18(35)	0,636	12(35)	22(65)	0,498
	Positivo	16(41)	23(59)		29(78)	8(22)		23(70)	10(30)		11(44)	14(56)	
Metastases n(%)	Negativo	29(31)	62(68)	0,680	64(72)	25(28)	0,320	54(66)	28(34)	1,0	23(40)	35(60)	0,519
	Positivo	3(43)	4(57)		5(100)	0(0)		2(67)	1(33)		0(0)	2(100)	
Estádio do Tumor n(%)	I	0(0)	5(8)	0,012	3(4)	2(8)	0,014	2(4)	2(7)	0,533	1(4)	2(5)	0,765
	II	18(56)	47(71)		43(62)	21(84)		40(71)	21(72)		16(70)	27(73)	
	III	11(34)	10(15)		18(26)	2(8)		12(21)	5(17)		6(26)	6(16)	
	IV	3(9)	4(6)		5(7)	0(0)		2(4)	1(3)		0(0)	2(5)	
Tipo de Cirurgia n(%)	Sem cirurgia	3(9)	3(5)	0,328	3(4)	1(4)	0,809	2(4)	1(3)	0,546	-	-	0,571
	Tumorectomia	7(22)	23(35)		20(29)	9(36)		20(36)	7(24)		8(35)	10(27)	
	Mastectomia	22(69)	40(61)		46(67)	15(60)		34(61)	21(72)		15(65)	27(73)	
Quimioterapia n(%)	Neoadjuvante	29(91)	51(77)	0,109	57(83)	20(80)	0,768	47(84)	23(79)	0,596	18(78)	29(78)	1,00
	Adjuvante	3(9)	15(23)		12(17)	5(20)		9(16)	6(21)		5(22)	8(22)	
Imunoterapia n(%)	Sim	4(13)	11(17)	0,767	12(17)	3(12)	0,752	11(20)	1(3)	0,051	-	-	-
	Não	28(88)	55(83)		57(83)	22(88)		45(80)	28(97)		23(100)	37(100)	

3.4. Razão Plaqueta-Linfócito

Foram avaliadas as associações entre as razões plaqueta-lyfócito (PLR), categorizadas em <325 e >325, em diferentes momentos (pré-tratamento, 6 meses, 12 e 24 meses após o primeiro tratamento), e as características clinicopatológicas e terapêuticas (Tabela 4). Em nenhum dos momentos avaliados (pré, 6, 12 e 24 meses) foi observada associação estatisticamente significativa entre o PLR e o tamanho



tumoral, invasão ganglionar ou presença de metástases. O estadiamento tumoral e tipo de cirurgia não mostraram associação significativa com o PLR em nenhum momento. A quimioterapia foi a única variável com diferença significativa, observada aos 6 meses ($p=0,038$), em que doentes com PLR <325 realizaram mais frequentemente quimioterapia neoadjuvante (86% vs 63%). Na imunoterapia também não se verificaram associações significativas.

Tabela 4 – Relação entre PLR e as características clinicopatológicas

Características	PLR Pré		P	PLR 6meses		P	PLR 12 meses		P	PLR 24 meses		P	
	<325	>325		<325	>325		<325	>325		<325	>325		
Tamanho Tumor n(%)	T1	13(14)	0(0)	0,928	11(14)	2(13)	0,258	11(14)	1(25)	0,595	9(15)	0(0)	0,867
	T2	52(55)	3(75)		46(59)	7(44)		49(61)	1(25)		32(54)	1(100)	
	T3	21(22)	1(25)		16(21)	5(31)		17(21)	1(25)		14(24)	0(0)	
	T4	8(9)	0(0)		5(6)	2(13)		4(5)	1(25)		4(7)	0(0)	
Gânglios Linfáticos n(%)	Negativo	56(97)	2(3)	1,0	46(82)	10(18)	0,837	49(96)	2(4)	0,644	34(100)	0(0)	0,424
	Positivo	37(95)	2(5)		31(84)	6(16)		31(94)	2(6)		24(96)	1(4)	
Metástases n(%)	Negativo	88(97)	3(3)	0,260	75(84)	14(16)	0,2	78(95)	4(5)	1,0	57(98)	1(2)	1,0
	Positivo	6(86)	1(14)		3(60)	2(40)		3(100)	0(0)		2(100)	0(0)	
Estádio do Tumor n(%)	I	5(5)	0(0)	0,351	4(5)	1(6)	0,127	4(5)	0(0)	0,896	3(5)	0(0)	0,833
	II	63(67)	2(50)		56(72)	8(50)		58(72)	3(75)		42(71)	1(100)	
	III	20(21)	1(25)		15(19)	5(31)		16(20)	1(25)		12(20)	0(0)	
	IV	6(6)	1(25)		3(4)	2(13)		3(4)	0(0)		2(3)	0(0)	
Tipo de Cirurgia n(%)	Sem cirurgia	5(5)	1(25)	-	4(5)	0(0)	-	3(4)	0(0)	-	-	-	1,00
	Tumorectomia	28(30)	2(50)		24(31)	5(31)		26(32)	1(25)		18(31)	0(0)	
	Mastectomia	61(65)	1(25)		50(64)	11(69)		52(64)	3(75)		41(70)	1(100)	
Quimioterapia n(%)	Neoadjuvante	77(82)	3(75)	0,562	67(86)	10(63)	0,038	67(83)	3(75)	0,547	46(78)	1(100)	1,00
	Adjuvante	17(18)	1(25)		11(14)	6(38)		14(17)	1(25)		13(22)	0(0)	
Imunoterapia n(%)	Sim	15(16)	0(0)	1,00	13(17)	2(13)	1,00	11(14)	1(25)	0,462	-	-	-
	Não	79(84)	4(100)		65(83)	14(88)		70(86)	3(75)		59(100)	1(100)	

