



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MÁRCIA CRISTINA COLARES RÉGIS DE ARAÚJO**

**A EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR N-METIL-D-  
ASPARTATO (NMDA) E DA INDOLAMINA-2,3-DIOXIGENASE (IDO) NO  
CÂNCER DE MAMA DUCTAL**

**FORTALEZA/CE**

**2019**

**MÁRCIA CRISTINA COLARES RÉGIS DE ARAÚJO**

**A EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR N-METIL-D-  
ASPARTATO (NMDA) E DA INDOLAMINA-2,3-DIOXIGENASE (IDO) NO  
CÂNCER DE MAMA DUCTAL**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.*

*Áreas de concentração: Farmacologia; Oncologia.*

*Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes.*

**FORTALEZA/CE**

**2019**

**MÁRCIA CRISTINA COLARES RÉGIS DE ARAÚJO**

**A EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR N-METIL-D-  
ASPARTATO (NMDA) E DA INDOLAMINA-2,3-DIOXIGENASE (IDO) NO  
CÂNCER DE MAMA DUCTAL**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Farmacologia, da Faculdade  
de Medicina da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para obtenção do Título de  
Mestre em Farmacologia.*

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes  
Orientadora  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva  
Universidade Christus

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C649e Colares Régis de Araújo, Márcia Cristina.  
Expressão da subunidade NR2B do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e da  
indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) no câncer de mama ductal / Márcia Cristina Colares Régis  
de Araújo. – 2019.  
67 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes.  
Coorientação: Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar.

1. Câncer de mama. 2. Receptor NMDA. 3. IDO. I. Título.

CDD 615.1

---

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de estudar e trabalhar com pessoas que desejam deixar um legado para que as gerações futuras.

Ao meu esposo, Herberth Régis, companheiro de todas as horas e pelo incentivo contínuo ao meu crescimento e acreditar em mim, às funções de médica, pesquisadora e esposa.

Aos meus pais, Eudice e Joilza, pelo carinho e cuidados desde a mais tenra infância, e pelos ensinamentos nos caminhos da vida e da fé.

À minha orientadora, Professora Elisabete Amaral de Moraes, a quem não tenho palavras para retribuir todo o aprendizado e apoio à pesquisa clínica.

À minha coorientadora, Professora Danielle Macedo Gaspar, pelo incentivo a multiplicar o conhecimento e as palavras iluminadas quando tudo ficava mais difícil.

Ao Dr. Victor Hugo de Medeiros Alencar e toda a equipe da Oncoclinic, com apoio ao crescimento da pesquisa na oncologia mamária.

À Professora Ana Paula de Negreiros e ao Pesquisador Paulo Goberlânio, do Laboratório de Histologia, por acreditar e compartilhar a busca de conhecimentos em novas áreas da oncologia.

À técnica do Laboratório, Débora, e a aluna da iniciação científica da Odontologia, Milena, e a todos os colegas do Laboratório de Histologia, pela colaboração e apoio na pesquisa clínica.

À Unifac, Unidade de Farmacologia Clínica, pelo apoio aos projetos e ajuda na idealização e construção desta pesquisa.

## EPÍGRAFE

“Grandes realizações não são feitas por impulso,  
mas por uma soma de pequenos detalhes.”

Vicent Van Gogh

## RESUMO

**A EXPRESSÃO DA SUBUNIDADE NR2B DO RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA) E DA INDOLAMINA-2,3-DIOXIGENASE (IDO) NO CÂNCER DE MAMA DUCTAL.** Márcia Cristina Colares Régis de Araújo. Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2019.

O câncer de mama constitui um grupo heterogêneo de tumores com apresentação clínica, sensibilidade às terapias, evolução e prognóstico distintos, sendo crescente o interesse no estudo de marcadores moleculares e suas vias de sinalização. O receptor do glutamato ionotrópico N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e a enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), esta última sendo ativada por mecanismos pró-inflamatórios e relacionado com o metabolismo do triptofano pela via das quinureninas, têm sido implicados na proliferação tumoral. O receptor NMDA é formado pela composição de sete subunidades diferentes. A subunidade NMDA NR1 é constitutiva estando presente em todos os receptores NMDA, com variação nas outras unidades do receptor. O bloqueio específico da subunidade NMDA NR2 apresenta menos efeitos colaterais, sendo demonstrado em estudo pré-clínico a capacidade de parar o crescimento de linhagens celulares do câncer de mama. **Objetivos:** Verificar a imunexpressão da subunidade NR2B do receptor NMDA e da enzima indolamina-2,3-dioxigenase em amostras de câncer de mama ductal local e metastático. **Método:** Foi realizada a avaliação pela imunohistoquímica, através da técnica estreptavidina-biotina, com anticorpos primários para subunidade NR2B do receptor NMDA e enzima IDO 1 em quinze amostras de tecido de câncer de mama. A escala de marcação definida com a estatística descritiva, sendo dividida em leve entre 25% a 50% de marcação por campo; moderada entre 50% a 75% de marcação por campo; intensa acima de 75% de intensidade de marcação por campo. Foram consideradas as marcações em núcleo e citoplasma. **Resultados:** Todas as amostras apresentaram imunexpressão positiva para NMDA NR2 e para a IDO. Sete amostras apresentaram marcação moderada para NMDA NR2 e nove amostras apresentaram marcação intensa para IDO. Sete amostras com imunomarcação fraca para NMDA NR2 apresentaram estadiamento I ou II. Nove pacientes tinha mais de cinquenta anos de idade ao diagnóstico, sendo quatro com imunomarcação fraca e cinco com marcação moderada para NMDA NR2. Doze amostras tinham receptores hormonais positivos, sendo sete com imunomarcação moderada para NMDA NR2. Oito amostras tinham HER2 positivo, tendo cinco imunomarcação moderada para NMDA NR2. Duas amostras triplamente negativo apresentaram marcação fraca para NMDA NR2. Das quinze amostras, cinco foram de pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante, três amostras apresentaram imunomarcação fraca e duas apresentaram marcação moderada para NMDA NR2. **Conclusão:** A presente pesquisa evidenciou positividade para imunexpressão do NMDA e da IDO 1 em amostras de pacientes em tratamento de câncer de mama, sendo necessários estudos clínicos na tentativa de melhor caracterizar o receptor NMDA como possível marcador molecular no câncer de mama com o objetivo futuro de servir como alvo terapêutico ou prognóstico.

Descritores: câncer de mama, receptor NMDA, IDO.

## ABSTRACT

**THE EXPRESSION OF THE NR2B SUBUNITY OF THE N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTOR (NMDA) AND INDOLAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO) IN DUCTAL BREAST CANCER.** Márcia Cristina Colares Régis de Araújo. Adviser: Dr Maria Elisabete Amaral de Moraes. Dissertation presented for the Title of Master's Degree in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Fortaleza, 2019.

The Breast cancer is a heterogeneous group of tumors with different clinical presentation, sensitivity to therapies, development and prognosis, being growing interest in the study of molecular markers and their signaling pathways. Inotropic glutamate N-Metil-D-Aspartate receptor (NMDA) and indoleamine-2,3-dioxygenase enzyme (IDO), this last being activated by pro-inflammatory mechanisms and related to the metabolism of tryptophan via kynurenine pathway, have being implicated in tumor proliferation. NMDA receptor is formed by seven different subunits. NMDA NR1 subunit is constitutive being present in all NMDA receptors, with variation in other receptor units. Specific blocking NMDA NR2 subunit presents fewer undesirable effects, demonstrating, in pre-clinical study, the ability to stop the growth of breast cancer cell lines. **Objectives:** To check immunoexpression of NMDA receptor NR2B subunit and indoleamine-2,3-dioxygenase enzyme in samples of breast ductal cancer and metastatic site. **Method:** The evaluation was performed by immunohistochemistry, streptavidin-biotin technique through, with primary antibodies for NR2B subunit of the NMDA receptor and enzyme IDO 1 in 15 tissue samples from breast cancer. The marking scale set with the descriptive statistics, being divided into light between 25% to 50% markup per field; moderate between 50% to 75% markup per field; intense above 75% intensity of field marking. The markings were considered in nucleus and cytoplasm. **Results:** All samples showed positive immunoexpression for NMDA NR2 and IDO. Seven samples showed moderate markup for NMDA NR2 and nine samples showed intense markup for IDO1. Seven samples with weak immunolabeling for NMDA NR2 presented staging I or II. Nine patients were over 50 years of age at diagnosis, four with weak immunolabeling and five with moderate markup for NMDA NR2. Twelve samples had positive hormone receptors, among which seven with moderate immunolabeling for NMDA NR2. Eight samples had positive HER2, having five moderate immunolabeling for NMDA NR2. Two triple negative samples had low markup for NMDA NR2. Five patients underwent neoadjuvant chemotherapy, three samples after chemotherapy showed weak immunolabeling and two presented moderate NMDA NR2 labeling. **Conclusion:** The present study evidenced positivity for NMDA and IDO 1 immunoexpression in breast cancer patient samples, clinical studies are needed in an attempt to characterize better the NMDA receptor as a possible molecular marker in breast cancer for the future purpose as therapeutic target or prognosis.

Key-words: breast cancer, NMDA receptor, IDO.



## LISTA DE FIGURAS

Figuras 1A e 1B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 1.....	Pág. 36
Figuras 2A e 2B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 1 .....	Pág. 36
Figuras 3A e 3B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 2 .....	Pág. 37
Figuras 4A e 4B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 2 .....	Pág. 37
Figuras 5A e 5B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 3 .....	Pág. 38
Figuras 6A e 6B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 3 .....	Pág. 38
Figuras 7A e 7B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 4 .....	Pág. 39
Figuras 8A e 8B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 4 .....	Pág. 39
Figuras 9A e 9B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 5 .....	Pág. 40
Figuras 10A e 10B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 5...	Pág. 40
Figuras 11A e 11B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 6 .....	Pág. 41
Figuras 12A e 12B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 6..	Pág. 41
Figuras 13A e 13B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 7 .....	Pág. 42
Figuras 14A e 14B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 7 ..	Pág. 42
Figuras 15A e 15B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 8 .....	Pág. 43
Figuras 16A e 16B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 8...	Pág. 43
Figuras 17A e 17B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 9 .....	Pág. 44
Figuras 18A e 18B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 9...	Pág. 44
Figuras 19A e 19B . Imunomarcção positiva para IDO Amostra 10 .....	Pág. 45
Figuras 20A e 20B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 10.	Pág. 45
Figuras 21A e 21B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 11 .....	Pág. 46
Figuras 22A e 22B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 11	Pág. 46
Figuras 23A e 23B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 12 .....	Pág. 47
Figuras 24A e 24B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 12.	Pág. 47
Figuras 25A e 25B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 13 .....	Pág. 48
Figuras 26A e 26B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 13	Pág. 48
Figuras 27A e 27B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 14 .....	Pág. 49
Figuras 28A e 28B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 14.	Pág. 49
Figuras 29A e 29B. Imunomarcção positiva para IDO Amostra 15.....	Pág. 50
Figuras 30A e 30B. Imunomarcção positiva para NMDA NR2B Amostra 15.	Pág. 50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tipos moleculares do câncer de mama.....	Pág. 14
Quadro 2. Subtipos moleculares do câncer de mama triplo negativo.....	Pág. 16
Quadro 3. Resultados .....	Pág. 35

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Imunomarcção de NMDA NR 2B x IDO.....	Pág. 51
Gráfico 2. Imunomarcção de NMDA NR 2B x Estadiamento.....	Pág. 51
Gráfico 3. Imunomarcção de NMDA NR 2B x Tamanho do tumor.....	Pág. 52
Gráfico 4. Imunomarcção de NMDA NR 2B x <i>Status</i> linfonodal.....	Pág. 52
Gráfico 5. Imunomarcção de NMDA NR 2B x Idade das pacientes.....	Pág. 53
Gráfico 6. Imunomarcção de NMDA NR 2B x Receptor hormonal.....	Pág. 53
Gráfico 7. Imunomarcção de NMDA NR 2B x HER2 .....	Pág. 54
Gráfico 8. Imunomarcção de NMDA NR 2B x Químio neoadjuvante...	Pág. 54

## LISTA DE ABREVIADURAS

1-MT = 1- metil- triptofano

AR = receptor de andrôgeno

CK5/6 = citoqueratina 5/6

DMT= dimetilriptamina

EGFR = receptor tipo 1 do fator de crescimento epidémico

HER2 = receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

IDO = indolamina-2,3-dioxigenase

mTOR = *mammalian target of rapamycin*

NK = *natural killer*

PARP = poly (ADP ribose) polymerase

PBS = phosphate buffered saline

RE = receptor de estrógeno

NMDA = receptor de N-Metil-D-Aspartato

MK-801 = dizocilpina

RP = receptor de progesterona

TDO = triptofano-2,3-dioxigenase

TIL = *tumor infiltrating lymphocytes*

TMA = *tissue microarrays*

TNBC = câncer de mama triplo negativo

TRY = triptamina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. O Câncer de Mama</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2. O Receptor N-Metil-D-Aspartato</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3. A Indolamina-2,3-dioxigenase</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4. Justificativa e Relevância</b> .....	<b>26</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1. Desenho do Estudo</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2. Aspectos Éticos</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3. Critérios de Inclusão</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4. Critérios de exclusão e retirada</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5. Material Biológico</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6. Imunohistoquímica e Análise dos Resultados</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7. Desfecho clínico</b> .....	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Câncer de Mama

O câncer de mama constitui um grupo heterogêneo de tumores, com variadas manifestações clínicas e morfológicas. Apresenta diferentes assinaturas genéticas e consequente alteração nas respostas terapêuticas (Geye, 2009). É o tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele não-melanoma, respondendo por cerca de vinte e cinco por cento dos casos novos a cada ano (INCA, 2018). O câncer de mama também acomete homens, porém é raro, representando apenas um por cento do total de casos da doença. Relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta idade sua incidência cresce progressivamente, especialmente após os 50 anos (Devita, 2011). Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países subdesenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento; com estabilização e tendência a declínio na última década em países altamente desenvolvidos (INCA, 2018).

No Brasil, para o biênio 2018-2019, são esperados 59.700 casos novos de câncer de mama por ano, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (74,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,2/100 mil), atrás apenas do câncer de colo uterino (INCA, 2018).

Nos últimos 40 anos, a sobrevida dos pacientes com câncer de mama vem aumentando nos países desenvolvidos, sendo cerca de 85% em cinco anos em estadiamentos iniciais, enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50 a 60% (INCA, 2018).

Os fatores prognósticos e preditivos no câncer de mama são classificados como clínicos, anatomopatológicos e biológicos. A idade e a condição hormonal são considerados fatores clínicos, e entre as características anatomopatológicas têm-se o tamanho do tumor, o tipo e o

grau histológico, presença ou não de invasão vascular, presença ou não de metástase em linfonodos locorregionais; e entre as características biológicas, observa-se a expressão do gene HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2*), receptores de progesterona e estrógeno (Devita, 2011). Utilizando-se de imunohistoquímica, pode-se traçar um perfil dos principais subtipos moleculares do câncer de mama através de biomarcadores para receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER 2, Ki 67, citoqueratina 5/6 (Bacchi et al., 2013) (Quadro 1).

Quadro 1. Tipos moleculares do câncer de mama (Bacchi et al., 2013).

<b>Subtipo molecular</b>	<b>Imunofenótipo</b>
<b>Luminal A</b>	RE+ e/ou RP+, HER2-, Ki 67<14%
<b>Luminal B</b>	RE+ e/ou RP+, HER2-, Ki 67≥14%
<b>Luminal B híbrido</b>	RE+ e/ou RP+, HER2+, qualquer Ki 67
<b>HER2</b>	RE-, RP-, HER2+, qualquer Ki 67
<b>Basal-símile</b>	RE-, RP-, HER2-,CK5/6 e/ou EGFR+, qualquer Ki 67
<b>Triplo-negativo</b>	RE-, RP-, HER2-, CK5/6-, EGFR-, qualquer Ki 67

RE = Receptor de estrógeno; RP= Receptor de progesterona; CK5/6= citoqueratina 5 e 6; EGFR= Receptor do fator de crescimento epidérmico; HER2 = *Human Epidermal Growth Factor*; (-) negativo; (+) positivo.

Os tumores classificados como luminal A expressam altos níveis de receptor de estrógeno, baixos níveis de proliferação celular e ausência de superexpressão do HER2 (Quadro 1). Esses tumores apresentam bom prognóstico, são tumores de baixo grau histológico, com cariótipo simples e baixos níveis de instabilidade genômica. O luminal B apresenta também positividade para receptores hormonais, elevados níveis dos genes de proliferação celular, podendo apresentar amplificação do HER2 (luminal B híbrido) (Sorlei, 2001).

O subtipo luminal B apresenta evolução clínica adversa quando comparado com o luminal A. Os tumores luminais B tendem a apresentar alto grau histológico, cariótipo complexo, altos índices de instabilidade genômica e amplificação gênica. Os tumores luminais podem ser tratados com hormonioterapia isoladamente ou associada à quimioterapia (Cheang, 2009).

O grupo dos tumores HER2 amplificado (15%) apresentam altos níveis de proliferação celular e mutação do P53, prognóstico adverso, a maioria com metástase linfonodal e altos níveis de instabilidade genômica. Esses tumores podem ser tratados com terapias-alvo (anticorpo monoclonal), antraciclina e taxanos. Em terapia neoadjuvante estão associados a maiores índices de remissão completa (Devita, 2011).

Os tumores basal-símiles (15%) expressam genes encontrados nas células mioepiteliais, incluindo citoqueratinas, p-caderina, caveolinas, nestina, CD109 e EGFR, que estão associados à mutação no gene *P53* e do *BRCA1* (Nielsen, 2004). Podem apresentar-se como triplo negativo, quando os receptores para estrógeno, progesterona e amplificação do *HER2* são negativos. Apresentam-se como carcinomas de alto grau histológico, com alto índice mitótico, zonas de necrose central, resposta linfocitária intensa e áreas de metaplasia (Badve, 2011). Tipos histológicos relacionados são carcinomas ductal infiltrativo de alto grau, metaplásico, carcinomas mioepiteliais, lobular pleomórfico e neuroendócrino. A maioria dos tumores triplo-negativos tem comportamento biológico agressivo, resposta precária a protocolos de tratamento e altos índices de metástases à distância (Bacchi et al., 2013).