3.5. Sobrevida

3.5.1. NLR e Sobrevida

No que respeita à sobrevida das doentes ao final de um ano, na análise da NLR pré-tratamento, observou-se que os doentes que faleceram no período de um ano apresentaram valores medianos mais elevados em comparação com os doentes que se mantiveram vivos. O grupo de doentes falecidos apresentou uma mediana do NLR em torno de 3,5 a 4, enquanto o grupo de sobreviventes apresentou uma mediana próxima de 2. Adicionalmente, verificou-se uma maior dispersão dos valores no grupo dos doentes falecidos, incluindo casos com NLR superiores a 10, não observados de forma tão marcada no

grupo dos sobreviventes. Na comparação entre os grupos verifica-se que o NLR-pré é mais elevado no grupo que morreu ao fim de 1 ano, indicando uma possível associação entre valores aumentados de NLR e pior prognóstico em carcinoma da mama triplo negativo.

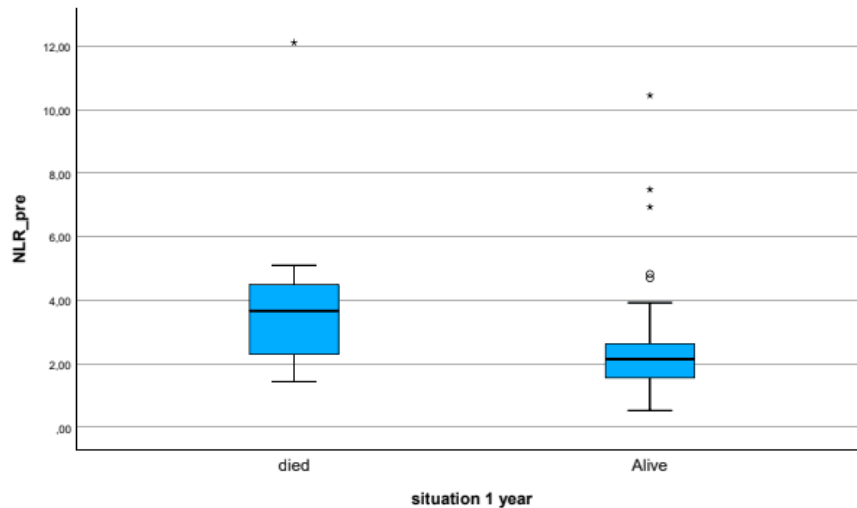


Figura 1.: Avaliação dos níveis de NLR pré-diagnóstico ao final de um ano de tratamento.

3.5.2. LMR e Sobrevida

Na análise da LMR pré-tratamento, verificou-se que os doentes que sobreviveram ao fim de um ano apresentaram valores medianos superiores em comparação com os doentes que faleceram. O grupo de sobreviventes apresentou uma mediana do LMR em torno de 4, com maior dispersão dos valores, incluindo casos acima de 10 e *outliers* superiores a 15. Em contraste, o grupo dos doentes falecidos apresentou uma mediana próxima de 2,5 a 3, com valores mais concentrados entre 2 e 3,5 e sem registo de valores elevados. Na comparação entre os grupos verifica-se que os sobreviventes apresentam valores de LMR mais elevados do que os doentes que faleceram. A diferença sugere que um LMR mais alto pode estar associado a melhor prognóstico.