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) representa cerca de dezessete por cento dos carcinomas mamários. Seu alto grau histológico, áreas de necrose central, células apoptóticas, tendem a ocorrer em mulheres mais jovens, atingem grandes volumes, maior risco de metástases viscerais, principalmente para pulmões e cérebro, com picos de recorrência e pior prognóstico entre os subtipos moleculares. O TNBC não é sinônimo de basal-símile, este subtipo molecular expressa genes encontrados nas células mioepiteliais. Estudos de expressão gênica identificaram subtipos

moleculares do TNBC, considerando a heterogeneidade desses tipos de tumores: basal-símile, mesenquimal, mesenquimal células-tronco símile e receptor de andrógeno luminal (Lehmann et al., 2011) (Quadro 2).

Quadro 2. Subtipos moleculares do câncer de mama triplo negativo (Bacchi et al., 2013).

<b>Subtipo molecular TNBC</b>	<b>Características</b>
<b>Basal-símile (B1)</b>	Maior proliferação celular
<b>Basal-símile (B2)</b>	Mutação BRCA 1 e 2
<b>Mesenquimal (M)</b>	Resposta imune enriquecida
<b>Mesenquimal células tronco-símile (MSL)</b>	Genes de angiogênese
<b>Receptor de andrógeno luminal (LAR)</b>	Sensível aos androgênios

Os subtipos basal-símile BL1 e BL2 expressam altos níveis de genes envolvidos na proliferação celular e de resposta ao dano no DNA, sugerindo melhores respostas a algumas terapias, como taxanos e radioterapia. Além disso, esse subtipo apresenta alta correlação com os tumores triplo negativos relacionados à mutação *BRCA1* e *BRCA2*, sugerindo uma característica importante desse grupo: a instabilidade genômica. Dessa forma, os inibidores da polimerase ADP ribose (PARP) e os agentes platinantes são opções promissoras nesse contexto (Lehmann et al., 2011). (Quadro 2).

O subtipo mesenquimal é enriquecido com assinatura de genes de resposta imune, não podendo-se excluir que o perfil de expressão gênica desse subtipo pode abranger, pelo menos em parte, componentes estromais de infiltração linfocitária (Lehmann et al., 2011).

Os subtipos mesenquimal e mesenquimal células tronco-símile dividem uma ontologia genética similar e envolvem genes de migração e angiogênese. Tumores de subtipo mesenquimal tem perfil gênico similar aos



de células mesenquimais e carcinoma metaplásico de mama (Lehmann et al., 2011).

O subtipo receptor de andrógeno luminal (LAR) foi prontamente subclassificado como uma assinatura gênica AR (*Androgen Receptor*). Sua prevalência chega a onze por cento dos tumores triplo negativos ou dois por cento de todos os carcinomas de mama, acomete pacientes mais idosas e tem como característica clínica uma longa sobrevida livre de recaída, com tendência a recidivas locais. Não se sabe sobre sua associação com as terapias de reposição hormonal. Essa linhagem celular é sensível a antiandrogênio, como a bicalutamida, em ensaios pré-clínicos (Lehmann et al., 2011).

Essa subdivisão deixa claro que os carcinomas de mama triplo negativos são um grupo heterogêneo de tumores com apresentação clínica, sensibilidade às terapias, evolução e prognóstico distintos, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias diferentes para seu ótimo manejo.

Pacientes portadores de tumores localmente avançado, ou seja, tumores acima de 5 cm, envolvimento linfonodal, acometimento da pele ou parede torácica e carcinoma inflamatório, são submetidos a tratamento quimioterápico neoadjuvante (anterior ao tratamento cirúrgico). O tratamento neoadjuvante oferece diversas vantagens teóricas quando comparada a terapia adjuvante: administração de medicações através do sistema vascular intacto; tratamento precoce da doença micrometastática; avaliação *in vivo* da resposta ao tratamento; oportunidade de investigar efeitos biológicos da quimioterapia e sua relação com parâmetros clínicos e biológicos importantes; redução do volume tumoral, permitindo tornar operáveis lesões inicialmente irressuscáveis (Van Der Hage et al., 2001).

O emprego da quimioterapia neoadjuvante em pacientes portadores de neoplasia localmente avançada determinam taxas de resposta objetivas da ordem de 49% a 93%. Pacientes portadores de tumores de alto grau, com elevada taxa de proliferação celular e receptores hormonais negativos, têm maior chance de alcançarem uma resposta patológica completa com o

emprego da quimioterapia neoadjuvante, mas apresentam elevado risco de recidiva da doença (Van Der Hage et al., 2001).

## 1.2. O Receptor NMDA

Os receptores são os elementos sensores do sistema de comunicações químicas que coordenam a função de todas as diferentes células do organismo. Os receptores do glutamato regulam a proliferação, a migração, o desenvolvimento e a sobrevivência de células progenitoras neurais (Stepulak et al., 2005). É amplamente conhecido o efeito excitatório do glutamato no sistema nervoso central, envolvido na cognição, memória, atenção, humor, dor crônica, processos básicos como atividade locomotora e a respiração (Gonda, 2012).

O receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) é um subtipo de receptor inotrópico do glutamato, embora sua maior presença seja no sistema nervoso central, foi identificado também em sítios periféricos somáticos e viscerais (Van Dongen, 2009; Gonda, 2012). Foram identificados sete subunidades de receptores NMDA (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A, GluN3B). Para ser funcional um receptor NMDA necessita de pelo menos uma subunidade GluN1, contendo o sítio de ligação para os agonistas (Lau et al., 2007). Os receptores NMDA localizados na fenda sináptica são formados por subunidades GLUN1 e GLUN2A, enquanto que os localizados em regiões extra-sinápticas são formados por subunidades GLUN1 e GLUN2B (Paoletti et al., 2013). A subunidade NR1 é essencial para a condução dos canais de cálcio, embora as subunidades NR2 e NR3 determinam propriedades eletrofisiológicas no receptor (Traynelis et al., 2010).

Os receptores NMDA são canais catiônicos permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e possuem locais de união à glicina e ao  $\text{Mg}^{2+}$ , e tem ação moduladora alostérica fisiológica. A união da glicina ao receptor promove normalidade à ação do glutamato, enquanto o  $\text{Mg}^{2+}$  atua como modulador negativo da ativação do receptor. A concentração exigida de glicina dependerá da composição das subunidades de receptores NMDA, sendo que a

concentração de glicina servirá como mecanismo regulador para algumas subunidades do receptor NMDA. Uma ativação excessiva dos receptor NMDA causada por um excesso de glutamato, leva a um aumento excessivo dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular causando morte celular por excitotoxicidade (Carreira, 1978).

Os agentes bloqueadores do receptor NMDA podem ser divididos em bloqueadores do canal iônico, compostos que atuam no sítio de ligação da glicina e aqueles que atuam no sítio de ligação do glutamato (Carreira, 1978).

O primeiro composto identificado como bloqueador do canal iônico do receptor NMDA foi a fenciclidina, sintetizada na década de 20 e patenteada na década de 50 como anestésico. Em modelos animais, atuava como estimulante em baixas doses e como antidepressivo em doses mais elevadas. Em 1965, seu desenvolvimento foi cancelado devido efeitos secundários intoleráveis em seres humanos como alucinações, delírios e desorientação (Carreira, 1978).

A hiperalgesia induzida por opióides pode ser reduzida com a cetamina, desenvolvida em 1965 como bloqueador iônico do receptor NMDA. Estudo avaliou a capacidade da cetamina em diminuir os escores da dor e o seu uso no resgate analgésico no período pós-operatório, além do seu papel na dor crônica (Susuki, 2009). A utilização da cetamina tem sido inviabilizada devido a quadros de alucinações e distúrbios motores (Niciu et al., 2014).

Na década de 80, foi sintetizado o composto MK-801 (dizocilpina) que atua de forma não competitiva no mesmo sítio de inibição que a fenciclidina, a cetamina (Wong, 1986). Observou-se que esses compostos exerciam efeitos indesejados intoleráveis, aceitando a hipótese que bloqueadores fracos do canal iônico poderiam ter potencial terapêutico. Pesquisadores avaliam o funcionamento do receptor NMDA no sistema nervoso central e as diversas formas de manifestações de doenças neurológicas. Postula-se que a esquizofrenia possa resultar de uma hipofunção dos receptores NMDA (Coyle et al., 2012).

A memantina, um antagonista oral ativo dos receptores NMDA, foi aprovada pela Agência Europeia de Medicamentos em 2002 e em 2003 pelo *Food and Drug Administration*, sendo comercializada para o tratamento da doença de Alzheimer moderada a severa (Parsons, 2007). Foi originalmente desenvolvida como um fármaco antiviral e representado como um inibidor da excitotoxicidade. Provavelmente, funcionaria através da inibição seletiva da ativação excessiva e patológica do receptor NMDA, preservando mais a ativação fisiológica (Collingridge, 2013).

A memantina e amantadina atuam como bloqueadores fracos de canal iônico. A amantadina foi aprovada para utilização em terapia combinada em pacientes com doença de Parkinson. O potencial terapêutico dos antagonistas do receptor glutamato ionotrópico também é avaliado na redução da lesão cerebral após acidentes vasculares cerebrais e no trauma craniano (Ory-Magne et al., 2014).

Os primeiros registros de antagonistas do receptor NMDA que atuam no sítio de ligação do glutamato sugeriram na década de 80. O composto CGS-19755 entrou em ensaios clínicos, mas teve que ser retirado devido efeitos secundários como alucinações e neurotoxicidade. O S-glutamato e CGS-19755 foram incapazes de discriminar entre diferentes subtipos de receptores NMDA (Grotta, 1995).

Os efeitos secundários do bloqueio do receptor NMDA tem promovido alterações neurológicas importantes. Nesse sentido tem-se desenvolvido antagonistas alostéricos e seletivos para receptor NMDA contendo a subunidade GluN2B, que parece contribuir para a excitotoxicidade (Stroebel, 2014). A subunidade GLUN1 é expressa virtualmente em todo o cérebro durante a fase de desenvolvimento, e também em células periféricas como fibroblastos. A subunidade GluN2B está tipicamente localizada no córtex e hipocampo do sistema nervoso central. É possível que os antagonistas seletivos dos receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B, que é altamente permeável ao  $Ca^{2+}$ , possam ser eficazes no tratamento da neurodegeneração. Compostos que inibiam receptor NMDA para subunidade GluN2B apresentam efeitos secundários mais toleráveis que bloqueadores do

canal iônico ou antagonistas competitivos do glutamato e glicina que afetam todos os tipos de receptor NMDA (Mony, 2009).

O glutamato regula a proliferação, a migração e a sobrevivência de células progenitoras e neurônios imaturos durante o desenvolvimento cerebral. O crescimento desordenado e a migração são características de células neoplásicas, o glutamato poderia ser um potencial fator de crescimento e desenvolvimento de tumores. A avaliação de espécies cirúrgicas evidenciou quantidades tóxicas do glutamato em gliomas (Takano, 2001). Estudo experimental evidenciou que tumores com altos níveis de glutamato são mais agressivos quando comparados com níveis moderados ou de células não secretoras (Takano, 2001). A elevada concentração de glutamato no espaço extracelular (100mM) de glioblastomas leva a morte de neurônios e promove o crescimento tumoral, estando relacionado aos casos de epilepsia nesses pacientes (De Groot, 2011).

Foi detectada a presença de glutamato no meio extracelular de células tumorais não derivadas do sistema nervoso central, como MDA-MB-231 (câncer de mama), B16F1 (melanoma em ratos) e MATLyLu (próstata em ratos) (Seidlitz, 2009). Os receptores NMDA foram identificados em tecidos não-neurais periféricos. Estudo em modelos animais mostrou que o antagonismo do receptor NMDA influencia as vias de controle e proliferação de células cancerosas e suprime o crescimento tumoral (Deutsch, 2014). A ativação do receptor NMDA afeta a atividade de sinalização pela proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*), limitando a duração da sinalização via ERK1/2. A desregulação da via mTOR é principalmente implicada na patogênese de doenças malignas e metástases, servindo como alvo quimioterápico (Deutsch, 2014).

O composto experimental dizocilpina (antagonista do receptor NMDA) inibe a via ERK 1/2 em células de carcinoma de pulmão. A dizocilpina induz redução da expressão dos genes *C-FOS*, *C-JUN*, *BCL-2* e da proteína ciclina D1, bem como um aumento da expressão da proteína P21 e do gene *P53* explicando o efeito antiproliferativo em células de câncer de pulmão. A redução na expressão dos genes *C-FOS* e *C-JUN* (AP1) inibe o crescimento

de células do câncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo* sem induzir apoptose. A inibição de AP1 é uma estratégia na quimioprevenção do câncer (Stepulak et al., 2005).

O bloqueio do receptor NMDA prolongou a sobrevivência de ratos com câncer de pulmão metastático; esse efeito antiproliferativo foi observado também no neuroblastoma e rhabdomyosarcoma, indicando que diferentes tipos de tumores são susceptíveis ao antagonismo do receptor NMDA, revelando-se como um potencial agente quimioterápico ou quimiopreventivo na terapia do câncer (Stepulak et al., 2005).

O receptor NMDA é implicado na proliferação de células do câncer de mama, o MK-801 e a memantina inibiram a proliferação e o declínio da viabilidade de linhagens de células de câncer de mama (Deutsch, 2014). Em pacientes que receberam radioterapia cerebral, a memantina preveniu a disfunção cognitiva. (Brown, 2013). A memantina também é relatada na prevenção da dor neuropática pós mastectomia, melhorando a qualidade de vida desses pacientes (Pickering, 2014).

O antagonismo do glutamato é mais efetivo em suprimir a proliferação de células tumorais periféricas do que as células de origem glial. Muitos antagonistas não atravessam a barreira hematoencefálica e podem ser utilizados em altas concentrações no tratamento do câncer de origem periférica sem induzir efeitos adversos neurológicos (Cavalheiro et al., 2001).

Evidências apontam entre o sinergismo do antagonismo do glutamato e agentes citostáticos comumente utilizados no tratamento do câncer, sendo necessários estudos *in vivo* para evidenciar os mecanismos envolvidos nos efeitos citostáticos do antagonismo do glutamato (Cavalheiro et al., 2001).

Em contraste, a ativação do receptor NMDA suprime o crescimento de queratinócitos e o processo de epitelização, suprimindo a invasividade desses tumores (Nahm, 2004).

São necessários estudos para avaliar a expressão das diferentes subunidades dos receptores NMDA nos diferentes tipos de tumores e conseqüentemente, o seu potencial antiproliferativo ou supressor.

### **1.3. A Indolamina-2,3-dioxigenase**

O triptofano é um aminoácido essencial metabolizado em duas vias principais, a serotoninérgica e da quinurenina. A indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) é a enzima responsável pela degradação do triptofano pela via das quinureninas. O aumento da expressão da IDO está relacionado a resposta de tolerância imunológica e pode ser induzida por IFN $\gamma$  (interferon gama) e lipopolissacarídeos. O IFN $\gamma$  secretado por linfócitos T ativados regula a IDO expressa pelas células apresentadoras de antígenos, sugerindo um possível *feedback* negativo para regulação de células T ativadas (Frumeto, 2002).

Cerca de 95% do triptofano não utilizado para a síntese protéica é metabolizado pela via das quinureninas; 3 a 4% segue a via serotoninérgica e 1 a 2% é metabolizado pela via das triptaminas (Oxenkrug, 2010). A triptamina (TRY) e dimetilriptamina (DMT) foram relacionados com a proliferação de células tumorais. TRY e DMT são compostos indólicos provenientes de uma rota paralela do metabolismo do triptofano e modulariam a atividade da IDO. É conhecido que a IDO participa do mecanismo de escape de células tumorais, sendo relatada como marcadora de progressão tumoral. A inibição da atividade da IDO para a restauração da imunidade antitumoral do hospedeiro tem sido considerada uma estratégia para a terapêutica antineoplásica. O aumento da expressão da IDO correlaciona-se com diversos parâmetros de progressão tumoral e menor sobrevida dos pacientes (Frumeto, 2002).

Neste contexto, pesquisadores têm avaliado o papel do 1-metil-triptofano, inibidor da IDO, na imunoterapia do câncer, no entanto, o exato papel do catabolismo do triptofano pela IDO em cânceres humanos permanece desconhecido, sendo necessário mais estudos (Godin-Ethier, 2011).

É na via das quinureninas que se encontram os compostos que auxiliam nos processos de tolerância, de imunomodulação e das alterações neurológicas para o triptofano. Os efeitos tóxicos da via das quinureninas estão relacionados a ação do ácido quinolínico, agonista do receptor NMDA, promovendo excitotoxicidade neuronal (Rothman, 1984). O ácido quinolínico age também na disfunção mitocondrial (Bordelon, 1997; Barab, 2001) e no aumento da geração de radicais livres (Santamaria, 2001; Behan, 1999). A concentração desse composto raramente ultrapassa 1mM, mas em resposta a toxinas bacterianas aumenta cerca de 246 vezes no cérebro e 66 vezes no espaço extracelular (Kim, 1987; Khaspekov, 1989). O ácido quinurênico foi o primeiro a mostrar ação bloqueadora nos receptores glutamato (Perkins, 1982) e ação de neuroproteção por antagonizar os receptores NMDA (Stone & Darlington, 2002) devido a ligação ao sítio alostérico da glicina (Henderson, 1990; Birch, 1988).

AIDO tem sido correlacionada com pior prognóstico em muitos tipos de cânceres, como coloretal, com maior número de metástases hepáticas nesses tumores (Brandacher et al., 2006), câncer da cérvix uterina (Nakamura et al., 2007), endometrial (Ino et al., 2006), mama (Mansfield et al., 2009), melanoma (Brody et al., 2009), ovário (Inaba et al., 2009) e pulmão (Astigiano et al., 2005), com menor sobrevida mesmo em fases iniciais. A expressão gênica daIDO está correlacionada com rápido crescimento tumoral e disseminação associados com a supressão das células *Natural Killer* e Linfócitos Infiltrantes do Tumor -TIL (Frumento et al., 2002; Munn et al., 2004).

Pan et al. (2008) demonstraram a superexpressão daIDO em células do hepatocarcinoma e em células não cancerosas residentes próximas ao tumor gerando um microambiente imunossupressivo, evitando o ataque do sistema imune às células tumorais, demonstrando ser fator prognóstico independente na sobrevida de pacientes portadores de hepatocarcinoma, sugerindo como novo marcador prognóstico e alvo terapêutico.