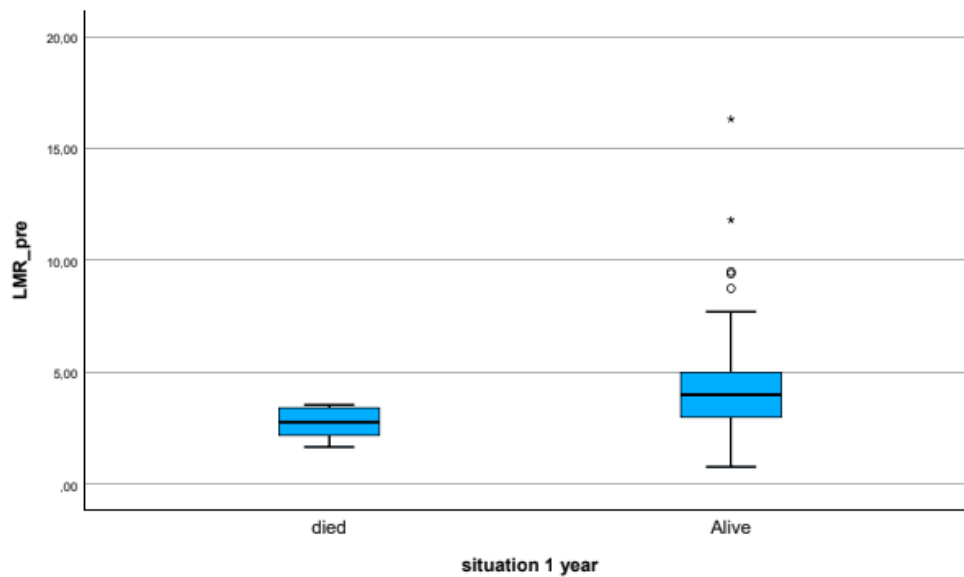


Figura 2.: Avaliação dos níveis de LMR pré-diagnóstico ao final de um ano de tratamento.

3.5.1. PLR e Sobrevida

Na análise do PLR pré-tratamento, observou-se que os doentes que faleceram ao fim de um ano apresentaram valores medianos superiores em comparação com os doentes sobreviventes. O grupo de doentes falecidos apresentou uma mediana de PLR em torno de 170 a 180, com valores distribuídos maioritariamente entre 120 e 250 e máximos próximos de 350. O grupo dos sobreviventes apresentou uma mediana próxima de 120 a 130, com valores concentrados entre 100 e 160, embora com alguns *outliers* superiores a 300, atingindo valores próximos de 500. Nesta amostra de doentes com carcinoma da mama triplo negativo, valores mais elevados de PLR pré-tratamento ocorrem mais frequentemente em doentes que faleceram ao fim de um ano, enquanto valores mais baixos são mais frequentes entre os sobreviventes.

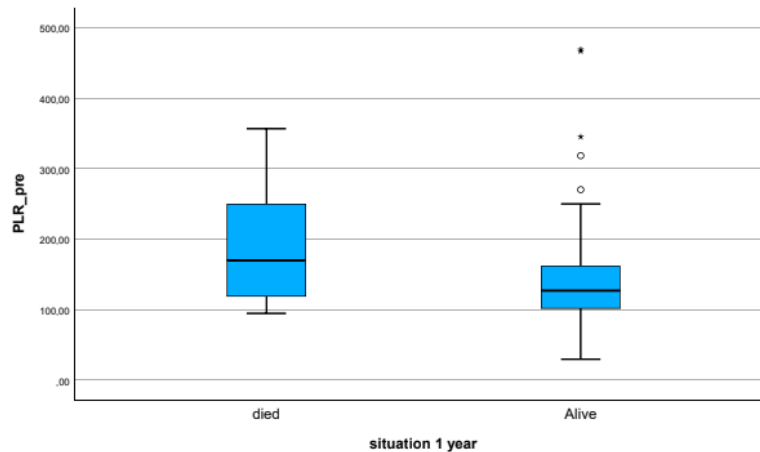


Figura 3.: Avaliação dos níveis de PLR pré-diagnóstico ao final de um ano de tratamento.

3.6. Associação entre os ratios NLR, LMR e PLR com a resposta à terapêutica

Foram avaliadas as associações entre os índices inflamatórios (NLR, LMR e PLR) em diferentes momentos (pré-tratamento, 6 meses, 12 e 24 meses após o primeiro tratamento), e a resposta ao tratamento (tabela 5). Nenhuma destas razões (NLR, LMR ou PLR) mostrou associação estatisticamente significativa com a resposta ao tratamento. No entanto, no momento pré-tratamento, 68,8% dos respondedores e 71,2% dos não respondedores tinham NLR <2,6 e aos 12 meses, o NLR, apresentou uma tendência marginal ($p=0,088$) para valores mais baixos nos doentes respondedores. Relativamente ao LMR, não houve diferenças estatisticamente significativas em nenhum momento, embora aos 24 meses tenha mostrado uma tendência para valores mais altos ($LMR \geq 3,4$) nos respondedores (43,2% vs 26,1%), contudo sem significância ($p=0,180$). O PLR não demonstrou qualquer padrão relevante em relação à resposta à terapêutica, em nenhum momento do seguimento.



Tabela 5 – Relação entre NLR, LMR e PLR com a resposta à terapia.