O aumento da metabolização do triptofano pela via das quinureninas diminui a síntese de serotonina e melatonina. A concentração de melatonina



no plasma durante o dia é baixa (1-6pg/ml) e alta durante à noite (200-300pg/ml), o que define o ritmo circadiano da melatonina (Hdanova, 1997). Metabólitos da melatonina estão relacionados com diminuição de parâmetros inflamatórios e ação imunomodulatória. Estudo indica que a melatonina tem ação predominantemente oncostática, sendo avaliada como adjuvante na terapêutica oncológica (Sousa Neto et al., 2005). O bloqueio da enzima IDO no metabolismo do triptofano, poderia aumentar a síntese de serotonina e melatonina.

Estudo prévio revelou que o gene *BIN1* (*bridging integrator-1*) pode inibir a proliferação de células cancerígenas por suprimir a expressão de IDO. Foi demonstrado que a baixa expressão de *BIN1* associada com a alta expressão de IDO são preditores de mau prognóstico no câncer e podem ser utilizados para estabelecer novas estratégias terapêuticas (Jia et al., 2015).

Portanto, pode-se pensar como estratégia de tratamento oncológico, a restauração da resposta imune pelo bloqueio da enzima IDO, aumento dos níveis de melatonina e redução da ação agonista no receptor NMDA para grupos de pacientes portadores de câncer de mama que não se beneficiam dos tratamento atuais.

#### 1.4. Justificativa e Relevância

A expressão das subunidades NR1 e NR2B do receptor NMDA foram descritas no crescimento de linhagens de células tumorais do câncer de mama, e que esses receptores não estariam presentes no tecido mamário sadio. Estudos demonstraram o uso de antagonista específico *in vitro* parando o crescimento dessas células tumorais (North et al., 2010; Watanabe et al., 2008).

A subunidade NMDA NR1 é sabidamente constitutiva estando presente em todos os receptores NMDA, com variação na segunda unidade do receptor. O bloqueio específico da subunidade NMDA NR2B apresenta menos efeitos indesejáveis, sendo demonstrado em estudo pré-clínico a capacidade de parar o crescimento de linhagens celulares do câncer de mama (North et., 2010).

A indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) é a enzima limitante no metabolismo do triptofano, através da via das quinureninas. Os metabólitos da via das quinureninas atuam como agonista (ácido quinolínico) e antagonista (ácido quinurênico) do receptor NMDA (Stone & Darlington, 2002). É conhecido que a IDO participa de mecanismos de escape imunológico, correlacionada com mecanismos de progressão tumoral e menor sobrevida dos pacientes. Estudo clínico tem demonstrado a inibição da IDO como uma estratégia na terapia oncológica, sendo o bloqueio desta enzima utilizado em associação com a quimioterapia em pacientes com câncer de mama e melanoma (Muller et al., 2005).

O receptor NMDA está emergindo como um possível alvo para o tratamento do câncer (Luksch et al., 2011; Deutsch et al., 2014), sendo necessário estudos pré-clínicos e clínicos para o melhor entendimento do comportamento fenotípico e o desenvolvimento de terapias específicas, ressaltando a tentativa de caracterizar novos marcadores moleculares que possam servir de alvo terapêutico ou, pelo menos, que sirva como marcador preditivo da resposta ao tratamento ou ainda como sinalizador de prognóstico e, assim, beneficiar os pacientes diagnosticados com câncer de mama, em

especial, o grupo de pacientes que não apresentam resultados satisfatórios na terapia oncológica padrão.

Partindo dessas premissas, o presente estudo propôs verificar a imunexpressão da subunidade NR2B do receptor NMDA em tecidos de câncer de mama humano comparando com a imunexpressão para a enzima indolamina-2,3-dioxigenase e com parâmetros clínicos, sendo estes, o estadiamento; o tamanho do tumor; o *status* linfonodal, a idade das pacientes; a imunexpressão dos receptores hormonais; a imunexpressão do *Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2* (HER2) e com a quimioterapia neoadjuvante.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

2.1.1 Identificar a imunexpressão da subunidade NR2B do receptor NMDA e a imunexpressão da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) em amostras de câncer de mama ductal.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Identificar a imunexpressão do receptor NMDA NR 2B no câncer de mama ductal;

2.2.2. Identificar a imunexpressão da IDO no câncer de mama ductal;

2.2.3. Correlacionar a imunexpressão do receptor NMDA NR 2B no câncer de mama ductal com:

a) a imunexpressão da IDO;

b) o estadiamento clínico;

c) o tamanho do tumor;

d) o *status* linfonodal;

e) a idade das pacientes;

f) a imunexpressão dos receptores hormonais;

g) a imunexpressão do *Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2* (HER2);

2.2.4. Identificar a imunexpressão do receptor NMDA NR2B naquelas pacientes que foram submetida a quimioterapia neoadjuvante.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Desenho do Estudo**

Estudo clínico observacional de coorte transversal que se propôs a avaliar os blocos de parafina de pacientes portadoras de câncer de mama, bem como os referidos dados clínicos das pacientes participantes do Estudo.

#### **3.2. Aspectos éticos**

Esse estudo envolve a participação de seres humanos e foi desenvolvido em conformidade com a declaração de Helsinque após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, credenciado pelo CONEP - Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), bem como o termo de assentimento foi obtido das pacientes e devidamente esclarecidas. O projeto seguiu as diretrizes da Resolução Nº 466, de 12 de Dezembro de 2012. Parecer número 62425016.6.0000.5054.

#### **3.3. Critérios de inclusão**

- Mulheres acima de 18 anos;
- Mulheres com confirmação histológica de câncer de mama por microscopia e imunohistoquímica (Receptores de estrógeno/progesterona e HER2 positivos);
- Todos os estadiamentos clínicos (estadiamento I, II, III e IV);

### **3.4. Critérios de exclusão e retirada**

- Mulheres com história prévia de outras neoplasias no intervalo de 5 anos, exceto carcinoma ductal *in situ*, carcinoma de colo uterino *in situ* ou carcinoma basal ou escamoso de pele, adequadamente tratados;
- Mulheres com alguma condição clínica que possa interferir com a condução do estudo ou a avaliação de seus resultados, na opinião do investigador;
- Mulheres que abandonaram o tratamento ou com perda de seguimento clínico.

### **3.5. Material biológico**

Foram avaliados blocos de parafina contendo amostra tumoral de câncer de mama de mulheres tratadas na Clínica de Oncologia e Atendimento de Urgência Ltda – Fortaleza – Ceará atendidas em 2017 (primeira vez ou retorno – 20 blocos catalogados, 15 permaneceram no estudo). Os blocos catalogados apresentaram confirmação da neoplasia por histologia e imunohistoquímica, e preenchem os critérios de inclusão do estudo.

### **3.6. Imunohistoquímica e Análise dos Resultados**

A imunohistoquímica se refere à técnica de expressar antígenos em tecidos, explorando o princípio da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. Foi realizada avaliação pela técnica de estreptavidina-biotina com anticorpos primários para subunidade NR2B do

receptor NMDA e enzima IDO em quinze amostras de tecido de câncer de mama ductal local e metastático.

Os anticorpos foram adquiridos com as seguintes especificações: NMDA2B Monoclonal Antibody B3-13B11 em ratos, Data Sheet, com reatividade em ratos e humanos, podendo ser utilizado para Western Blot e Imunohistoquímica (parafina). O anticorpo policlonal anti-IDO1, IMUN-IM-0402, feito em coelhos com reação para amostra humana, purificado por cromatografia de afinidade, uso em Elisa, Western Blot e Imunohistoquímica, Rhea-Imuny Company.

Os tecidos previamente fixados em blocos de parafina foram agrupados em dois blocos de *Tissue Microarray* (TMA) com fragmentos 2 mm de diâmetro mais representativos de cada lesão, a seguir foram efetuados cortes de 3 micrômetros de cada bloco. Os cortes foram lavados com peroxidase a 3%, seguido de dois banhos com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) de 5 minutos 0,1 molar. Realizou-se controle positivo com amostras de cérebro de rato e linhagens de câncer de mama (de laboratório) para avaliar a diluição do anticorpo primário NMDA NR2B diluição 1:50 e amostras de melanoma murino e linhagens de câncer de mama para avaliar a diluição do anticorpo primário IDO 1:100. Após fixação com os anticorpos primários, as lâminas foram incubadas a temperatura de 4<sup>o</sup> em câmara úmida com PBS para evitar o congelamento. O anticorpo secundário HRP (Goat anti-Rabbit IgG Dako – Horseradish peroxidase), Data Sheet, uso em Western Blot, Elisa, Imunohistoquímica (parafina) e revelados com diaminobenzina, contrastados com hematoxilina. Não houve controle negativo.

A escala de marcação definida com a estatística descritiva, sendo dividida em leve entre 25% a 50% de marcação por campo (400x); moderada entre 50% a 75% de marcação por campo; intensa acima de 75% de intensidade de marcação por campo. Foram consideradas as marcações em núcleo e citoplasma.

### 3.7. Desfecho clínico

Os seguintes dados clínicos foram coletados por meio de questionário e pesquisa de prontuário na unidade de tratamento do paciente: idade ao diagnóstico, estadiamento clínico, realização ou não de quimioterapia neoadjuvante, tratamento cirúrgico, uso de hormonioterapia, tempo de doença, situação de sobrevida, ocorrência e local de metástases. Foram retirados dos prontuários dados como a imunohistoquímica para receptores hormonais e HER2.

Foram feitas análises comparativas entre as imunomarcações IDO e NMDA NR2B; entre NMDA NR 2B com o estadiamento clínico; entre NMDA NR 2B com o tamanho do tumor; entre NMDA NR 2B e o *status* linfonodal; entre NMDA NR 2B com a idade das pacientes; entre NMDA NR 2B com a imunoexpressão dos receptores hormonais estrógeno e progesterona; entre NMDA NR 2B com a imunoexpressão para HER2 e entre NMDA NR 2B com a realização ou não de quimioterapia neoadjuvante (pacientes com doença avançada, não sendo operáveis ao diagnóstico).



#### 4. RESULTADOS

Foram selecionadas vinte amostras de câncer de mama histologia ductal de pacientes do sexo feminino, das quais cinco foram desconsideradas durante o estudo devido qualidade e/ou quantidade de material biológico nos cortes parafinados, quinze pacientes permaneceram no estudo (Quadro 3). Doze amostras foram estadiamento I ou II do câncer de mama (Gráficos 2). Três casos metastáticos, sendo um caso de metástase cerebral após 24 meses de tratamento (amostra 6), um caso de metástase óssea após 12 meses de tratamento (amostra 3) e um caso de metástase na parede torácica após a mastectomia (amostra 11). Cinco pacientes apresentaram linfonodos axilares positivos (amostras 2, 5, 6, 9, 11); Seis tinham menos de 50 anos à época do diagnóstico (Gráfico 5), estando três pacientes na terceira década de vida (amostra 2, 11, 13). Todas as amostras são do tipo histológico carcinoma ductal, tendo doze amostras com características de invasividade (amostras 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15). Doze apresentaram receptores de estrogênio e progesterona positivos (Gráfico 6). Dois casos com apenas receptor de estrogênio positivo e receptor de progesterona negativo (amostras 8, 12). Oito amostras foram *Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2* (HER2) positivas tratadas com trastuzumabe, sete foram HER2 negativas (Gráfico 7), e dois casos triplo negativos (receptores de estrogênio, progesterona e HER2 negativos) (amostras 9, 13). Sete amostras são do subtipo luminal B híbrido (receptor hormonal positivo e HER 2 positivo) (amostras 1, 2, 5, 6, 7, 14, 15). As pacientes receptores hormonais positivos foram tratadas com tamoxifeno e/ou inibidor de aromatase. Uma paciente foi submetida a castração hormonal central (amostra 2). Casos metastáticos foram tratados com inibidor de osteólise e radioterapia (amostras 3, 11). Houve um caso de história familiar positiva em parente de primeiro grau com câncer de mama (amostra 6).

Todas as amostras foram positivas para imunomarcção para IDO e NMDA NR 2B, sendo nove amostras com marcação intensa para IDO (amostras 2, 3, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 15) (Gráfico 1), incluindo os dois casos metástase ósseas (amostras 3, 11); Sete amostras com marcação moderada

para NMDA NR 2B (amostras 1, 4, 5, 6, 11, 14, 15) (Gráfico 1), incluindo o caso com evolução para metástase cerebral (amostra 6). As duas amostras triplo negativo apresentaram marcação de fraca intensidade para NMDA NR 2B e de moderada a intensa marcação para IDO (amostras 9, 13).

Tumores menores e de evolução clínica favorável apresentaram uma aparente associação positiva com marcação de fraca intensidade para NMDA NR 2B (Gráficos 2, 3). Um caso com imunoposição fraca para NMDA NR 2B com desfecho clínico desfavorável evoluindo com metástase óssea, apresentando sobrevida em tratamento de seis anos (amostra 3). Não houve relato de uso de opióides nos casos avaliados de metástases ósseas. Das cinco amostras com linfonodos positivos, três apresentaram marcação moderada para NMDA NR2B e uma marcação intensa (Gráfico 4), nesse mesmo grupo houve três marcações intensas para IDO 1 (Quadro 3).

Nove pacientes tinham mais de 50 anos ao diagnóstico, sendo quatro com imunomarcção fraca e cinco com marcação moderada para NMDA NR2B. Um caso de maior sobrevida livre de doença (14 anos) com imunoposição intensa para NMDA NR 2B permaneceu em uso de inibidor da aromatase (amostra 7).

As doze amostras que apresentaram receptores hormonais positivos (estrógeno e/ou progesterona), quatro tiveram imunomarcção fraca, sete com marcação moderada e uma com marcação intensa para NMDA NR2B. Das oito amostras que eram *Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2* (HER2) positivas, duas apresentaram imunomarcção fraca, cinco com marcação moderada e uma com marcação intensa para NMDA NR2B.

Cinco pacientes foram submetidas a quimioterapia neoadjuvante (amostras 5, 6, 7, 8, 9) (Gráfico 8), três amostras após a quimioterapia e o tratamento cirúrgico apresentaram imunoposição de fraca intensidade para NMDA NR 2B (amostras 7, 8, 9) e duas amostras com imunoposição moderada para NMDA NR 2B (amostras 5, 6). Das cinco amostras que foram submetidas a quimioterapia neoadjuvante, a amostra 6 apresentou sobrevida global de 3 anos e evolução para metástase cerebral (luminal B híbrido, T4);

a amostra 7 apresentou sobrevida livre de doença de 14 anos (luminal B híbrido, T1); a amostra 8 apresentou sobrevida livre de doença de 7 anos (luminal A) e a amostra 9 apresentou sobrevida livre de doença de 2 anos (triplo negativo), esta com a imunopressão de NMDA NR 2B fraca e de IDO moderada (Quadro 3). Não houve resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante, apresentando o resultado da patologia com carcinoma ductal invasivo. Nenhuma paciente foi à óbito durante o estudo.

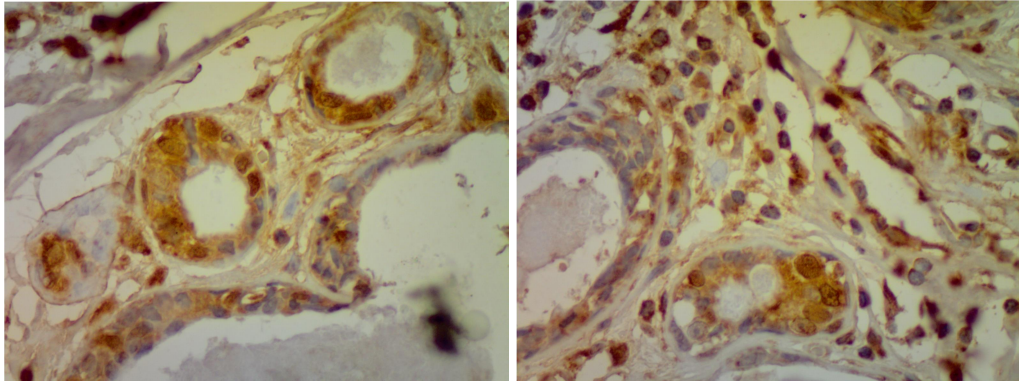
Quadro 3. Resultados.

<b>N</b>	<b>Est.</b>	<b>ID (A)</b>	<b>T (CM)</b>	<b>RH</b>	<b>HER2</b>	<b>LN</b>	<b>QT NEO</b>	<b>SG (A)</b>	<b>IDO</b>	<b>NMDA</b>
1	IA	64	T1	+	+	N0	N	3	M	M
2	IIB	35	T2	+	+	N1	N	10	I	I
3	IA	62	T1	+	-	N0	N	6	I	F
4	IA	74	T1	+	-	N0	N	2	I	M
5	IIIA	43	T3	+	+	N1	S	2	I	M
6	IIIB	56	T4	+	+	N2	S	3	M	M
7	IA	52	T1	+	+	N0	S	14	M	F
8	IIA	55	T2	+	-	N0	S	7	M	F
9	IIB	56	T2	-	-	N1	S	2	M	F
10	IA	46	T1	+	-	N0	N	3	I	F
11	IV	33	T1	+	-	N1	N	7	I	M
12	IA	50	T1	-	+	N0	N	3	M	F
13	IA	36	T1	-	-	N0	N	1	I	F
14	IIB	54	T3	+	+	N0	N	7	I	M
15	IA	70	T1	+	+	N0	N	7	I	M

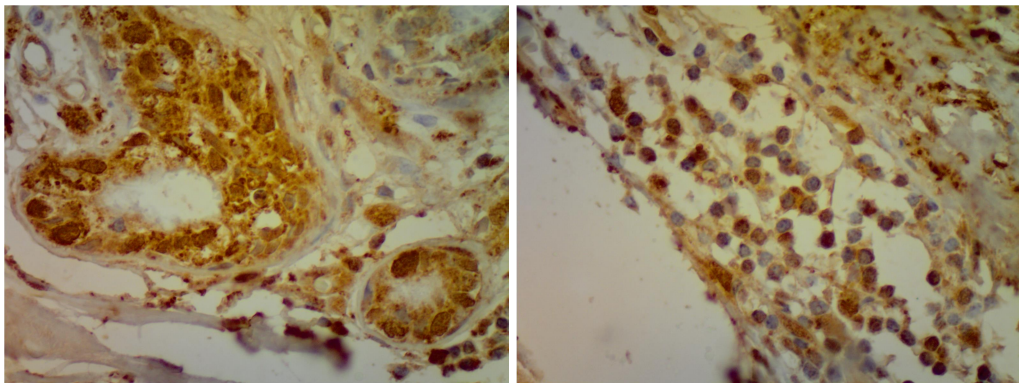
N = amostra; E = estadiamento; T = tumor; RH = Receptor Hormonal; LN = linfonodos; SG = sobrevida global; QT NEO = quimioterapia neoadjuvante; N = Não; S = Sim; M= Moderado; I = Intenso; F = fraco; (+) = positivo; (-) = negativo.