		Não Respondedores	Respondedores	P
NLR Pré	<2,6	47(71,2%)	22(68,8%)	0,802
	=>2,6	19(28,8%)	10(31,3%)	
NLR 6 meses	<2,6	28(62,2%)	17(37,8%)	0,464
	=>2,6	34(69,4%)	15(30,6%)	
NLR 12 meses	<2,6	32(58,2%)	23(41,8%)	0,088
	=>2,6	23(76,7%)	7(23,3%)	
NLR 24 meses	<2,6	29(61,7%)	18(38,3%)	0,751
	=>2,6	9(69,2%)	4(30,8%)	
LMR Pré	<3,4	20(62,5%)	12(37,5%)	0,476
	=>3,4	46(69,7%)	20(30,3%)	
LMR 6 meses	<3,4	47(68,1%)	22(31,9%)	0,463
	=>3,4	15(60,0%)	10(40,0%)	
LMR 12 meses	<3,4	36(64,3%)	20(35,7%)	0,910
	=>3,4	19(65,5%)	10(34,5%)	
LMR 24 meses	<3,4	17(73,9%)	6(26,1%)	0,180
	=>3,4	21(56,8%)	16(43,2%)	
PLR Pré	<325	63(67,0%)	31(33,0%)	1,00
	>325	3(75,0%)	1(25,0%)	
PLR 6 meses	<325	50(64,1%)	28(35,9%)	0,402
	>325	12(75,0%)	4(25,0%)	
PLR 12 meses	<325	51(63,0%)	30(37,0%)	0,292
	>325	4(100,0%)	0(0,0%)	
PLR 24 meses	<325	37(62,7%)	22(37,3%)	1,00
	>325	1(100,0%)	0(0,0%)	



4. Discussão

Vários estudos sugerem uma forte ligação entre inflamação e cancro, sendo que os diferentes valores das células inflamatórias periféricas no momento do diagnóstico, incluindo neutrófilos, linfócitos e monócitos, têm sido significativamente associados ao prognóstico em diferentes tipos de cancro (63).

Na presente análise, avaliou-se a associação de três índices inflamatórios derivados do hemograma – LMR, PLR e NLR – com várias características clinicopatológicas em diferentes momentos do seguimento. Os resultados mostraram diferenças relevantes entre estes índices, sendo o NLR e o LMR mais consistentes do que o PLR.

O NLR tem sido amplamente estudado como marcador prognóstico em tumores sólidos, incluindo o TNBC. Valores elevados de NLR refletem um predomínio da resposta inflamatória pró-tumoral, mediada pelos neutrófilos, e uma diminuição da atividade imunitária antitumoral, associada aos linfócitos. Neste estudo, o NLR foi o marcador que apresentou associações mais consistentes. Aquando do diagnóstico, valores elevados de NLR ($\geq 2,6$) correlacionaram-se significativamente com maior tamanho tumoral ($p < 0,001$), presença de metástases ($p = 0,023$) e estágio mais avançado ($p < 0,001$). Aos 12 meses manteve-se a associação significativa com o tamanho tumoral ($p = 0,048$), e aos 24 meses com a invasão ganglionar ($p = 0,026$). Essas associações tendem a diminuir com o tempo, possivelmente devido ao efeito das intervenções terapêuticas e à heterogeneidade da evolução da doença. Kosuga *et al.* relataram a associação entre elevados níveis de NLR no sangue periférico e metástases nos gânglios linfáticos no cancro gástrico (64). Tao *et al.* relataram achados semelhantes no carcinoma ductal pancreático (65). Xu *et al.* também relataram que o cancro da tiroide com elevados valores de NLR no sangue periférico, apresentava maior risco de invasão ganglionar e metastização à distância (66).

O NLR pode ser considerado um biomarcador de prognóstico precoce, especialmente antes do tratamento. Não foram encontradas associações estatísticas relevantes entre o NLR e os tipos de tratamento utilizados, o que pode refletir tanto a eficácia das terapias em modular a resposta inflamatória quanto o tamanho limitado de alguns subgrupos. Embora não tenham sido encontradas associações significativas com a resposta ao tratamento, observou-se uma tendência para valores de NLR mais baixos aos 12 meses entre os respondedores ($p = 0,088$), o que vai ao encontro da literatura, ainda que de forma não conclusiva, tal poderá dever-se ao tamanho limitado da amostra e ao seguimento relativamente curto. Estes achados reforçam a utilidade clínica do NLR como biomarcador de agressividade tumoral e potencial prognóstico. Estudos prévios têm mostrado resultados semelhantes, em que valores elevados de NLR associam-se a pior prognóstico, maior risco de recorrência, menor



sobrevivência global e pior resposta ao tratamento em doentes com carcinoma da mama (67,68), refletindo um estado inflamatório sistémico desfavorável e supressão da imunidade antitumoral (60,68). Biologicamente, a neutrofilia reflete inflamação sistémica pró-tumoral, enquanto a linfopenia traduz imunossupressão e menor vigilância imunitária. A diversidade obtida em alguns estudos reflete a ausência de padronização do cut-off para definir "NLR elevado". Estudos reportam valores de referência variados (por exemplo entre 1.9–5.0), com medianas frequentemente entre 2.5–3.0. Esta heterogeneidade explica, em parte, a variabilidade dos resultados e dificulta a concordância dos estudos (69).