Amostra 1 – carcinoma ductal *in situ* de alto grau, TisN0M0, 64 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos, HER2 positivo, Ki 67 15%. Tratamento: quadrantectomia, radioterapia e hormonioterapia com tamoxifeno. Menarca e menopausa precoces, nuligesta.

Figuras 1A e 1B. Imunomarcção positiva moderada para IDO Amostra 1.

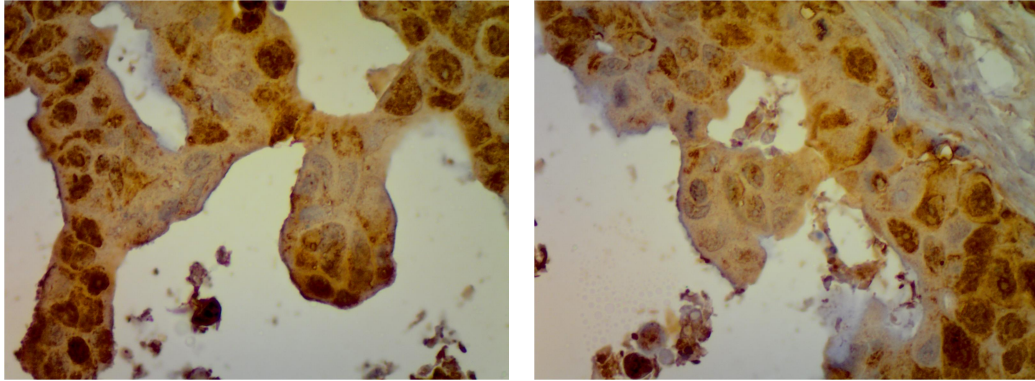


Figuras 2A e 2B. Imunomarcção positiva moderada para NMDA NR 2B Amostra 1.

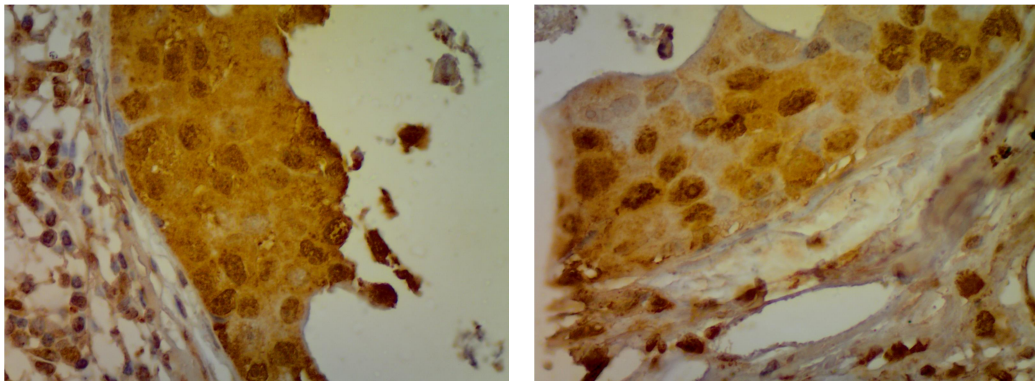


Amostra 2 (2008) - carcinoma ductal, T2N1M0, 35 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos, HER 2 positivo. Tratamento: mastectomia, quimioterapia adjuvante, trastuzumabe e acetato de goserrelina.

Figuras 3A e 3B . Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 2.

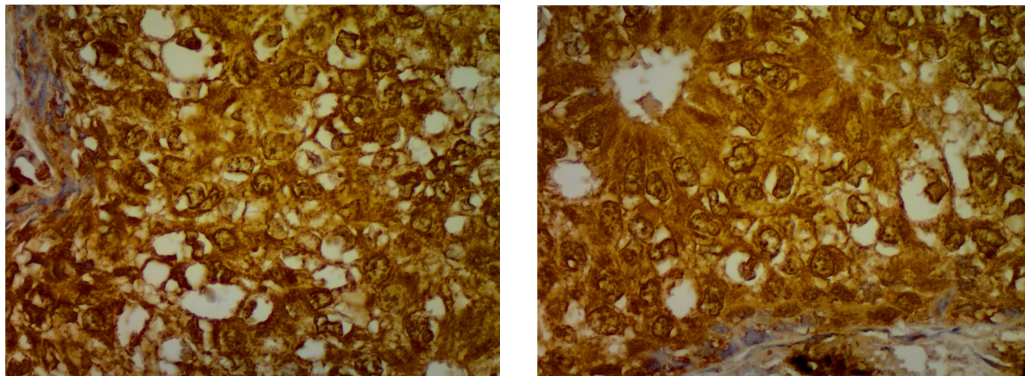


Figuras 4A e 4B. Imunomarcção positiva intensa para NMDA NR 2B Amostra 2.

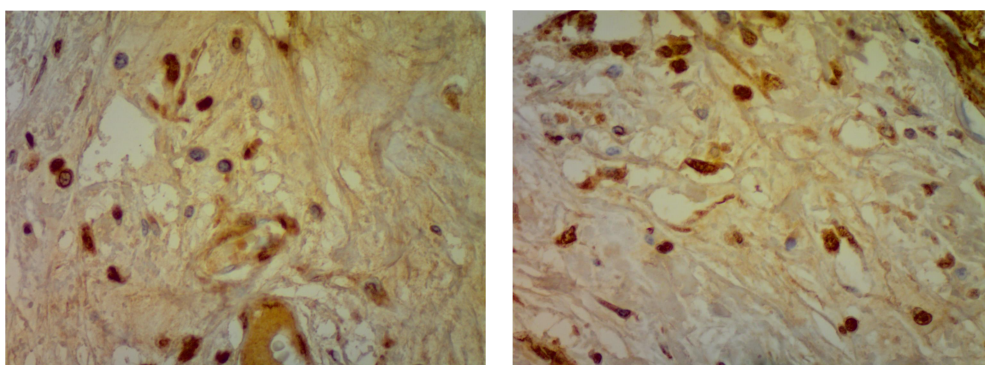


Amostra 3 (2012) – carcinoma ductal tipo comedocarcinoma infiltrativo, T1N0M0, 62 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos, HER2 negativo, Ki 67 < 25%. Tratamento: mastectomia, radioterapia, quimioterapia com docetaxel. Hormonioterapia com tamoxifeno, seguido de inibidor de aromatase com inibidor de osteólise. Metástase óssea após 12 meses. Em 1991 havia feito mastectomia devido carcinoma ductal tipo comedocarcinoma infiltrativo na mama contralateral. Uso de antidepressivo. Menarca e menopausa precoces, múltipara.

Figuras 5A e 5B. Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 3.

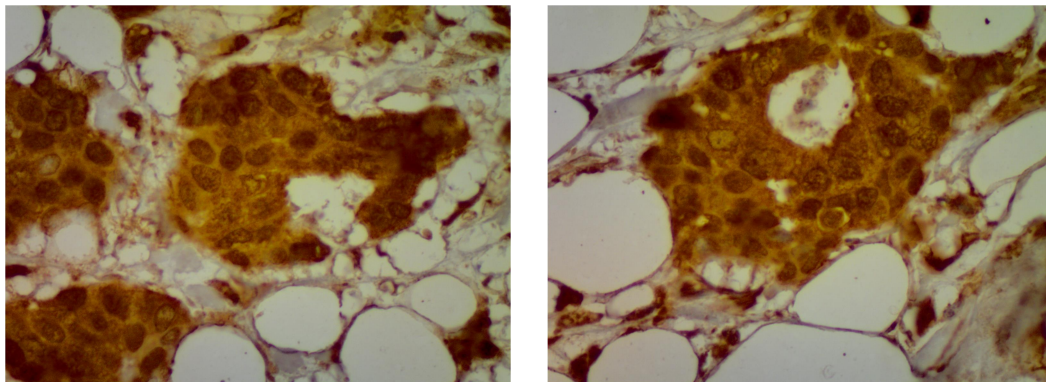


Figuras 6A e 6B. Imunomarcção positiva fraca para NMDA NR2B Amostra 3.

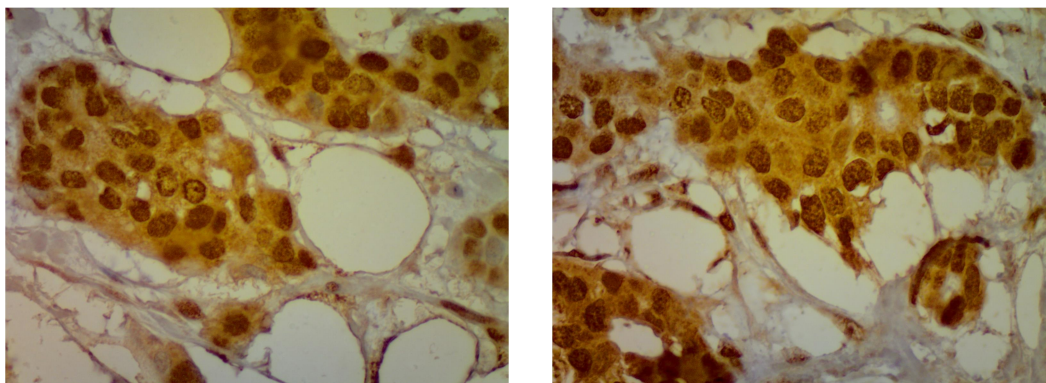


Amostra 4 (2016) – carcinoma ductal invasivo, T1N0M0, 74 anos, receptor estrogênio e progesterona positivos, HER2 negativo, Ki 67 25%. Tratamento: quadrantectomia, inibidor de osteólise e inibidor de aromatase. História familiar positiva de câncer de mama em parente de primeiro grau, BRCA1/2 não mutado, realizou terapia de reposição hormonal na menopausa, múltípara.

Figuras 7A e 7B. Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 4.

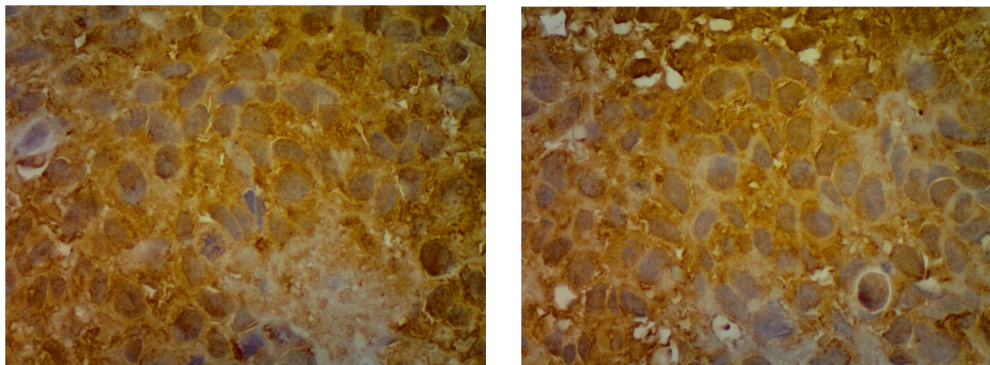


Figuras 8A e 8B. Imunomarcção positiva moderada para NMDA NR 2B Amostra 4.

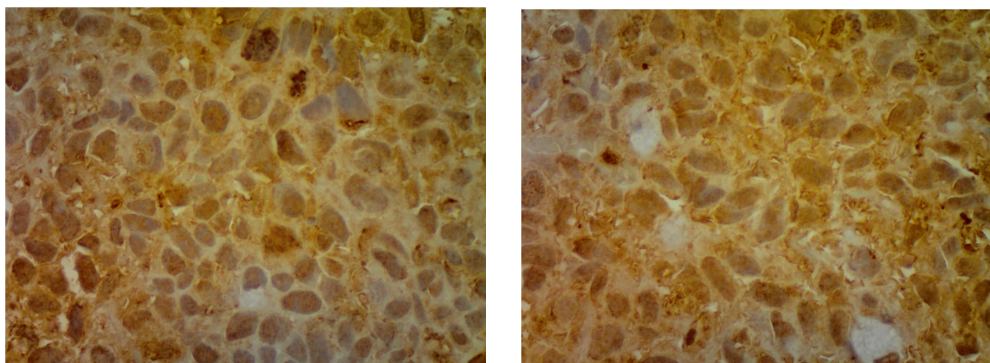


Amostra 5 (2016) – carcinoma ductal invasivo, T3N1M0, 43 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos. HER2 positivo. Tratamento: quimioterapia neoadjuvante com docetaxel, carboplatina e trastuzumabe. Cirurgia: adenomastectomia, resposta patológica parcial, receptor de estrogênio e progesterona positivos, HER 2 negativo. Pós-cirurgia: inibidor de aromatase e trastuzumabe. Menopausa precoce, multípara.

Figuras 9A e 9B. Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 5.



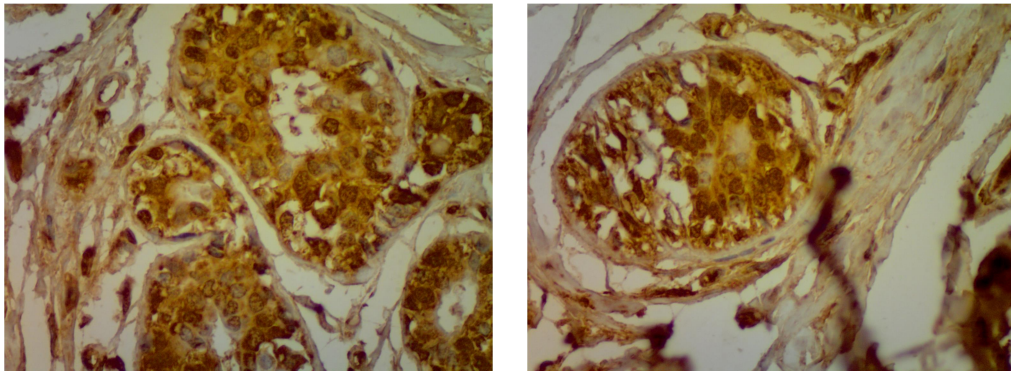
Figuras 10A e 10B. Imunomarcção positiva moderada para NMDA NR 2B Amostra 5.



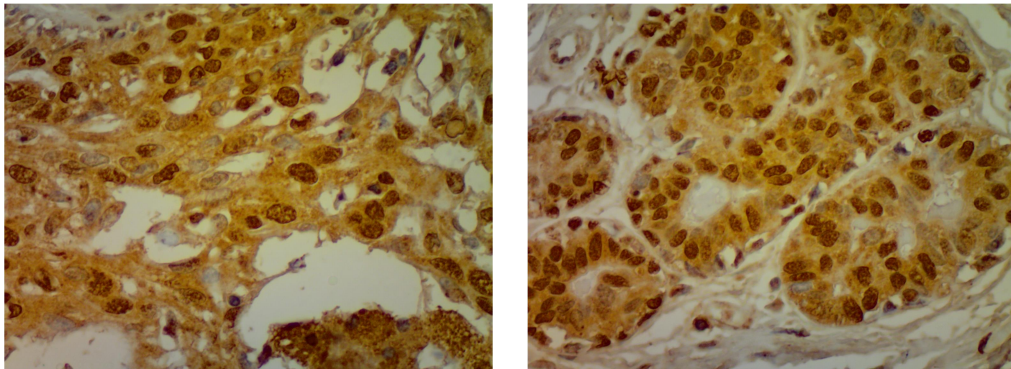


Amostra 6 (2015) – carcinoma ductal invasivo, T4N2M0, 56 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos. HER 2 positivo. Tratamento: quimioterapia neoadjuvante docetaxel, ciclofosfamida e trastuzumabe; mastectomia e radioterapia. Metástase cerebral após 24 meses. História familiar de câncer de mama em primeiro grau.

Figuras 11A e 11B. Imunomarcção positiva moderada para IDO Amostra 6.

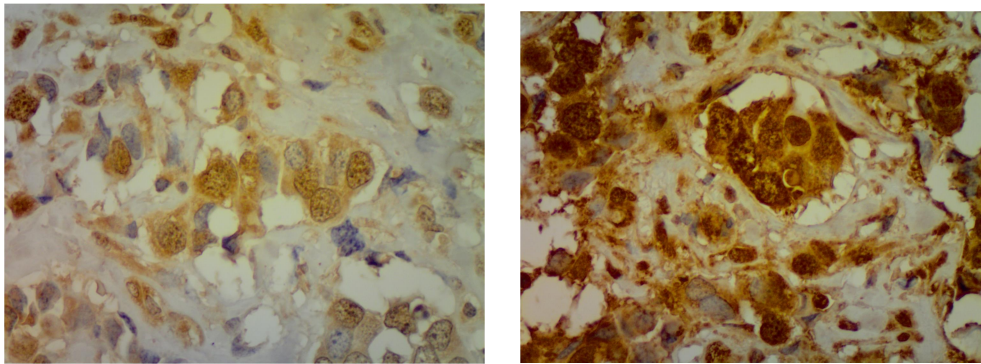


Figuras 12A e 12B. Imunomarcção positiva moderada para NMDA NR 2B Amostra 6.

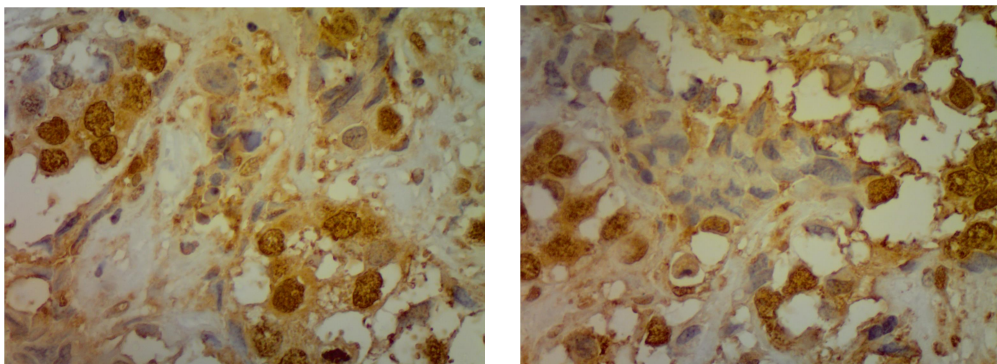


Amostra 7 (2004) – carcinoma ductal invasivo, T1N0M0, 52 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos. HER2 positivo. Tratamento: quimioterapia neoadjuvante com ciclofosfamida, metotrexato e fluoracil; mastectomia e hormonioterapia com inibidor da aromatase. Anatomopatológico pós-cirurgia: carcinoma *in situ*. Menarca e menopausa precoces, nulípara.

Figuras 13A e 13B. Imunomarcção positiva moderada para IDO Amostra 7.

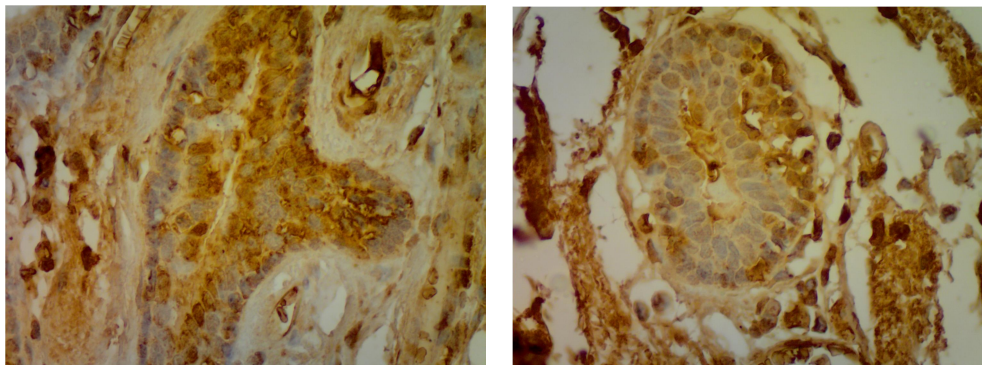


Figuras 14A e 14B. Imunomarcção positiva fraca para NMDA NR 2B Amostra 7.

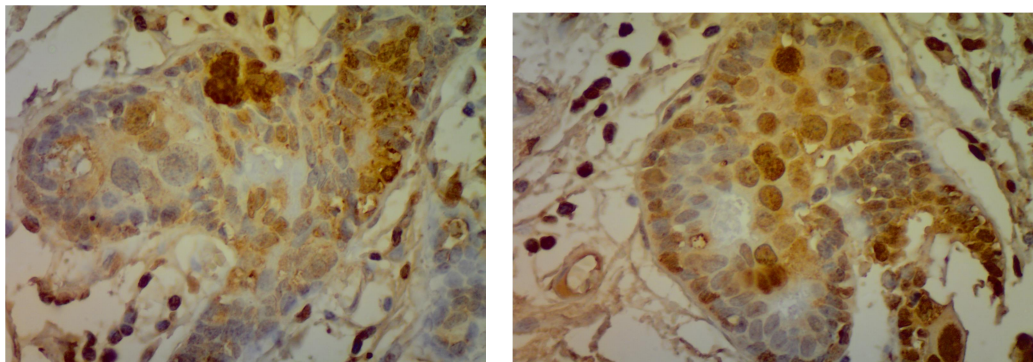


Amostra 8 (2011) – carcinoma ductal invasivo, T2N0M0, 55 anos, receptor de estrogênio positivo, receptor de progesterona negativo, HER2 negativo. Tratamento: quimioterapia neoadjuvante com ciclofosfamida, doxorubicina e docetaxel; mastectomia, radioterapia. Pós-cirurgia: resposta patológica parcial – T1N0. Hormonioterapia com inibidor de aromatase e inibidor de osteólise.

Figuras 15A e 15B. Imunomarcação positiva moderada para IDO Amostra 8.

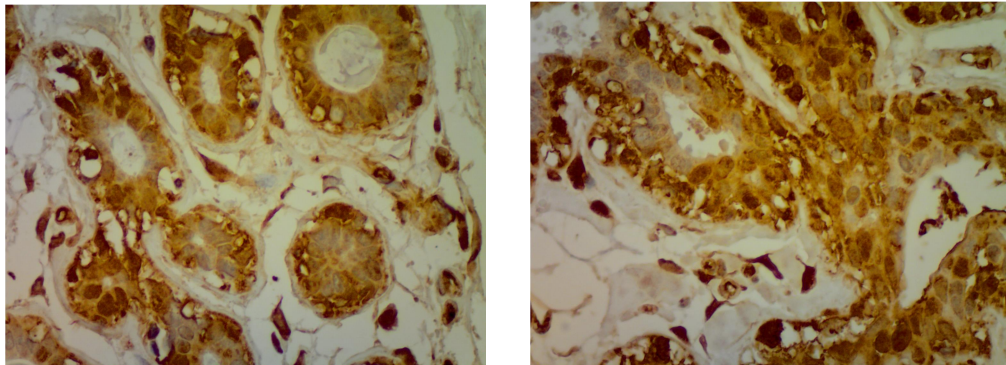


Figuras 16A e 16B. Imunomarcação positiva fraca para NMDA NR2B Amostra 8.

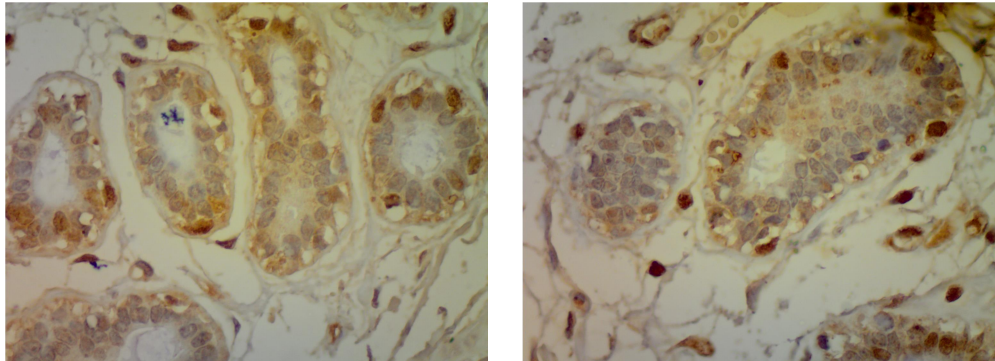


Amostra 9 (2016) – carcinoma ductal invasivo, T2N1M0, 56 anos, triplo negativo. Tratamento: quimioterapia neoadjuvante com docetaxel, cirurgia e seguido de quimioterapia adjuvante com doxorrubicina e ciclofosfamida.

Figuras 17A e 17B. Imunomarcção positiva moderada para IDO Amostra 9.

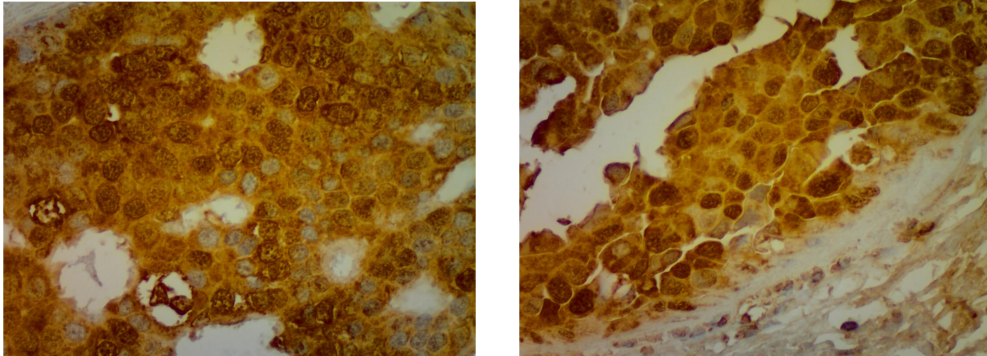


Figuras 18A e 18B. Imunomarcção positiva fraca para NMDA NR2B Amostra 9.

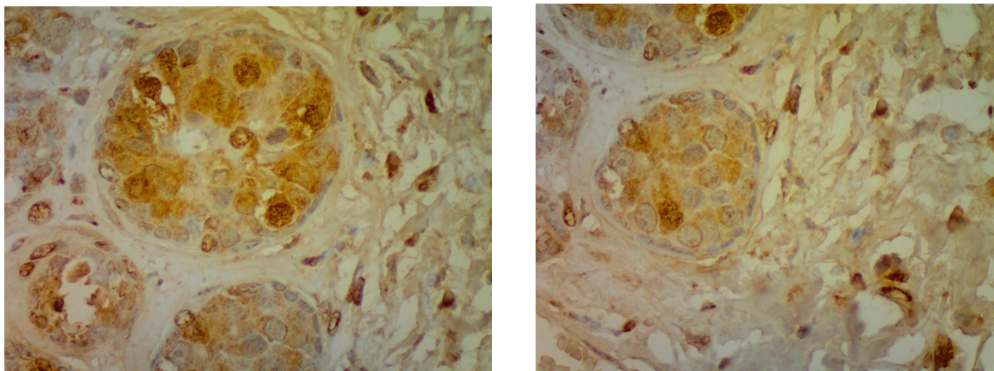


Amostra 10 (2015) – carcinoma ductal invasivo, T1N0M0, 46 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos, HER2 negativo. Tratamento: mastectomia, seguido de quimioterapia adjuvante com ciclofosfamida, doxorrubicina e docetaxel. Hormonioterapia com tamoxifeno.

Figuras 19A e 19B. Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 10.

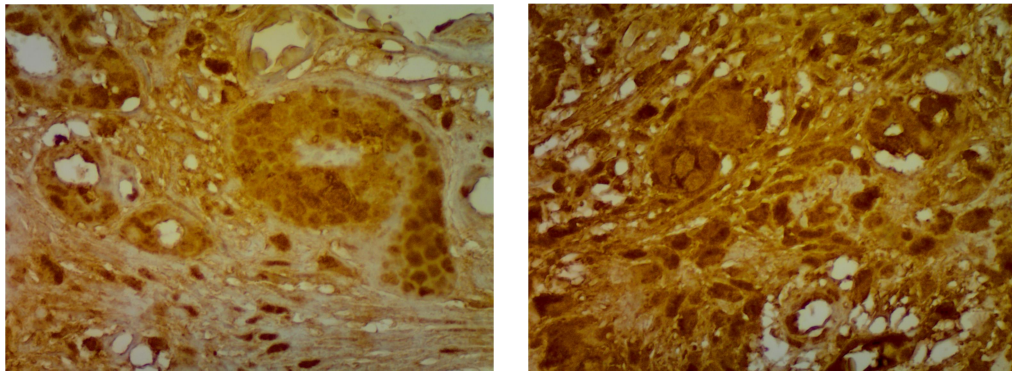


Figuras 20A e 20B. Imunomarcção positiva fraca para NMDA NR2B Amostra 10.

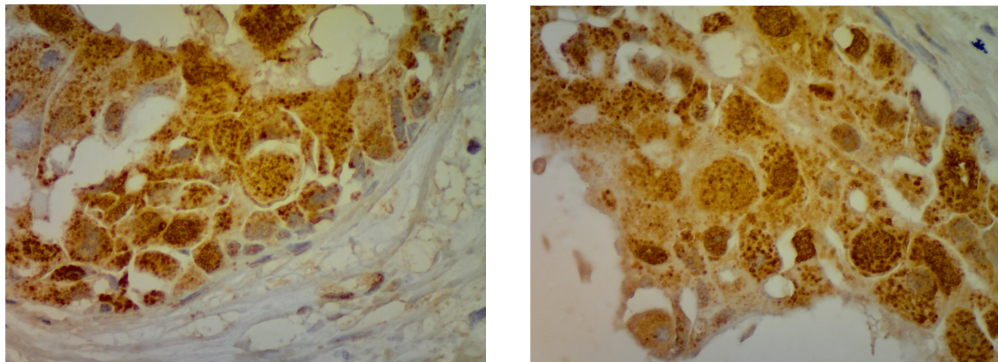


Amostra 11 (2011) – carcinoma ductal invasivo, T1N1M1, 33 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos, HER2 negativo, Ki67 10%. Tratamento: mastectomia (invasão da parede torácica) quimioterapia paliativa com docetaxel e inibidor de osteólise, seguido de capecitabina com inibidor de osteólise. Radioterapia na coluna torácica.

Figuras 21A e 21B. Imunomarcação positiva intensa para IDO Amostra 11.

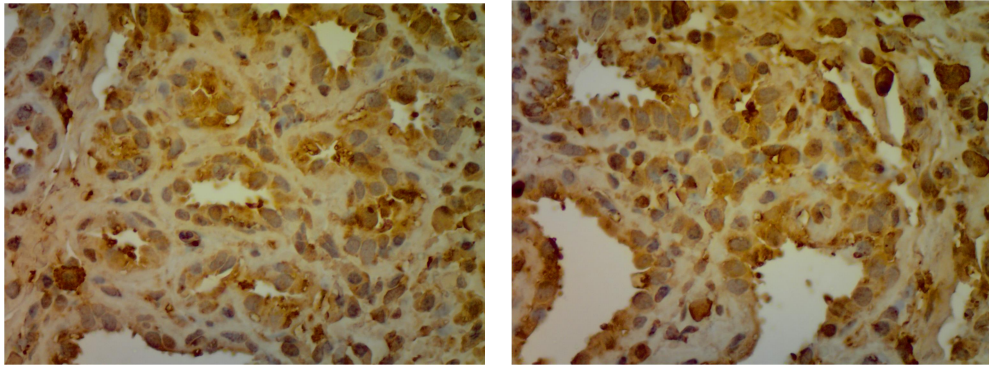


Figuras 22A e 22B. Imunomarcação positiva moderada para NMDA NR2B Amostra 11.

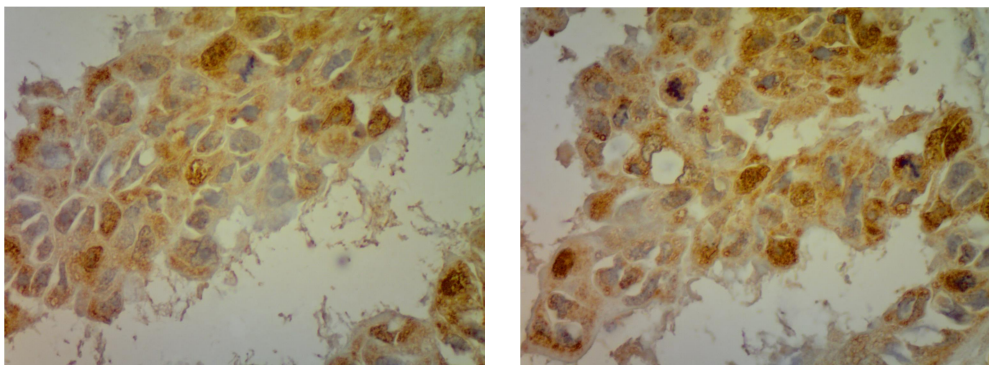


Amostra 12 (2015) – carcinoma ductal *in situ*, TisN0M0, 50 anos, receptor de estrogênio positivo, receptor de progesterona negativo, HER 2 positivo, Ki 67 40%. Tratamento: mastectomia, radioterapia, seguida de tamoxifeno. Menarca e menopausa precoces, nulípara.

Figuras 23A e 23B. Imunomarcção positiva moderada para IDO Amostra 12.

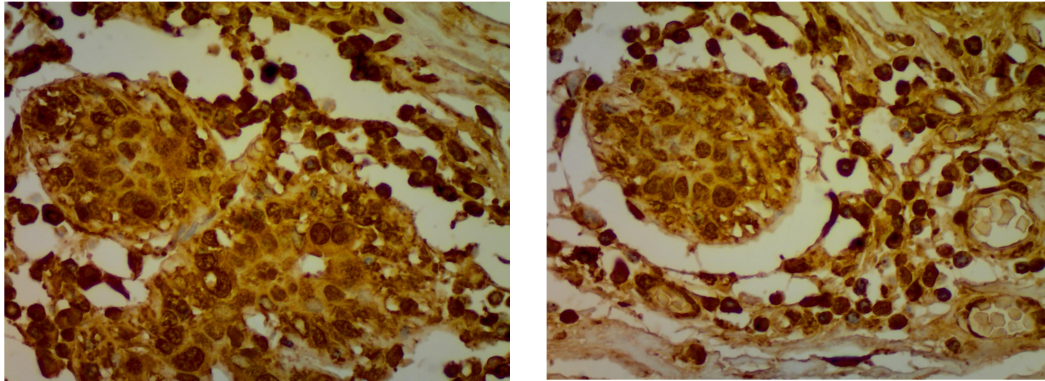


Figuras 24A e 24B. Imunomarcção positiva fraca para NMDA NR2B Amostra 12.

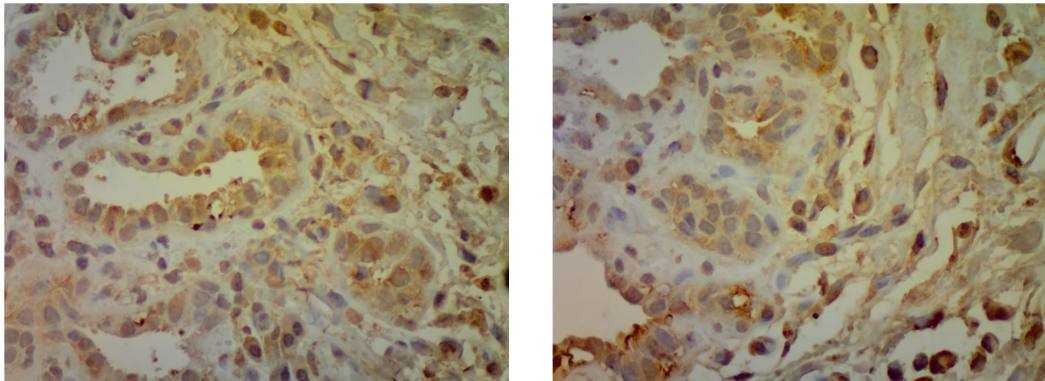


Amostra 13 (2017) – carcinoma ductal invasivo, T1N0M0, 36 anos, triplo negativo. Tratamento: mastectomia, quimioterapia adjuvante com cisplatina e docetaxel.