O LMR tem sido descrito como um marcador prognóstico independente em vários tumores sólidos, incluindo o carcinoma da mama, onde valores baixos se relacionam com pior sobrevivência global e sobrevivência livre de doença. No nosso estudo, o LMR mostrou-se significativamente associado ao tamanho tumoral ($p=0,032$) e ao estadiamento clínico ($p=0,012$) no momento do diagnóstico, bem como ao estadiamento aos 6 meses ($p=0,014$). Observou-se ainda uma tendência para maior utilização de imunoterapia nos doentes com valores baixos de LMR ($<3,4$) aos 12 meses ($p=0,051$). Estes achados sugerem que um LMR reduzido está associado a doença mais avançada e potencial necessidade de terapêuticas adicionais. Na resposta à terapêutica, não se verificou associação estatisticamente significativa em nenhum momento, mas identificou-se uma tendência para valores mais altos de LMR aos 24 meses nos respondedores (43,2% vs 26,1%), sugerindo possível relevância clínica que não atingiu significância estatística, possivelmente devido ao reduzido tamanho amostral. Tal como reportado por *Ni et al., 2014*, o nosso estudo confirma que o LMR pode refletir o equilíbrio entre resposta imunitária antitumoral (linfócitos) e atividade pró-tumoral (monócitos/macrófagos associados ao tumor) (63).

A razão plaqueta-linfócito, tem emergido como um marcador inflamatório e imunológico no contexto neoplásico. Tal como a NLR, a PLR reflete o equilíbrio entre mecanismos pró-tumorais e anti-tumorais no microambiente tumoral. No nosso estudo, o PLR apenas mostrou associação significativa com o tipo de quimioterapia aos 6 meses ($p=0,038$), em que doentes com PLR <325 receberam mais frequentemente quimioterapia neoadjuvante. Contudo, não se observaram diferenças nos restantes momentos de seguimento. Estudos demonstram que níveis elevados de PLR estão associados a pior prognóstico em vários tipos de cancro, incluindo carcinoma da mama, pulmão, cólon, fígado, ovário e esófago (70,71). Numa meta-análise, valores elevados de PLR correlacionam-se de forma consistente com redução da sobrevivência global, sobrevivência livre de progressão e maior risco de recorrência (72). No caso particular do carcinoma da mama, incluindo o subtipo triplo-negativo, PLR elevado tem sido identificado como marcador independente de mau prognóstico, estando associado a maior



agressividade tumoral e menor resposta terapêutica (73). Apesar destas evidências, o nosso estudo não evidenciou de forma significativa esta associação, pelo que a discrepância pode dever-se ao baixo número de doentes no grupo PLR elevado na nossa amostra, o que limita a robustez estatística e pode explicar a ausência de significância. Os nossos resultados reforçam a ideia de que o seu papel isolado é limitado e talvez deva ser considerado apenas em combinação com outros índices inflamatórios.

No que respeita à associação entre o NLR e a resposta terapêutica nestas doentes TNBC, e apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, valores elevados de NLR antes do início da terapia deveriam estar associados a respostas menos favoráveis à quimioterapia, menor probabilidade de atingir resposta patológica completa e pior sobrevida global (74). Acredita-se que um aumento relativo de neutrófilos reflita um estado inflamatório protumoral, enquanto uma diminuição relativa de linfócitos indica imunossupressão, diminuindo a capacidade de combater células tumorais e de responder eficazmente ao tratamento.

Relativamente ao LMR, e com base no que está descrito na literatura, valores elevados de LMR têm sido correlacionados com maior probabilidade de resposta favorável à quimioterapia (75) e melhor prognóstico, sugerindo que doentes TNBC com perfil imunitário mais robusto poderiam apresentar maior sensibilidade aos regimes terapêuticos convencionais. Contudo, no nosso estudo os resultados não foram estatisticamente significativos.

No que respeita ao PLR, estudos indicam que valores elevados de PLR estão frequentemente relacionados a resistência terapêutica, menor taxa de resposta patológica completa e menor sobrevida (76), reforçando a ideia de que o estado inflamatório sistémico influencia a eficácia do tratamento. Apesar da ausência de resultados estatisticamente significativos neste estudo relativamente ao PLR, este poderá ser um potencial biomarcador de resposta à terapêutica.

É importante reconhecer algumas limitações como o número reduzido de doentes em alguns subgrupos, que pode ter limitado a significância estatística, a heterogeneidade da população estudada, o facto de os índices inflamatórios serem variáveis dinâmicas, influenciadas não apenas pelo tumor, mas também por outras condições clínicas não controladas (infeções, inflamações crónicas, terapêuticas concomitantes) e tratar-se de um estudo retrospectivo, dificultando o estabelecimento de relações causais.