Figuras 25A e 25B. Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 13.



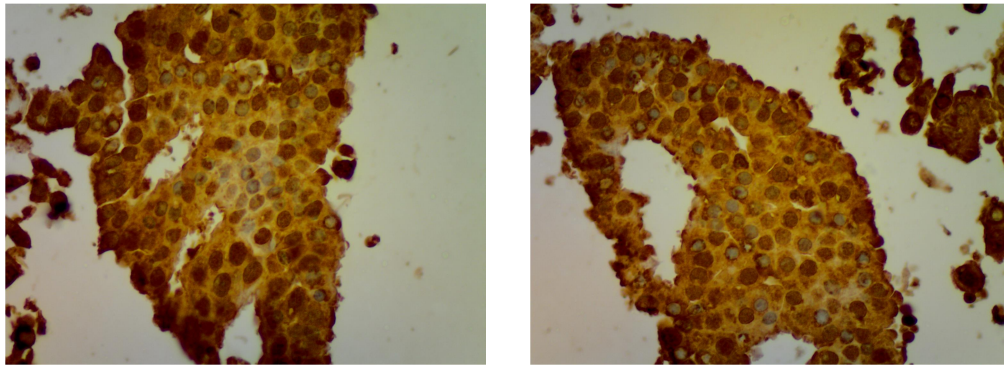
Figuras 26A e 26B. Imunomarcção positiva fraca para NMDA NR2B Amostra 13.



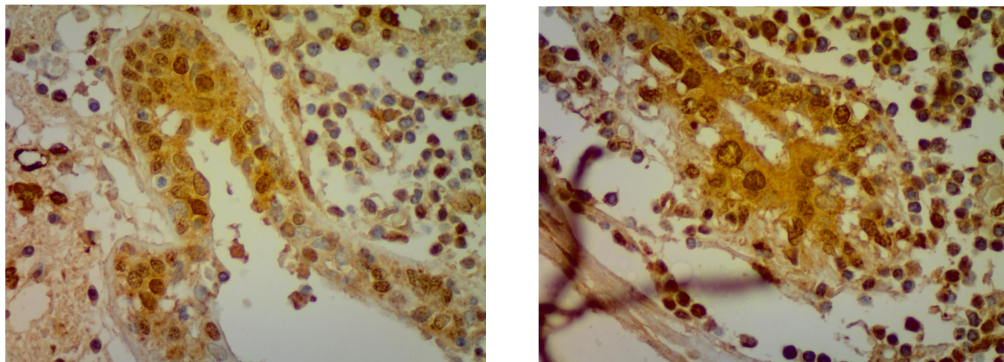


Amostra 14 (2011) – carcinoma ductal invasivo, T3N0M0, 61 anos, receptor de estrogênio e progesterona negativos, HER2 positivo, Ki 67 70%. Tratamento: mastectomia com esvaziamento axilar, quimioterapia adjuvante com cisplatina e docetaxel. Antecedente de terapia de reposição hormonal por 10 anos, múltipara.

Figuras 27A e 27B . Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 14.

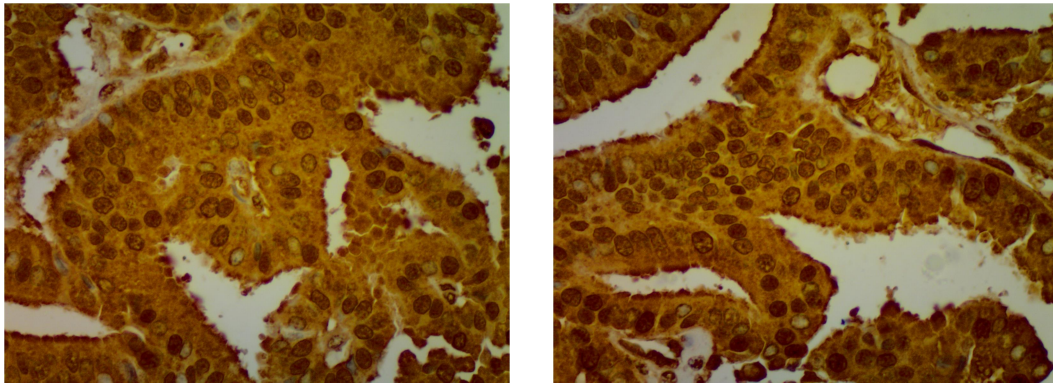


Figuras 28A e 28B. Imunomarcção positiva moderada para NMDA NR2B Amostra 14.



Amostra 15 (2011) – carcinoma ductal invasivo, T1N0M0, 70 anos, receptor de estrogênio e progesterona positivos, HER2 positivo. Tratamento: mastectomia com esvaziamento axilar, hormonioterapia com inibidor de aramatase.

Figuras 29A e 29B. Imunomarcção positiva intensa para IDO Amostra 15.



Figuras 30A e 30B. Imunomarcção positiva moderada para NMDA NR 2B Amostra 15.

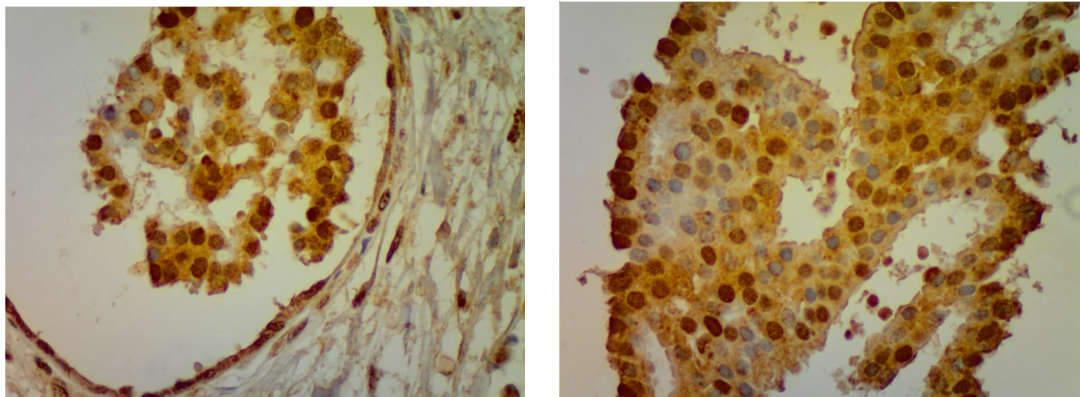


Gráfico 1. Imunomarcação do NMDA NR2B x Imunomarcação da IDO.

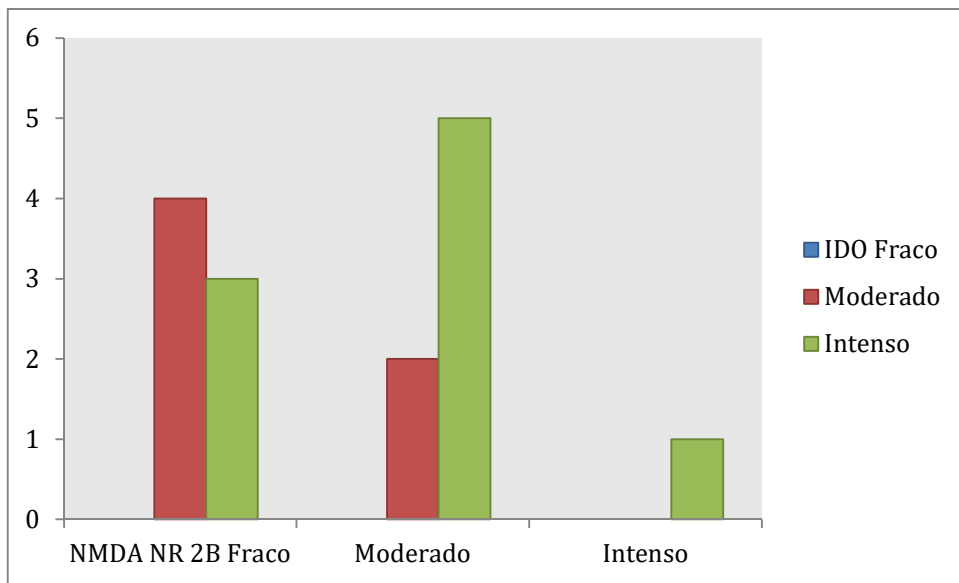


Gráfico 2. Imunomarcação do NMDA NR2B x Estadiamento clínico.

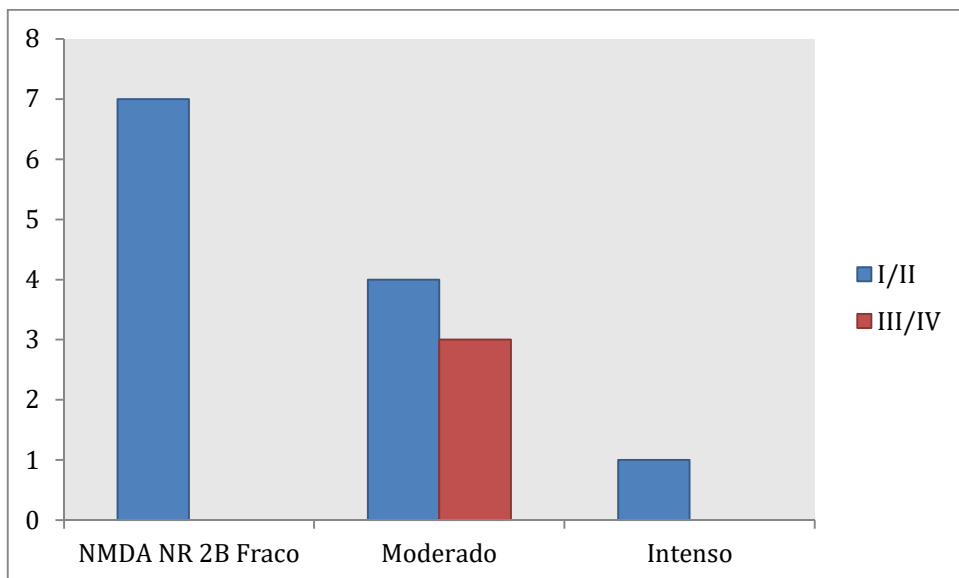


Gráfico 3. Imunomarcção do NMDA NR2B x Tamanho do tumor.

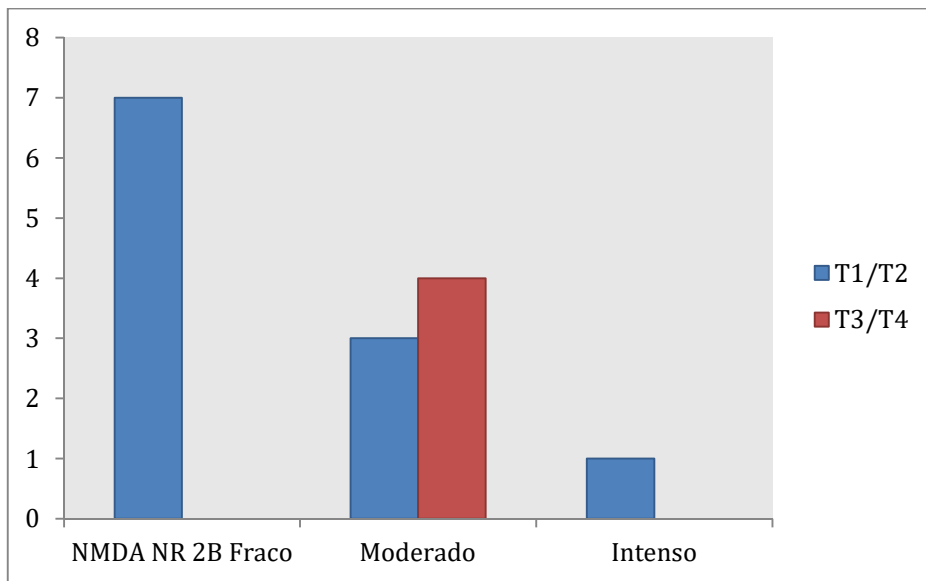


Gráfico 4. Imunomarcção do NMDA NR2B x *Status* linfonodal.

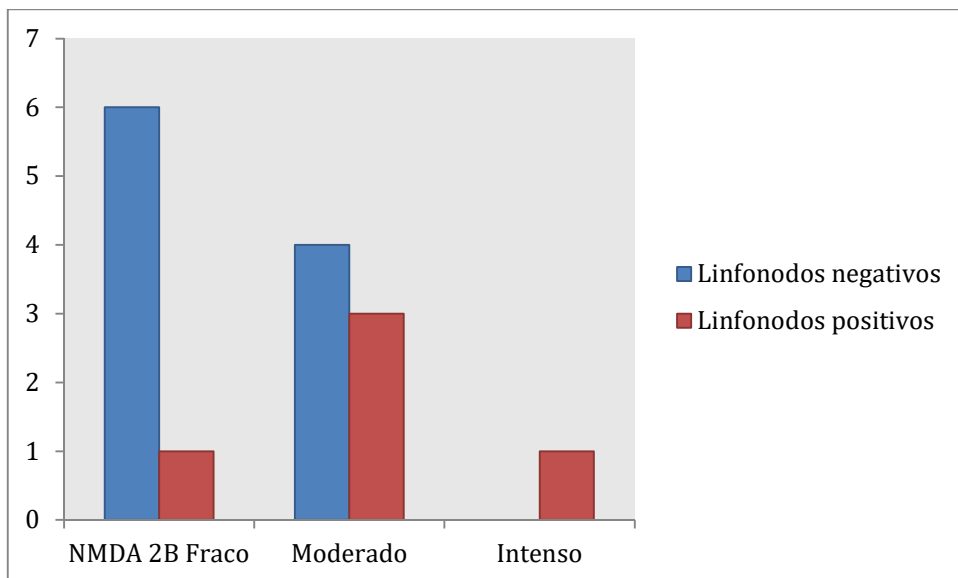


Gráfico 5. Imunomarcção do NMDA NR2B x Idade das pacientes.

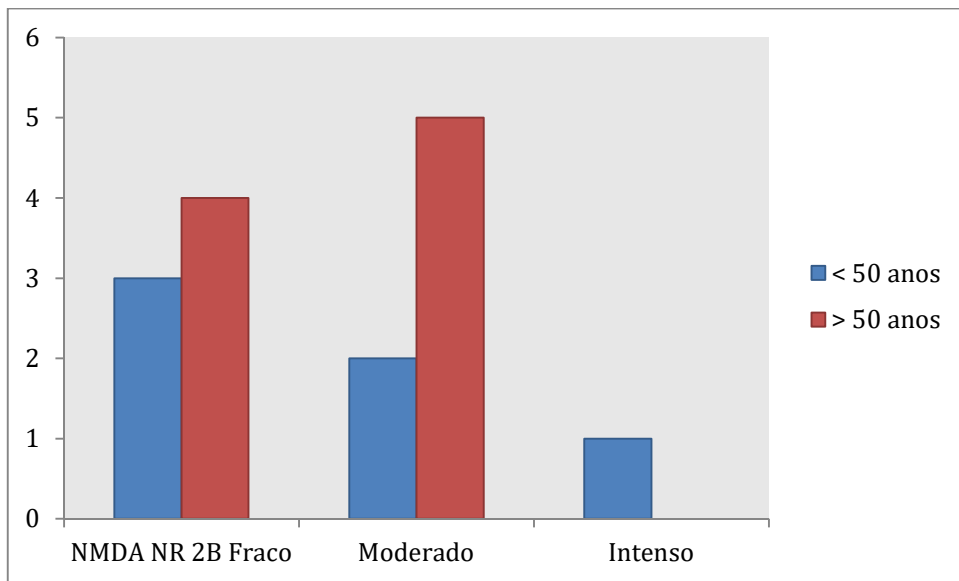


Gráfico 6. Imunomarcção do NMDA NR2B x Receptor hormonal.

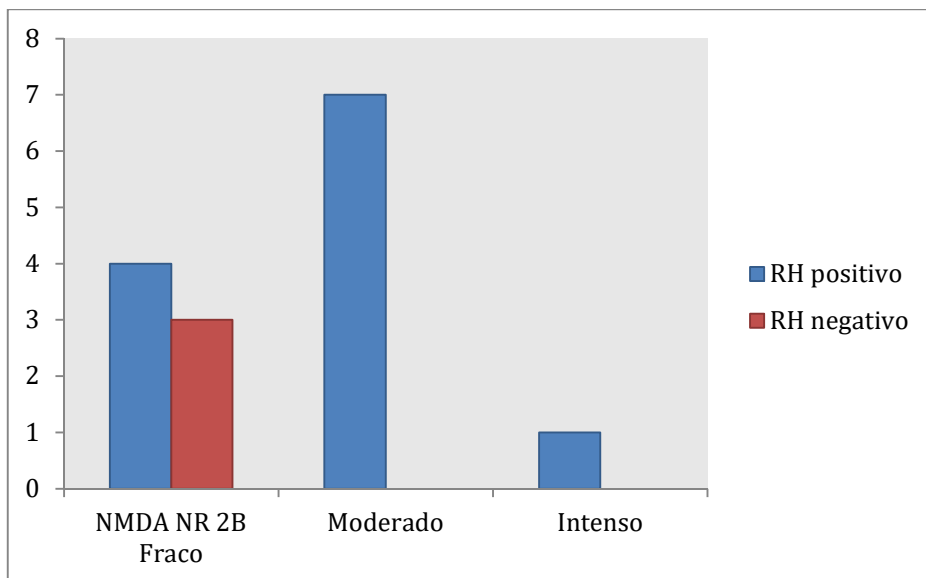


Gráfico 7. Imunomarcção de NMDA NR2B x Imunomarcção para HER2.