5. Conclusão

Os resultados sugerem que o NLR mostrou ser o marcador mais consistente, associado não apenas ao estadiamento tumoral e tamanho do tumor, mas também à presença de metástases, sugerindo o NLR pode ser usado como marcador prognóstico complementar para estratificar risco em TNBC (auxilia a identificação de doentes com maior risco de recidiva/mortalidade), particularmente quando integrado com outros marcadores clínico-patológicos e imunológicos (como por exemplo TILs, estágio tumoral). O LMR tem relevância principalmente no diagnóstico e nos primeiros meses de seguimento, associando-se à doença mais avançada e à eventual necessidade de imunoterapia. O PLR teve um papel limitado, com associação restrita à modalidade de quimioterapia aos 6 meses, não se confirmando como um marcador prognóstico robusto nesta amostra. Estes achados reforçam a importância dos índices inflamatórios simples, de baixo custo e facilmente obtidos, como potenciais biomarcadores prognósticos complementares na prática clínica. Tanto o LMR como o NLR podem fornecer informação adicional sobre a agressividade tumoral e ajudar na estratificação do risco, especialmente no momento do diagnóstico. A combinação do NLR, LMR e PLR com outros biomarcadores, como a expressão de TILs e a análise molecular do tumor, pode aumentar a precisão diagnóstica e prognóstica. A utilização de modelos preditivos que integrem esses dados pode auxiliar na estratificação de risco e na decisão terapêutica, especialmente em pacientes com TNBC, que apresentam heterogeneidade clínica significativa.



Referências Bibliográficas

1. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. Vol. 22, Breast Cancer Research. BioMed Central Ltd; 2020.
2. Bawaneh A, Wilson AS, Levi N, Howard-McNatt MM, Chiba A, Soto-Pantoja DR, et al. Intestinal Microbiota Influence Doxorubicin Responsiveness in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Oct 1;14(19).
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 May;74(3):229–63.
4. www.ligacontracancro.pt.
5. Fernandes I, Cortes P. Manual de oncologia SPO : abordagem e tratamento do cancro da mama - 1a ed. - [S.l.] : Sociedade Portuguesa de Oncologia. 2020.
6. Pinto AC, André S, Ferreira AR, Sousa B, Pulido C, Loewenthal CS, et al. 100 Perguntas chave no CANCRO DA MAMA. 2015.
7. Sawaki M, Shien T, Iwata H. TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). Vol. 49, *Japanese Journal of Clinical Oncology*. Oxford University Press; 2019. p. 228–31.
8. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
9. Devoy C, Flores Bueso Y, Tangney M. Understanding and harnessing triple-negative breast cancer-related microbiota in oncology. *Frontiers in Oncology*. 2022.
10. Zhang J, Xia Y, Sun J. Breast and gut microbiome in health and cancer. Vol. 8, *Genes and Diseases*. Chongqing University; 2021. p. 581–9.
11. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, De Azambuja E, et al. Luminal B breast cancer: Molecular characterization, clinical management, and future perspectives. Vol. 32, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2014. p. 2794–803.
12. Raj-Kumar PK, Liu J, Hooke JA, Kovatich AJ, Kvecher L, Shriver CD, et al. PCA-PAM50 improves consistency between breast cancer intrinsic and clinical subtyping reclassifying a subset of luminal A tumors as luminal B. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).



13. Elghazaly H, Rugo HS, Azim HA, Swain SM, Arun B, Aapro M, et al. Breast-gynaecological & immuno-oncology international cancer conference (Bgicc) consensus and recommendations for the management of triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 May 1;13(9).
14. Derakhshan F, Reis-Filho JS. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. Vol. 17, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annual Reviews Inc.; 2021. p. 181–204.
15. Bianchini G, De Angelis C, Licata L, Gianni L. Treatment landscape of triple-negative breast cancer – expanded options, evolving needs. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022 Feb 9;19(2):91–113.
16. Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR. Features of triple-negative breast cancer Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine (United States)*. 2016;95(35).
17. Howard FM, Olopade OI. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer. *The Cancer Journal*. 2021 Jan;27(1):8–16.
18. Ensenyat-Mendez M, Llinàs-Arias P, Orozco JIJ, Íñiguez-Muñoz S, Salomon MP, Sesé B, et al. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. *Front Oncol*. 2021 Jun 16;11.
19. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Jul 1;121(7):2750–67.
20. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE, Yu KD, Jin X, Hu X, et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2016 Dec 15;18(1):33.
21. Lee YM, Oh MH, Go JH, Han K, Choi SY. Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes Genomics*. 2020 Dec 3;42(12):1381–7.
22. Ahn SG, Kim SJ, Kim C, Jeong J. Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer. *J Breast Cancer*. 2016;19(3):223.
23. Kim S, Moon BI, Lim W, Park S, Cho MS, Sung SH. Feasibility of Classification of Triple Negative Breast Cancer by Immunohistochemical Surrogate Markers. *Clin Breast Cancer*. 2018 Oct;18(5):e1123–32.
24. Ding YC, Steele L, Warden C, Wilczynski S, Mortimer J, Yuan Y, et al. Molecular subtypes of triple-negative breast cancer in women of different race and ethnicity. *Oncotarget*. 2019 Jan 4;10(2):198–208.



25. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*. 2011 Nov;64(11):937–46.
26. Zhao S, Zuo WJ, Shao ZM, Jiang YZ. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. *Ann Transl Med*. 2020 Apr;8(7):499.
27. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2019 Aug;30(8):1194–220.
28. Korde LA, Somerfield MR, Carey LA, Crews JR, Denduluri N, Hwang ES, et al. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2021 May 1;39(13):1485–505.
29. Korde LA, Somerfield MR, Hershman DL. Use of Immune Checkpoint Inhibitor Pembrolizumab in the Treatment of High-Risk, Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer: ASCO Guideline Rapid Recommendation Update. *Journal of Clinical Oncology*. 2022 May 20;40(15):1696–8.
30. Clough KB, Ihrai T, Oden S, Kaufman G, Massey E, Nos C. Oncoplastic surgery for breast cancer based on tumour location and a quadrant-per-quadrant atlas. *British Journal of Surgery*. 2012 Sep 7;99(10):1389–95.
31. Morrow M, Van Zee KJ, Solin LJ, Houssami N, Chavez-MacGregor M, Harris JR, et al. Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology–American Society of Clinical Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Ductal Carcinoma in Situ. *Pract Radiat Oncol*. 2016 Sep;6(5):287–95.
32. Goodwin A, Parker S, Gherzi D, Wilcken N. Post-operative radiotherapy for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013 Nov 21;2013(11).
33. Kishan AU, McCloskey SA. Postmastectomy radiation therapy after neoadjuvant chemotherapy: review and interpretation of available data. *Ther Adv Med Oncol*. 2016 Jan 22;8(1):85–97.
34. Gennari A, André F, Barrios CH, Cortés J, de Azambuja E, DeMichele A, et al. ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2021 Dec;32(12):1475–95.
35. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec;420(6917):860–7.
36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.



37. Nishida A, Andoh A. The Role of Inflammation in Cancer: Mechanisms of Tumor Initiation, Progression, and Metastasis. *Cells*. 2025 Mar 25;14(7):488.
38. Tripathi S, Sharma Y, Kumar D. Unveiling the link between chronic inflammation and cancer. *Metabol Open*. 2025 Mar;25:100347.
39. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436–44.
40. Mesquita Júnior D, Antônio Pereira Araújo J, Tiekoo Takao Catelan T, Wagner Silva de Souza A, de Melo Cruvinel W, Eduardo Coelho Andrade L, et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário-Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. Vol. 50, *Rev Bras Reumatol*. 2010.
41. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. 2004. p. 11–22.
42. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010 Feb;125(2 SUPPL. 2).
43. Cruvinel W de M, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS de, Silva NP da, et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. 2010.
44. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Vol. 331, *Science*. 2011. p. 44–9.
45. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion [Internet]. Available from: www.sciencemag.org
46. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011 Apr 23;29:235–71.
47. Li W, Ma G, Deng Y, Chen W, Liu Z, Chen F, et al. Systemic Immune-Inflammation Index Is a Prognostic Factor for Breast Cancer Patients After Curative Resection. *Front Oncol*. 2021 Dec 1;11.
48. Liu J, Shi Z, Bai Y, Liu L, Cheng K. Prognostic significance of systemic immune-inflammation index in triple-negative breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2019;11:4471–80.
49. Du J, Liu J, Zhang X, Chen X, Yu R, Gu D, et al. Pre-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts survival in patients with laryngeal cancer. *Oncol Lett*. 2018 Feb;15(2):1664–72.
50. Huang SH, Waldron JN, Milosevic M, Shen X, Ringash J, Su J, et al. Prognostic value of pretreatment circulating neutrophils, monocytes, and lymphocytes in oropharyngeal cancer stratified by human papillomavirus status. *Cancer*. 2015 Feb 15;121(4):545–55.