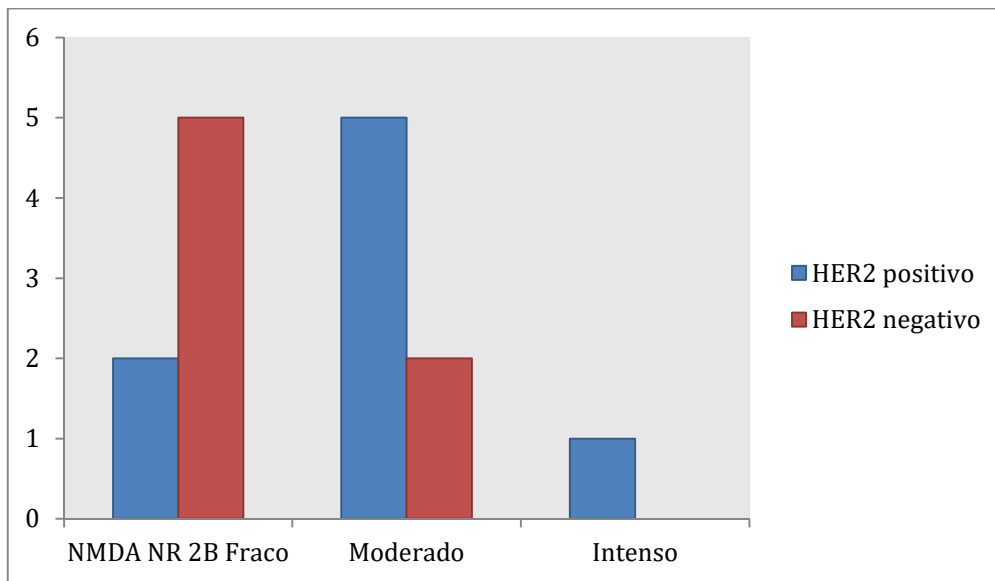
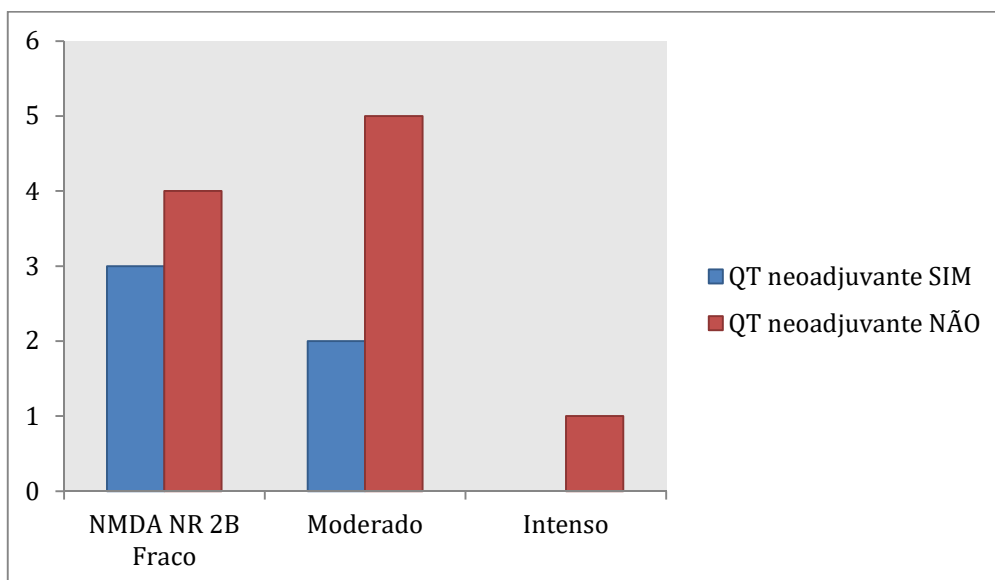


Gráfico 8. Imunomarcção do NMDA NR2B x Quimioterapia neoadjuvante (Imunohistoquímica após quimioterapia em espécies de mastectomia).



## 5. DISCUSSÃO

Dados do Instituto Nacional do Câncer apontam 59.700 novos casos de câncer de mama na população feminina brasileira no ano de 2018 com taxa de mortalidade acima de dezesseis por cento, com 15.403 óbitos pela doença em 2018 nessa mesma população (INCA, 2018). O conhecimento das vias de sinalização do tumor, mecanismos de escape no sistema imunológico, progressão e alterações do perfil molecular são premissas para o desenho de estratégias de tratamento, detecção precoce e quimioprevenção. Apenas a anatomia patológica com o conhecimento da histologia do tumor já não mais atende aos conhecimentos e perfis da expressão clínica do câncer de mama. Pacientes com o mesmo tipo histológico e grupo populacional similar podem apresentar curso clínico bem distinto, resposta diversa a terapia oncológica e prognóstico diferenciado. Das observações clínicas de evoluções distintas surgem as perguntas para a ciência por quê pacientes com características histológicas semelhantes e algumas vezes com perfil psicológico diferentes podem apresentar sobrevida livre de doença também diferentes. Alterações moleculares, bioquímicas e sinalizadores de vias de transmissão pouco conhecidos podem fornecer explicações futuras a cerca do questionamento clínico atual.

O receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA), conhecidamente presente em várias funções e processos no sistema nervoso central, envolvendo cognição, memória, aprendizado, humor e neurodegeneração, também foi identificado em tecidos periféricos relacionado com mecanismos de progressão tumoral. O efeito agonista gerado endogenamente por processos enzimáticos nesses receptores seriam responsáveis pelos mecanismos fisiológicos e patológicos (Van Dongen, 2009; Gonda, 2012). No presente estudo evidenciou-se a imunomarcagem positiva para a subunidade NR2B do receptor NMDA e da indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) em amostras de tecido humanos portadores de câncer de mama (Gráfico 1).

O estudo do bloqueio específico de determinadas subunidades do receptor NMDA poderia promover um aumento dos efeitos fisiológicos

desejáveis e inibir os efeitos indesejáveis. Esse bloqueio específico de subunidades do receptor NMDA, com objetivo de alvo terapêutico, causaria menos efeitos adversos, podendo ser eficaz tanto no bloqueio de mecanismos de crescimento e desenvolvimento de tumores, quanto ser eficaz no tratamento da neurodegeneração. O antagonismo específico do GLUN2B é melhor tolerável que o antagonismo do canal iônico, glutamato ou glicina que afetam todos os tipos de receptores NMDA. O antagonismo do receptor NMDA prolongou a sobrevivência de ratos com câncer de pulmão metastático, sendo discutível sua utilização como alvo terapêutico ou mesmo na quimioprevenção do câncer. Esse bloqueio promoveu em estudos pré-clínicos, a inibição da proliferação de linhagens de câncer de mama, prevenção da disfunção cognitiva da radioterapia cerebral e da dor neuropática pós-mastectomia (Brown, et al. 2013; Pickering, et al. 2014).

O bloqueio do receptor NMDA em associação com a quimioterapia e/ou imunoterapia poderia ser avaliado na redução de dose de agentes quimioterápicos com efeitos adversos pouco tolerados nos seres humanos. Bem como, na redução do uso de opióides para tratamento da dor crônica, muito frequente nos pacientes oncológicos. Entre 25% a 50% dos pacientes tratados com taxanos, alcaloides da vinca e platinos, desenvolvem síndrome neuropática periférica caracterizada com formigamento, dormência, alteração da sensibilidade, sensação de queimação e de choque. A neuropatia periférica induzida pela quimioterapia depende do tipo de agente empregado, da dose administrada e da dose cumulativa (Golan-Vered et al., 2013).

Estudo clínico avaliou a administração profilática da memantina antes do tratamento cirúrgico de pacientes com câncer, sendo o braço da administração da droga com menor tempo de dor no pós-operatório e prevenção da síndrome neuropática periférica (Pickering et al., 2014). A administração de memantina pré-cirurgia preveniu a disfunção cognitiva em modelos animais (Morel et al., 2013). O câncer de mama, bem como a dor crônica induzida pela quimioterapia, podem estar associados à disfunção cognitiva e prejuízo na qualidade de vida, qualidade do sono, ansiedade ou depressão (Golan-Vered et al., 2013; Hedayati et al., 2011). No presente



estudo, não houve resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante e as pacientes ainda apresentaram imunomarcção positiva após a quimioterapia (Gráfico 8).

A detecção de quantidades tóxicas de glutamato é mais um fator que colabora com fisiopatologia que se desenha no câncer. De Groot et al. (2011) observaram que níveis elevados de glutamato estariam relacionados com maior agressividade tumoral em gliomas, maior morte neuronal, crescimento tumoral e episódios de epilepsia. Um questionamento seria se esses níveis são proporcionais aos níveis fisiológicos já identificados nos tecidos ou se os tumores mais agressivos teriam maiores níveis de glutamato que aqueles que apresentam comportamento mais indolente. O antagonismo do glutamato é mais efetivo em suprimir a proliferação de células tumorais periféricas que de origem central, pois muitos compostos conhecidos não atravessam a barreira hematoencefálica em doses terapêuticas toleráveis, portanto sem efeitos neurológicos. O antagonismo do glutamato é mais seguro como alvo terapêutico em tumores sólidos não-centrais, havendo um provável sinergismo entre drogas citotóxicas e antagonistas do glutamato.

Há poucos estudos avaliando o papel regulatório do estradiol nos receptores NMDA em animais. É conhecido o papel que o estrogênio exerce no processo de diferenciação neural durante o desenvolvimento no sexo feminino, com evidências recentes apontando a importância do estradiol na manutenção da função cerebral durante o envelhecimento. Tem sido reportados os efeitos benéficos do estradiol nas desordens do humor, como depressão, síndrome pré-menstrual, depressão pós-parto; bem como em desordens mentais, como esquizofrenia, síndrome de Tourette, além dos benefícios no tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, contudo esses efeitos ainda necessitam de melhor esclarecimento. (Cyr et al, 2011).

Cyr et al. (2011) demonstraram que ratas ooforectomizadas apresentaram decréscimo na função dos receptor NMDA NR 2B no hipocampo, sem afetar o córtex frontal, avaliando o estrogênio e moduladores seletivos dos receptores de estrogênio na regulação desses receptores, e

que esse decréscimo foi prevenido com a tratamento hormonal. No presente estudo, doze amostras eram receptores hormonais positivos (estrógeno e/ou progesterona), tendo quatro apresentando imunomarcacão fraca, sete com marcação moderada e uma com marcação intensa para NMDA NR 2B (Gráfico 6).

O tamoxifeno tem ação agonista e antagonista nos receptores de estrogênio a depender do tipo de tecido alvo, é utilizado na prevenção e tratamento do câncer de mama devido sua ação antagonista no tecido mamário, embora com efeito estrogênico em outros tecidos. O Raloxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrogênio de segunda geração com ação antagonista na mama e no útero, mas com função agonista no metabolismo do colesterol e no metabolismo ósseo, utilizado no tratamento da osteoporose. O mecanismo de ação do tamoxifeno e do raloxifeno na modulação dos receptores NMDA em regiões cerebrais necessita de investigação futura. Cyr et al. (2011) sugerem que o efeitos desses dois anti-estrogênios não-esteroidais podem ser os mesmos que do estradiol. O estradiol pode aumentar a expressão dos receptores de serotonina no cérebro de ratas e que o raloxifeno minimiza esses efeitos. Estradiol, tamoxifeno e raloxifeno, por modulação nas subunidades NR1 e NR2B dos receptores NMDA primariamente na região do hipocampo e córtex singular, podem ter efeito benéfico na doença de Alzheimer e esquizofrenia.

No estudo em questão, observou-se que a paciente com estratégia de tratamento de castração química central com acetato de goserrelina (receptores hormonais positivos) apresentou sobrevida livre de doença de 10 anos, estadiamento II, com imunomarcacão intensa para receptor NMDA NR 2B (amostra 2).

Nos últimos anos, a degradação do triptofano tem recebido a atenção de pesquisadores devido ao envolvimento em mecanismos de tolerância imunobiológica. A indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima que catalisa a degradação do aminoácido triptofano levando ao acúmulo de seus metabólitos, as quinureninas. A enzima inicial e limitante da quebra do aminoácido essencial. Os ácidos quinolínico e quinurênico são produtos

gerados pela via das quinureninas. O ácido quinolínico atua como agonista do receptor NMDA, promovendo excitotoxicidade neuronal, disfunção mitocondrial, geração de radicais livres. O ácido quinurênico age como antagonista do receptor NMDA, inibindo esses processos. Possivelmente esses compostos poderiam ser dosados e também correlacionados com níveis de expressão do receptor NMDA e associados com suas repercussões clínicas. O consumo do triptofano pela via das quinureninas, diminui a síntese de serotonina e de melatonina. A melatonina está relacionada com diminuição de parâmetros inflamatórios, ação imunomodulatória, sendo considerada com agente adjuvante na terapia oncológica (Sousa Neto et al., 2005).

É conhecido que aIDO protege o conceito do ataque do sistema imune materno, tendo sido explorada na imunomodulação. AIDO é produzida em muitos tipos de células do sistema imune, incluindo células dendríticas, macrófagos e células T reguladoras, em resposta a liberação de endotoxinas e secreção de interferon  $\gamma$ . Está também relacionada nas desordens no sistema imune e no escape antitumoral. AIDO tem sido correlacionada com pior prognóstico em muitos tipos de cânceres, incluindo coloretal, da cérvix uterina, endometrial, mama, melanoma, ovário e pulmão (Opitz et al., 2011).

Estudo clínico com pacientes com melanoma maligno mostrou que houve uma grande expressão da enzimaIDO no tumor primário e na metástase correspondente em pacientes com pouca chance de sobrevida. No entanto, foi evidenciado que a enzima não estava presente ou estava pouco expressa nos pacientes que apresentavam maior chance de sobrevida. O estudo relata a participação daIDO no processo de metástase tumoral (Brody et al., 2009). Há evidências, na presente pesquisa, que a imunomarcagem daIDO após a quimioterapia neoadjuvante apresentou-se de forma moderada, com uma aparente imunomarcagem fraca NMDA NR2B após a quimioterapia (Quadro 3) (Gráfico 8), sendo um caso com metástase cerebral após 24 meses de tratamento (amostra 6).

O aumento da expressão daIDO correlaciona-se com diversos parâmetros de progressão tumoral e menor sobrevida dos pacientes, sendo

considerada uma fator de prognóstico independente podendo ser utilizada como marcador tumoral e alvo terapêutico. Estudo clínico tem avaliado o papel do 1-metil-triptofano, inibidor da IDO, na imunoterapia do câncer. A inibição da IDO restauraria a imunidade antitumoral sendo um aliado a quimioterapia convencional. O 1-metil-triptofano (MT), inibidor da IDO, tem sido estudado como agente anti-cancerígeno associado com quimioterapia com docetaxel em pacientes portadores de tumores sólidos metastáticos (Soliman et al., 2014).

O exato papel do catabolismo do triptofano pela IDO em cânceres humanos permanece desconhecido, o que torna necessário a condução de estudos que possam atingir esse objetivo (Godin-Ethier et al., 2011). Alguns mecanismos tem sido propostos: primeiro, a degradação do triptofano levaria a parada na fase G1, aumentando a susceptibilidade à apoptose dos linfócitos T. Segundo, metabólitos gerados a partir da quebra do triptofano são tóxicos para os linfócitos T e células *Natural Killer* (Munn et al., 2007). E terceiro, a IDO tem a habilidade de converter células T nativas em células T reguladoras (Treg). A expressão da IDO foi associada com menor números de linfócitos CD8+ intratumoral. Também foi associada com pior prognóstico mesmo em fases iniciais de tumores, com menor sobrevida livre de doença. As células cancerígenas consomem triptofano competindo com os linfócitos T, para manter um nível basal de triptofano intracelular, a IDO induziria a expressão de um transportador do aminoácido verificado em modelos humanos e animais (Silk et al., 2011).

A presença de um estado imunossupressivo envolvendo redução dos leucócitos HLA induzido por citocinas imunossupressoras, essa redução dos linfócitos T CD8+ no infiltrado tumoral (TIL), combinados com indução de Foxp3+ (Treg cells) foram associados com progressão da carcinogênese nos tumores da cérvix uterina (Piersma et al., 2007; Nedergaard et al., 2007).

Bates et al. (2006) quantificaram Foxp3+ Tregs no carcinoma *in situ* e invasivo no câncer de mama, sendo que o número de Foxp3+ Tregs foi correlacionado com aumento do risco de recorrência e maior envolvimento linfonodal. Ladoire et al. (2008) demonstraram que a taxa de resposta clínica

à terapia neoadjuvante em regimes contendo antracíclicos foi associada com o *clearance* de células Foxp3+ do tumor primário. Esses achados indicam a participação do sistema imune na depleção de células cancerígenas no contexto da quimioterapia citotóxica. O número de células Tregs encontrados nos linfonodos metastáticos do melanoma foi maior que nos linfonodos livres de neoplasia (Viguier et al., 2004). As expressões de IDO foram detectadas no linfonodo sentinela do melanoma (Polak et al., 2007).

Nas últimas décadas, a terapia imune tem sido utilizada em muitos tipos de cânceres, seja através de anticorpos monoclonais ou adjuvantes imunes. A terapia alvo à IDO restauraria a perda da imunidade antitumoral. Em tumores murinos, a associação do 1-MT com quimioterápicos promoveu um efeito sinérgico na regressão do câncer de mama e melanoma (Muller et al., 2005; Hou et al., 2007). A combinação de 1-MT com paclitaxel em tumores humanos reduziu significativamente o crescimento tumoral no câncer endometrial em comparação com paclitaxel sozinho. O uso isolado do 1-MT não mostrou alterar a sobrevivência de ratos, indicando que o 1-MT não teria efeito citotóxico, mas intensificaria o efeito da quimioterapia em tumores que superexpressam a IDO (Yoshida et al., 2008).

Recentemente, surgiram evidências da participação da Triptofano-2,3-Dioxigenase (TDO) na progressão do câncer através do receptor *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AHR). Esse receptor está envolvido em uma variedade de processos celulares, como carcinogênese e progressão do ciclo celular, sendo constitutivamente gerado por células tumorais humanas através da enzima hepática TDO (Gramatzki et al., 2009; Safe et al., 2013). Especulou-se que o primeiro catabólito da via do triptofano, a quinurenina, age como um ligante endógeno do receptor AHR. A quinurenina gerada pela ação da TDO suprime as respostas imunitárias antitumorais e promove a sobrevivência e motilidade de células tumorais através do receptor AHR de uma forma autócrina/parácrina. Dessa forma, foi estabelecido que a via TDO-AHR é ativa em tumores cerebrais humanos e está associada com progressão maligna e fraca sobrevivência (Opitz et al., 2011).

Os fatores prognósticos contribuem para a avaliação do risco de recaída de pacientes baseados em indicadores tais como a biologia molecular intrínseca tumoral, o estadiamento da doença ao diagnóstico, sendo tradicionalmente utilizados para a escolha dos pacientes que poderão ser poupados da terapia adjuvante desnecessária. A presença ou ausência de metástases linfonodais, a dimensão tumoral, o grau nuclear e o tipo histológico já são aceitos como fatores prognósticos bem definidos no câncer de mama. A invasão vascular linfática é outro fator prognóstico importante, visto que quando confirmada, histologicamente, está associada a um risco aumentado de doença metastática, ao aumento do risco de recidiva local e à redução da sobrevida. Os carcinomas ductais apresentam bom prognóstico com índices de 60 a 80% de sobrevida em 10 anos. (Kos et al., 2016). No presente estudo, todas as amostras foram do tipo ductal, com características de invasividade em doze amostras. Cinco pacientes apresentavam linfonodos axilares positivos (Quadro 3) (Gráfico 4). Doze amostras tinham estadiamento I ou II, tendo sete amostras apresentando imunomarcagem fraca para NMDA NR2 (Gráfico 2, 3).

A sobrevida em câncer é o parâmetro mais utilizado para avaliar os resultados do diagnóstico e tratamento em registros de saúde. A idade do paciente ao diagnóstico, o tamanho do tumor, o número de linfonodos comprometidos, o grau de diferenciação tumoral, o subtipo molecular e o estadiamento clínico são os principais parâmetros utilizados para se avaliar a sobrevida em câncer e têm um papel fundamental no planejamento do tratamento da doença. (INCA, 2018). Também tem importância na alocação de recursos e na identificação de fatores prognósticos distribuídos por região e população, impacto na qualidade de vida e na população economicamente ativa para o Estado e na estratégia de planejamento de rastreamento para o câncer de mama. No presente estudo, nove pacientes tinham mais de 50 anos ao diagnóstico, tendo cinco pacientes imunomarcagem moderada para NMDA NR 2B (Gráfico 5).

O *Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2* (HER2) tem importância no crescimento e desenvolvimento de células epiteliais. O Gene

*HER2* é responsável pela produção da proteína HER2, é um proto-oncogene. Um erro aleatório pode levar ao desenvolvimento de tumores. No tecido mamário deverá ser pesquisado o aumento ou superexpressão do HER2, o que corresponde ao subtipo molecular de câncer de mama HER2 positivo, que está associado a maior agressividade da doença. Quando o HER2 está amplificado, resulta em várias cópias do Gene, havendo produção excessiva da proteína HER2, com aumento da multiplicação e crescimento celular, responsável pela progressão do câncer, com comportamento tumoral mais agressivo e com piores respostas às terapêuticas convencionais. Estudo tem sugerido que existe uma relação entre o *status* do *HER2* e a resistência hormonal (Bacchi et al., 2013). No presente estudo, verificou-se a presença de oito amostras HER2 positivas, sendo duas com imunomarcacão fraca, cinco com marcação moderada e uma com marcação intensa (Gráfico 7).

Dessa forma, especula-se que a interação entre condições de sobrevivência e o sistema imune possam causar um aumento na susceptibilidade clínica em desenvolver doenças infecciosas ou tumores malignos ou que possam agravar o quadro clínico de uma doença já estabelecida, como o câncer.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo, todas as quinze amostras de câncer de mama ductal avaliadas apresentaram imunomarcção positiva para o receptor NMDA NR2B e para a enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO 1). Tumores menores e de evolução clínica favorável apresentaram uma aparente associação positiva com marcação de fraca intensidade para NMDA NR 2B. Pacientes com axila positiva, linfonodos clinicamente palpáveis, apresentaram uma tendência a marcação moderada para NMDA NR2B e intensa para IDO 1. Os casos com metástase óssea e cerebral apresentaram também marcação expressiva para o receptor NMDA NR2B e a enzima IDO 1. Para as pacientes receptores hormonais positivas e HER2 positivas também houve imunomarcção para NMDA NR2B. As amostras triplo negativo apresentaram imunomarcção fraca para NMDA NR 2B e moderada a intensa para a IDO. Pacientes com mais de 50 anos, apresentaram marcação moderada para NMDA NR2B e IDO 1, com taxas variadas de resposta ao tratamento oncológico. Do grupo de pacientes que foi submetido a quimioterapia neoadjuvante, não houve resposta patológica completa, e todas as amostras apresentaram imunomarcção para NMDA NR2B e IDO 1, sendo observada uma menor intensidade de marcação para NMDA NR2B.

A literatura atual demonstra a relevância de se conhecer a biologia e expressão dos receptores NMDA, a via das quinureninas e a enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) durante a tumorigênese em consequência de sua estimulação e desequilíbrio. Dessa forma, uma melhor compreensão do papel da IDO na carcinogênese e na progressão tumoral é necessária para o entendimento do efeito farmacofisiológico dos inibidores dessa enzima e para que isso possa proporcionar uma base racional para aplicação terapêutica em pacientes oncológicos e o desenvolvimento de estratégias de quimioprevenção no câncer. Os receptores NMDA estão emergindo como um possível alvo para o tratamento do câncer, sendo necessários estudos na tentativa de melhor caracterizá-lo como possível marcador molecular no câncer de mama, com o objetivo futuro de servir como alvo terapêutico e beneficiar grupos específicos de pacientes.



## LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A despeito do câncer de mama apresenta-se estatisticamente como a neoplasia maligna mais frequente na população feminina mundial, o presente trabalho apresentou limitação no número de amostras possivelmente devido a pulverização dos serviços de tratamento em câncer; ausência de um centro facilitador de pesquisas em oncologia envolvendo seres humanos em parceria com outras instituições, em especial, as Universidades Federais, uma vez que o controle do tratamento do câncer encontra-se sob a tutela do Estado e/ou Município. Esse cenário dificulta o acesso ao material biológico, aos dados clínicos, ao seguimento dos pacientes, a aquisição de insumos para pesquisa, aos termos de consentimento informado e conseqüentemente, as publicações científicas. Em oncologia, os estudos multicêntricos são fundamentais para resultados expressivos e de impacto populacional, critica que deixamos para que o isso seja uma realidade não tão distante no nosso país. Considerando o fato do Brasil ser um país populoso, com diversidade de etnias, os governos e centros de tratamento de câncer devem atuar como intermediadores e promover a integração entre os centros de pesquisa que se propõem a contribuir no conhecimento e desenvolvimento de estratégias para tratamento do câncer, em especial, tumores que não respondem as terapias convencionais, tumores raros, com altas taxas de mortalidade, bem como em pesquisa de protocolos eficazes e na redução de custos no tratamento do câncer.

Nessa contexto, o presente trabalho propõe como perspectivas futuras: ampliar a amostra para câncer de mama triplo negativo, por ser um subtipo molecular com taxa de resposta limitada ao tratamento; quantificar o Ki 67; validar um método para quantificar a imunomarcção para o receptor NMDA NR2B, uma vez que não há relatos na literatura se apenas a imunomarcção reagente seria suficiente ao ser considerada apenas como positiva; verificar o *status* do receptor NMDA NR2B no tecido fresco e sua ativação; avaliar taxas de resposta ao tratamento considerando o bloqueio duplo do receptor NMDA NR2B e da enzima IDO em pacientes portadores de câncer de mama avançado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTIAGIANO S., MORANDI B., COSTA R. et al. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. *Neoplasia*. 7: 390-396, 2005.

BACCHI C.E. et al. Subtipos moleculares de câncer de mama. In KATZ, A. *Câncer de mama*. Permanyer, 2013.

BADVE S. et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* 24: 157-167, 2011.

BARAB H. et al. Kynurenic acid influences the respiratory parameters of rat heart mitochondria. *Pharmacology* 62: 119-123, 2001.

BATES G.J., FOX S.B., HAN C. et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24(34): 5373-5380, 2006.

BEHAN W.M.H. et al. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J Pharmacol* 128:1754-1760, 1999.

BIRCH P.J. et al. Kynurenic acid antagonizes responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur J Pharmacol* 154: 85-87, 1998.

BORDELON Y.M. et al. Energetic dysfunction in quinolic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69: 1629-1693, 1997.

BRADACHER G., PERATHONER A., LADURNER R. et al. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 12: 144-1151, 2006.

BRODY J. R. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle*. Vol. 8(12):1930-4, 2009.

BROW P.D., PUGH S. et al. Memantine for the prevention of cognitive dysfunction in patients receiving whole-brain radiotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neuro-Oncology* 15: 1429-1437, 2013.

CARREIRA M.C., STILLMANN R.C. Phencyclidine (PCP) Abuse: An Appraisal in *NIDA Research Monograph 21*. National Institute on Drug Abuse, USA, 1978.

CAVALHEIRO E.A. et al. Glutamate antagonists: Deadly liaisons with cancer. *PNAS*, v.98, n.11, p. 5947-5948, 2001.

CHEANG M.C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101: 736-750, 2009.

COLLINGRIDGE G.L. et al. The NMDA receptor as a target for cognitive enhancement. *Neuropharmacology* 64, 13-26, 2013.

COYLE J.T. et al. Glutamatergic synaptic dysregulation in schizophrenia: therapeutic implications. *Handb. Exp. Pharmacol.* 213, 267-295, 2012.

CYR M., THIBAUT C. et al. Estrogen-like Activity of Tamoxifen and Raloxifene on NMDA Receptor binding and expression. of its subunits in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 5 (2), 242-287, 2011.

DE GROOT J., SONTHEIMER H. Glutamate and the biology of gliomas. *Glia* 59: 1181-1189, 2011.

DEUTSCH S.I., TANG A.H. et al. NMDA receptors on the surface of cancer cells. Target for chemotherapy? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 68: 493-496, 2014.

DEVITA V.T.Jr. et al. Malignant Tumors of Breast. In *Cancer Principles & Practice of Oncology*. 9<sup>th</sup>. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2011.

DUHADAWAY J.B., SAKAMURO D., et al. Bin1 mediates apoptosis by c-Myc in transformed primary cells. *Cancer Res.* 16, 3151–3156, 2001.

FRUMENTO G., ROTONDO R., et al. Thiptofan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 196: 459-468, 2002.

GEYE F.C. et al. Genetic characterization of breast cancer and implications for clinical management. *J Cell Mol Med*, 13: 4090-4103, 2009.

GODIN-ETHIER, J. et al. Indoleamine 2,3- Dioxygenase expression in human cancers: Clinical and immunologic perspectives. *Clin Cancer Res* 17(22), 2011.

GOLAN-VERED Y., PUD D. Chemotherapy-induced neuropathic pain and its relation to cluster symptoms in breast cancer patients treated with paclitaxel. *Pain Pract* 13: 46-52, 2013.

GONDA X. Basic Pharmacology of NMDA Receptors. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, n.5, p. 1558-1567, 2012.

GRAMATZKI D. et al. Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF- $\beta$ /Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*, v. 28, n. 28, p. 2593–2605, 2009.

GROTTA J.; CLARK, W. et al. *Stroke* 26: 602-605, 1995.

HEDAYATI E., SCHEDIN A. et al. The effects of breast cancer diagnosis and surgery on cognitive functions. *Acta Oncol* 50: 1027-1036, 2011.

HERDERSON G. et al. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of mouse NMDA receptors. *J Physiol* 430: 189-212, 1990.

HDANOVA I.V. et al. Melatonin: a sleep-promoting hormone. *Sleep* 20 (10): 899-907, 1997.

HOU D.Y., MULLER A.J., SHARMA M.D., DUHADAWAY J., BANAJEE T., JOHNSON M., MELLOR A.L. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res* 67:792–801, 2007.

INABA T., INO K., KAJIYAMA H., YAMAMOTO E., SHIBATA K., NAWA A. et al. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 115: 185-192, 2009.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa - Incidência do Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2018. *Rio de Janeiro. Disponível* <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Atualização em 26/11/2018.

INO K., YOSHIDA N., KAJIYAMA H., SHIBATA K. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br J Cancer* 95: 1555-1961, 2006.

JIA Y., WANG H., WANG Y., WANG T., WANG M., et al. Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients. *Int. J. Cancer*, 137: 1095–1106, 2015.

KHASPEKOV L. et al. Neurotoxic effect induced by quinolinic acid in dissociated cell culture of mouse hippocampus. *J Neurosci Res* 22: 150-157, 1989.

KIM J.P. et al. Quinolinic acid neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience* 23:423-432, 1987.

KOS Z., DABBS D.J. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. *Histopathology* 68 (1): 70-85, 2016.

LADOIRE S., ARMOULD L., APETOH L., et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 14 (8): 2413-2420, 2008.

LAU C.G.; ZUKIN R.S. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 413-426, 2008.

LEHMANN B.D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2750, 2011.

LEV KOVITZ Y. et al. Differential Introduction of Apoptosis by Antidepressants in Glioma and Neuroblastoma Cell Lines. *Journal of molecular neuroscience* 27: 29-42, 2005.

LUKSCH H. et al. Silencing of selected glutamate receptor subunits modulates cancer growth. *Anticancer research* 31 (10): 3181-3192, 2011.

MAES M. et al. The new '5HT' hypothesis of depression: Cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Progress in Neuro-Phychopharmacology and Biological Psychiatry* 35 (3): 702-721, 2011.

MANSFIELD A.S., HEIKKILA P.S. et al. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *Cancer* 9: 231-240, 2009.

MONY L., KRZACZKOWSKI M. et al. *Mol. Pharmacol.* 75: 60-74, 2009.

MOREL V., ETIENNE M., WATTIEZ A.S. et al. Memantine, a promising drug for prevention of neuropathic pain in rat. *Eur J Pharmacol* 721: 382-390, 2013.

MULLER A.J., DUHADAWAY J.B. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 11: 312-319, 2005.

MUNN D.H., SHARMA M.D., HOU D., BABAN B. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114: 280-290, 2004.

MUNN D.H., MELLOR A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin. Invest.* 117: 1147-1154, 2007.

NAHM W.K.; PHIPOT B.D. et al. Significance of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated signaling in human keratinocytes. *J Cell Physiol* 200: 309-317, 2004.

NAKAMURA T., SHIMA T., SAEKI A. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci* 98: 874-881, 2007.

NEDERGAARD B.S., LADEKARL M., THOMSEN H.F. et al. Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer* 97:1135-8, 2007.

NICIU M.J., HENTER D.A. et al. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54: 119-139, 2014.

NORTH W.G. et al. Breast cancer expresses functional NMDA receptors.

Breast cancer research and treatment, v. 122, n. 2, p. 307-314, 2010.

OPITZ C. A. et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478 (7368): 197–203, 2011.

OPITZ C.A. et al. The Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitor 1-Methyl-D-tryptophan Upregulates IDO1 in Human Cancer Cells. *PLoS ONE* 6 (5): e19823, 2011.

ORY-MAGNE F., CORVOL, J.C., AZULAY, J.P. et al. *Neurology* 82: 300-307, 2014.

OXENKRUQ G.F. Tryptophan kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environment impacts in major depressive disorder: the serotonin hypothesis revised 40 years later. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 47(1): 56-63, 2010.

PAOLETTI P. et al. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 14(6): 383-400, 2013.

PAN K.E, WANG H., CHEN M., ZHANG H. et al. Expression and prognosis role of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 1247-1253, 2008.

PARSONS C.G., STOFFLER, A, DANYSZ, W. *Neuropharmacology* 38: 699-723, 2007.

PERKINS M.N. et al. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Res* 247: 184-187, 1982.

PICKERING G.; MOREL, V. et al. Prevention of post-mastectomy neuropathic pain with memantine: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 15: 331, 2014.

PIERSMA S.J., JORDANOVA E.S. et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 67:354–61, 2007.

POLAK M.E., BORTHWICK N.J. et al. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 96 (12):1879-1887, 2007.

RANG H.P. et al. Aminoácidos transmissores. In *Farmacologia*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

ROTHMAN S.M. *J Neurosci* 4, 1984.

SAFE S., LEE S-O, JIN U-H. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Carcinogenesis and Potential as a Drug Target. *Toxicological Sciences* 135

(1):1-16, 2013.

SANTAMARIA A. et al. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12: 2693-2696, 2001.

SEIDLITZ E.P., SHARMA, M.K. et al. Cancer cell lines release glutamate into the extracellular environment. *Clin Exp Metastasis* 26: 781-787, 2009.

SILK J.D., LAKHAL S., LAYNES R., VALLINUS I. et al. IDO induces expression of a novel tryptophan transporter in mouse and human tumor cells. *J Immunol* 187: 1617-1625, 2011.

SKERRY T.M. et al. Glutamate signaling in non-neuronal tissues. *Pharmacological Sciences* 22: 4, 2001.

SOLIMAN H.H., JACKSON E., NEUGER T., DEES E.C. et al. A first in man phase I trial of the oral immunomodulator, indoximod, combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget* 30; 5 (18): 8136-8146, 2014.

SOUSA NETO J.A. et al. Melatonina e câncer. Revisão da literatura. *Rev Bras Can* 51 (1): 48-58, 2005.

STEPULAK A. et al. NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *PNAS* 102 (43): 15605-15610, 2005.

STONE T.W., DARLINGTON L.G. Endogenous kynurenines as target for drug discovery and development. *Nat. Rev Drug Discov* 1: 609-620, 2002.

STROEBEL D., PAOLETTI P. *Nature* 511: 162-163, 2014.

SUZUKI M. Role of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in postoperative pain management. *Current Opinion in Anaesthesiology*. London, v. 22, n 5, p 618-622, 2009.

SWANN J.B. et al. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117 (5): 1137-1146, 2007.

TAJIRI T. et al. Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 9, 3345–3355, 2003.

TAKANO T., LIN J.H. et al. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 7: 1010-1015, 2001.

TRAYNELIS S.F, WOLLMUTH L.P. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function. *Pharmacol Rev* 62: 405-496, 2010.

VIGUIER M., LEMAITRE F., VEROLA O. et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic

melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173 (2):1444-1453, 2004.

VAN DER HAGE J.A., VAN DE VELDE C.J. et al. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol* 2001; 19:4224-4237.

YOSHIDA N., INO K., ISHIDA Y., KAJIMA H. et al. Overexpression of indoleamine 2,3- dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res* 14:7251–7259, 2008.

WATANABE K. et al. The NMDA receptor NR2B subunit regulates proliferation of MKN45 human gastric cancer cells. *The Biochemical and Biophysical Research Communications* 367: 487-490, 2008.

WONG E.H.F., KEMP J.A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83: 7104-7108, 1986.