51. Zhang X, Zhang W, Yuan X, Fu M, Qian H, Xu W. Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review). *Int J Oncol*. 2016 Sep;49(3):857–67.
52. Austermann J, Roth J, Barczyk-Kahlert K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*. 2022 Jun 20;11(12):1979.
53. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol*. 2019 Jul 25;106(2):309–22.
54. Wen J, Ye F, Huang X, Li S, Yang L, Xiao X, et al. Prognostic Significance of Preoperative Circulating Monocyte Count in Patients With Breast Cancer: Based on a Large Cohort Study. *Medicine*. 2015 Dec;94(49):e2266.
55. BAMBACE NM, HOLMES CE. The platelet contribution to cancer progression. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011 Feb;9(2):237–49.
56. Zhang X, Lv Z, Yu H, Zhu J. The clinicopathological and prognostic role of thrombocytosis in patients with cancer: A meta-analysis. *Oncol Lett*. 2017 Jun;13(6):5002–8.
57. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res*. 2018 Jan 19;122(2):337–51.
58. Zhang Z, Lin Q, Chen Y, Su C, Lin W, Wei D, et al. Prognostic Evaluation of Metastasis-Related Lymphocyte/Monocyte Ratio in Stage I –III Breast Cancer Receiving Chemotherapy. *Front Oncol*. 2022 Mar 24;11.
59. Shimizu T, Taniguchi K, Asakuma M, Tomioka A, Inoue Y, Komeda K, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio and prognostic nutritional index predict poor prognosis in patients on chemotherapy for unresectable pancreatic cancer. *Anticancer Res*. 2019 Apr 1;39(4):2169–76.
60. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2014 Jun;106(6).
61. Li C, Yu X, Han X, Lian C, Wang Z, Shao S, et al. Innate immune cells in tumor microenvironment: A new frontier in cancer immunotherapy. *iScience*. 2024 Sep;27(9):110750.
62. Ham S, Lima LG, Lek E, Möller A. The Impact of the Cancer Microenvironment on Macrophage Phenotypes. *Front Immunol*. 2020;11:1308.
63. Ni XJ, Zhang XL, Ou-Yang QW, Qian GW, Wang L, Chen S, et al. An Elevated Peripheral Blood Lymphocyte-to-Monocyte Ratio Predicts Favorable Response and Prognosis in Locally Advanced Breast Cancer following Neoadjuvant Chemotherapy. *PLoS One*. 2014 Nov 5;9(11):e111886.



64. Kosuga T, Konishi T, Kubota T, Shoda K, Konishi H, Shiozaki A, et al. Clinical significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictor of lymph node metastasis in gastric cancer. *BMC Cancer*. 2019 Dec 5;19(1):1187.
65. Tao L, Zhang L, Peng Y, Tao M, Li G, Xiu D, et al. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio and tumor-related factors to predict lymph node metastasis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *Oncotarget*. 2016 Nov 8;7(45):74314–24.
66. Xu N, Jian Y, Wang Y, Tian W. Evaluation of neutrophil-to-lymphocyte ratio and calcitonin concentration for predicting lymph node metastasis and distant metastasis in patients with medullary thyroid cancer. *Mol Clin Oncol*. 2018 Sep 27;
67. Azab B, Bhatt VR, Phookan J, Murukutla S, Kohn N, Terjanian T, et al. Usefulness of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Predicting Short- and Long-Term Mortality in Breast Cancer Patients. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jan 3;19(1):217–24.
68. Ethier JL, Desautels DN, Templeton AJ, Oza A, Amir E, Lheureux S. Is the neutrophil-to-lymphocyte ratio prognostic of survival outcomes in gynecologic cancers? A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2017 Jun;145(3):584–94.
69. Ethier JL, Desautels D, Templeton A, Shah PS, Amir E. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Research*. 2017 Dec 5;19(1):2.
70. Zhou K, Cao J, Lin H, Liang L, Shen Z, Wang L, et al. Prognostic role of the platelet to lymphocyte ratio (PLR) in the clinical outcomes of patients with advanced lung cancer receiving immunotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2022 Aug 22;12.
71. Zhu Y, Si W, Sun Q, Qin B, Zhao W, Yang J. Platelet-lymphocyte ratio acts as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 3;8(1):1023–30.
72. Qi X, Chen J, Wei S, Ni J, Song L, Jin C, et al. Prognostic significance of platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *BMJ Open*. 2023 Nov 23;13(11):e074874.
73. Krenn-Pilko S, Langsenlehner U, Thurner EM, Stojakovic T, Pichler M, Gerger A, et al. The elevated preoperative platelet-to-lymphocyte ratio predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Br J Cancer*. 2014 May 27;110(10):2524–30.
74. Liu Y, He M, Wang C, Zhang X, Cai S. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio for patients with triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Medicine*. 2022 Jul 15;101(28):e29887.



75. Ma Y, Zhang J, Chen X. Lymphocyte-to-Monocyte Ratio is Associated with the Poor Prognosis of Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancer Manag Res.* 2021 Feb;Volume 13:1571–80.
76. Zhao Z, Xu H, Ma B, Dong C. Prognostic value of platelet to lymphocyte ratio (PLR) in breast cancer patients receiving neoadjuvant therapy: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol.* 2025 Aug 20;16.

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA