UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Igor Visconte Gonçalves

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE TUMOR DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Belo Horizonte
2023

Igor Visconte Gonçalves

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO DE TUMOR DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Liza Figueiredo Felicori Vilela

Belo Horizonte

2023

043 Gonçalves, Igor Visconte.
Avaliação da resposta imune humoral ao longo do desenvolvimento de tumor de mama triplo-negativo [manuscrito] / Igor Visconte Gonçalves. – 2023.
168 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Liza Figueiredo Felicori Vilela.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Imunidade. 3. Imunoterapia. 4. Neoplasias de Mama Triplo Negativas. 5. Subpopulações de Linfócitos B. I. Vilela, Liza Figueiredo Felicori. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1

Ficha catalografica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis - CRB 6 2680

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE IGOR VISCONTE GONÇALVES. Aos dezoito dias do mês de dezembro de 2023 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação da resposta imune humoral ao longo do desenvolvimento de tumor de mama triplo-negativo", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Liza Figueiredo Felicori Vilela, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. João Muzzi (Universidade Federal do Paraná), aprovado; Dra. Cecília Cavazzoni (Brigham and Women's Hospital, Massachussets, EUA), aprovado; Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz/MG), aprovado; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

☒ APROVADO
( ) REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2023.

Dr. João Muzzi (Universidade Federal do Paraná)

Dra. Cecília Cavazzoni (Brigham and Women's Hospital, Massachussets, EUA)

Dr. Helton da Costa Santiago (Universidade Federal de Minas Gerais)

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz/MG)

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Miriam Visconte e Erly Gonçalves Moreira Jr., ao meu irmão Douglas Visconte e avós, Maria de Lourdes, Antônio Francisco dos Santos, Erly Gonçalves Moreira, Marilene Tavares Moreira pelo carinho e suporte incondicionais ao longo dos últimos anos, sempre dispostos a ajudar nos momentos necessários. A minha parceira de longa data Letícia S. Elias, pela resiliência em todos estes anos e sempre disposta a me ajudar desde os primeiros passos na pós-graduação, me incentivando e contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha orientadora, Profa. Liza Felicori, por ter me acolhido ainda durante o período de Mestrado e ter se envolvido com o projeto desde então, sempre visando aprimorar a pesquisa e estimulando os próximos passos, que fique expressa minha gratidão e admiração por sua dedicação enquanto pessoa e orientadora!

Aos professores e pesquisadores que estiveram envolvidos de alguma forma no projeto, Ana Maria Caetano pelo incentivo e ideias para condução do projeto de pesquisa desde sua concepção ainda durante o Mestrado e até o presente momento de conclusão desse projeto no Doutorado. Helton da Costa Santiago, Dawidson Assis Gomes e Adriana Cesar Bonomo pelas orientações pertinentes ao aprimoramento do objeto de pesquisa.

Aos excelentes pesquisadores e parceiros essenciais do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Mariana Boroni, Gabriela Raposo, Giovanna Resk, Martín Bonamino, que contribuíram de forma importante para a execução do projeto e análises necessárias. Ao professor Ênio Ferreira, Emerson Veloso, Flávia Aguiar por toda a ajuda conferida na execução de experimentos fundamentais para confecção da presente tese.

Ao professor Gabriel Victora por ter me aceito em seu laboratório para execução do projeto de pesquisa durante o período sanduíche, pelo qual tive acesso a uma nova escola de pensamento científico e que contribuiu não somente para o engrandecimento profissional, mas também pessoal. Sua trajetória de vida será uma eterna inspiração, e sou eternamente grato. Aos colaboradores, Profa. Miriam Lopez e Catarina Carneiro pelo suporte científico e técnico.

A todos os amigos e membros dos laboratórios Synbiom, LIB, e *Laboratory of Lymphocyte Dynamics* por terem acompanhado e auxiliado a condução do projeto ao longo

destes anos: Marcella, Regina, Marcele, Milene, Laís, Viviane, Luan, Manuela, Christina, João, Raniele, Yala, Glória, Lígia, Rafaela, Lícia, Natália, Felipe, Mariana, Marcos, Renan, Kevin, Alvaro, Ariën, Alex B, Aleksey, Jana, Ashni Leo, Tom, Juhee, Sandra, Thiago, Luka, Marije, Johanne.

Em especial, a Juliana Bortolatto, Cecílio Ferreira e Isadora por terem me auxiliado em todos os momentos possíveis enquanto estive no período sanduíche.

A Ildinha, Luciana e Hermes pelos auxílios técnicos prestados ao longo dos últimos anos enquanto aluno do programa de pós graduação em Bioquímica e Imunologia.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

As agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), sem os quais não teria sido possível a execução do projeto científico.

“If I have seen further,
it is by standing on the shoulders of giants”

Sir. Isaac Newton

RESUMO

Caracterizado pela ausência de receptores de progesterona (PR), estrógeno (ER), e fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), tumores de mama triplo-negativo (TNBC) são frequentemente associados a um pior prognóstico, recidiva precoce da doença, além do número limitado de tratamentos. Apesar disso, é o subtipo que apresenta maior atividade imunológica, pelos quais infiltrado linfocitário intenso é visto com maior frequência, e sua presença associado a um melhor prognóstico e melhores taxas de resposta ao tratamento. Embora presentes, o impacto do desenvolvimento de neoplasias de mama triplo-negativas sob a dinâmica de linfócitos B, assim como o efeito de modalidades terapêuticas emergentes nesta resposta imunológica humoral ainda é pouco conhecida. Reportamos que o desenvolvimento de tumores de mama experimentais induzidos por células 4T1 e E0771 acarretaram na elevação de linfócitos B no linfonodo drenante dos animais em período ainda inicial da carcinogênese. Embora não tenham sido observados diferenças significativas para populações B regulatórias B10, observamos elevação no número de linfócitos B LAG-3, fenótipo este com elevada expressão de IgD, sugerindo estágios iniciais de ativação. Este fenótipo foi novamente encontrado na análise de transcritoma utilizando dados de pacientes com câncer de mama, sendo verificado em parcela de células B de centro germinativo, população que junto a linfócitos B naïve e de memória estavam associados a melhor taxa de progressão livre de doença. Adicionalmente, demonstramos que embora o tratamento combinatório por anti-PD-1 + anti-LAG-3 tenha reduzido o volume tumoral e contribuído para a elevação de linfócitos TCD4 e TCD8 no microambiente tumoral, alterações não foram observadas para linfócitos B após esse tratamento. Embora o tratamento combinatório tenha acarretado em expansão significativa de células B de centro germinativo e plasmócitos no linfonodo drenante dos animais, assim como elevação de IgG1 no soro, estes anticorpos não foram capazes de melhor reconhecer antígenos proteicos tumorais. Os resultados sugerem que tumores triplo-negativo contribuem para resposta imunológica humoral diversa, caracterizada por elevada diversidade celular. Apesar da detecção dos diferentes fenótipos, ensaios funcionais são essenciais para determinar as funções associadas a cada uma destas células, em condições patológicas e sob tratamento.

Palavras-chave: TNBC; Infiltrado linfocitário, Resposta imune humoral, imunoterapia;

ABSTRACT

Characterized by the absence of progesterone (PR), estrogen (ER), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), triple-negative breast cancer (TNBC) is often associated with a worse prognosis, early disease recurrence, and a limited number of treatment options. Despite this, it is the subtype that exhibits the highest immune activity, with a presence of intense lymphocytic infiltration, which is associated with a better prognosis and higher treatment response rates. Although present, the impact of the development of triple-negative breast neoplasms on the dynamics of B lymphocytes, as well as the effect of emerging therapeutic modalities on this humoral immune response, is still poorly understood. Here, we report that the development of experimental breast tumors induced by 4T1 and E0771 cells resulted in an increase in B lymphocytes in the draining lymph node of animals in the early stages of carcinogenesis. While no significant differences were observed for regulatory B10 populations, we observed an increase in the number of LAG-3-expressing B lymphocytes, a phenotype with high expression of IgD, suggesting early stages of activation. This phenotype was also found in the transcriptome analysis using data from breast cancer patients, being verified in a portion of germinal center B cells, a population that, along with naive and memory B lymphocytes, was associated with a better progression-free survival (PFS) rate. Additionally, we demonstrated that although the combination treatment with anti-PD-1 + anti-LAG-3 reduced tumor volume and contributed to the increase of CD4 and CD8 T lymphocytes in the tumor microenvironment, no changes were observed for B lymphocytes after this treatment. Although the combination treatment led to a significant expansion of germinal center B cells and plasma cells in the draining lymph node of the animals, as well as an elevation of IgG1 in the serum, these antibodies were not able to better recognize tumor protein antigens. The results suggest that triple-negative tumors contribute to a diverse humoral immune response, characterized by high cellular diversity. Despite the detection of different phenotypes, functional assays are essential to determine the functions associated with each of these cells under pathological conditions and treatment.

Keywords: TNBC; Lymphocytic infiltration, Humoral immune response, Immunotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA1	*Breast cancer type 1 susceptibility protein*
BRCA2	*Breast cancer type 2 susceptibility protein*
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
TP53	*Tumor protein p53*
STK11	*Serine/Threonine kinase 11*
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
IHQ	Imuno-histoquímica
FISH	*Fluorescence in situ hybridization*
TNBC	*Triple-negative breast cancer*
CNA	*Copy number alteration*
MHC-I	*Major histocompatibility complex class I*
MHC-II	*Major histocompatibility complex class II*
LLT1	*Lectin-like transcript-1*
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
FGF	*Fibroblast growth factor*
G-CSF	*Granulocyte colony-stimulation factor*
tDLN	*tumor-draining lymph node*
TLS	*Tertiary lymphoid structure*
Fas	*Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*
ER	*Estrogen receptor*
PR	*Progesterone receptor*
HER	*Human epidermal receptor*
TILs	*Tumor-infiltrating lymphocytes*
OS	*Overall survival*
DFS	*Disease-free survival*
RFS	*Relapse-free survival*
IFN-ɣ	*Interferon gamma*
IL-2	*Interleukin 2*
Treg	*T regulatory cell*
TME	*Tumor microenvironment*
ASC	*Antibody-secreting cell*
Breg	*B regulatory cell*

LAG-3	*Lymphocyte activation gene 3*
PD-1	*Programmed cell death protein 1*
PD-L1	*Programmed death-ligand 1*
CTLA-4	*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*
TIM-3	*T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*
IL-35	*Interleukin 35*
IL-10	*Interleukin 10*
TGF-β	*Transforming growth factor β*
PBS	*Phosphate-buffered saline*
PMN	*Polymorphonuclear*
MN	*Mononuclear*
tSNE	*t-distributed Stochastic Neighbor Embedding*
TSAs	*Tumor-specific antigens*
TAAs	*Tumor-associated antigens*
GC	*Germinal center*
GZMB	*Granzyme B*
NFAT	*Nuclear factor of activated T-cells*
SLOs	*Secondary lymphoid organs*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origem e classificação dos tumores de mama.....21

Figura 2. Subtipos intrínsecos moleculares de tumores triplo-negativo.....22

Figura 3. Interface imunológica durante a carcinogênese mamária.....24

Figura 4. Interação entre diferentes células e funções no microambiente tumoral de mama.....27

Figura 5. Formação de TLS e estrutura e funções celulares.....31

Figura 6. Estratégia de *gating* utilizada para análise de populações de origem linfoide e mielóide.....48

Figura 7. Estratégia de *gating* utilizada para análise de subpopulações de linfócitos B.....50

Figura 8. Estratégia de *gating* utilizada para análise de subpopulações de linfócitos B de centro germinativo e plasmócitos.....52

Figura 9. Estratégia de *gating* utilizada para análise de subpopulações de linfócitos B e T. 53

Figura 10. Análise comparativa por xCell entre amostras normais e tumorais.....60

Figura 11. Análise comparativa por CIBERSORTx entre amostras normais e tumorais.....60

Figura 12. *Heatmap* para pontuações de subpopulações de linfócitos B.....61

Figura 13. Avaliação e anotação de subpopulações de linfócitos B.....62

Figura 14. Avaliação de expressão de marcadores de células B de centro germinativo.....63

Figura 15. Genes diferencialmente expressos e vias de sinalização em células B LAG-3+.....64

Figura 16. Avaliação de expressão diferencial entre linfócitos B de memória.....65

Figura 17. Nova anotação final de subpopulações de linfócitos B tumoral infiltrantes.....65

Figura 18. Avaliação de subpopulações celulares totais e subpopulações de linfócitos B em pacientes TNBC.....66

Figura 19. Avaliação de subpopulações de linfócitos em diferentes subtipos de câncer de mama.....67

Figura 20. Taxa de sobrevivência global (OS) entre pacientes TNBC.....68

Figura 21. Tempo de sobrevida livre de doença (PFI) entre pacientes TNBC.....69

Figura 22. Caracterização morfológica, medidas e histopatologia de tumores.....71

Figura 23. Avaliação de infiltrado linfocitário em tumores murinos.....72

Figura 24. Avaliação e contagem de imuno-histoquímica de linfócitos B e plasmócitos em tumores.....73

Figura 25. Frequência de linfócitos B totais tumorais.....74

Figura 26. Frequência de subpopulações de linfócitos B em amostras tumorais.....75

Figura 27. Frequência de subpopulações de linfócitos B LAG-3+ em amostras tumorais.....76

Figura 28. Avaliação morfológica e medidas do baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....77

Figura 29. Avaliação histológica do baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....78

Figura 30. Frequência de populações mielóides no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....79

Figura 31. Frequência e contagem absoluta de linfócitos B e T no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....80

Figura 32. Avaliação de subpopulações de linfócitos B e T no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....82

Figura 33. Avaliação de perfis de B regulatórios no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....83

Figura 34. Expressão de IgD em linfócitos B no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....83

Figura 35. Expressão de IgD em linfócitos B LAG-3+ no baço.....84

Figura 36. Avaliação morfológica e medidas do linfonodo drenante (tDLN) de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....85

Figura 37. Avaliação histológica do linfonodo drenante de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....86

Figura 38. Frequência de populações mielóides no linfonodo drenante de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....87

Figura 39. Frequência e contagem absoluta de linfócitos B no linfonodo drenante de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....88

Figura 40. Avaliação de subpopulações de linfócitos B no tDLN de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....90

Figura 41. Avaliação de perfis de B regulatórios no tDLN de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....91

Figura 42. Expressão de IgD em linfócitos B no tDLN de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....91

Figura 43. Expressão de IgD em linfócitos B LAG-3+ no tDLN de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral.....92

Figura 44. Avaliação de linfócitos B de centro germinativo (GCs) de animais desafiados por células E0771.....93

Figura 45. Linfócitos B centro germinativo em nDLN e tDLN após desenvolvimento tumoral.....94

Figura 46. Volume de tumores E0771 em diferentes condições experimentais.....96

Figura 47. Frequência de linfócitos tumor infiltrantes em condições controle e tratada.....96

Figura 48. Avaliação de linfócitos B de centro germinativo (GCs) e plasmócitos em tumores tratados.....97

Figura 49. Frequência de linfócitos no tDLN em condições controle e tratada.....97

Figura 50. Frequência de GCs e plasmócitos no tDLN em condições controle e tratada.....98

Figura 51. Linfócitos B centro germinativo em tDLN.....99

Figura 52. Frequência de GCs e plasmócitos no nDLN e tDLN em condições controle e tratada.....99

Figura 53. Perfil de imunoglobulinas no soro de animais não tratados, isotipo e imunoterápicos.....100

Figura 54. Reatividade de anticorpos derivados de GCs a proteínas de linhagem celular e tumor E0771.....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel I.....46

Tabela 2. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel II.....49

Tabela 3. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel III.....51

Tabela 4. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel IV.....52

Tabela 5. Reagentes de imuno-histoquímica.....55

Tabela 6. Reagentes para mensuração de anticorpos no soro dos animais.....58

Tabela 7. Pacientes TNBC selecionadas para análise de subpopulações de linfócitos B.....59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....18
    1.1. O câncer de mama e o subtipo triplo-negativo.....18
    1.2. A resposta imunológica na mama e nos tumores triplo-negativo.....23
    1.3. A resposta imunológica humoral no TNBC.....29
    1.4. Novas modalidades terapêuticas.....35
2. JUSTIFICATIVA.....38
3. OBJETIVOS.....39
    3.1. Objetivo Geral.....39
    3.2. Objetivos Específicos.....39
4. METODOLOGIA.....40
    4.1. Análise de subpopulações de linfócitos B em pacientes TNBC.....40
        4.1.1. Seleção de pacientes TNBC.....40
        4.1.2. Avaliação de subpopulações de linfócitos B em pacientes TNBC.....40
        4.1.3. Aquisição de dados de RNA-seq de células única.....40
        4.1.4. Citometria digital e análise de sobrevida.....41
    4.2. Modelo experimental murino de câncer de mama triplo-negativo.....42
        4.2.1. Linhagens celulares.....42
        4.2.2. Animais.....43
        4.2.3. Modelo tumoral de câncer de mama.....43
        4.2.4. Tratamento com Imunoterápicos.....44
    4.3. Análise de subpopulações de células B por Citometria de Fluxo.....44
        4.3.1. Processamento de amostras.....44
        4.3.2. Marcação com anticorpos, painéis e estratégia de *gating*.....46
        4.3.3. *Sorting* e cultura de linfócitos B de centro germinal.....53
    4.4. Visualização de Centros Germinais em linfonodos.....54
        4.4.1. Expressão condicional.....54
        4.4.2. Imagem de linfonodos.....54
    4.5. Histologia e Imuno-histoquímica.....54
        4.5.1. Avaliação histopatológica e H&E.....54
        4.5.2. Imuno-histoquímica.....55
    4.6. ELISA.....56
        4.6.1. Processamento de proteínas de linhagem celular e tecido tumoral.....56
        4.6.2. *Screening* de produção de anticorpos por células B de centro germinativo..56

4.6.3. Capacidade de reconhecimento de antígenos tumorais.....57
4.6.4. Dosagem de anticorpos do soro.....57
4.7. Análise Estatística.....58
5. RESULTADOS.....58
5.1. Verificação de subpopulações de linfócitos B por ferramentas de bioinformática.....58
5.2. Refinamento na determinação de subpopulações de células B e análise de seu impacto na sobrevida de pacientes.....61
5.3. Avaliação do impacto do desenvolvimento tumoral na dinâmica de linfócitos B.....69
5.4. Caracterização morfológica e histopatológica de tumores 4T1 e E0771.....70
5.5. Avaliação da dinâmica de subpopulações de linfócitos B no infiltrado tumoral.....74
5.6. Caracterização morfológica e histopatológica do baço.....76
5.7. Avaliação da dinâmica celular no baço.....78
5.8. Caracterização morfológica e histopatológica do linfonodo drenante.....84
5.9. Avaliação da dinâmica celular no linfonodo drenante.....86
5.10. Avaliação de células de centro germinal no TME.....92
5.11. Impacto de anti-PD-1 e anti-LAG-3 na dinâmica celular.....95
5.12. Impacto de anti-PD-1 e anti-LAG-3 no reconhecimento de antígenos tumorais.....100
6. DISCUSSÃO.....102
7. CONCLUSÃO.....117
REFERÊNCIAS.....118
ANEXO.....134

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer de mama e o subtipo triplo-negativo

O câncer de mama é considerado o principal tipo de câncer diagnosticado entre indivíduos do sexo feminino, sendo observado elevação na taxa de incidência e mortalidade deste tipo de neoplasia maligna nas últimas décadas (ŁUKASIEWICZ et al., 2021). De acordo com os últimos dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a taxa de mortalidade ajustada foi de 11,84 óbitos/100.000 mulheres em 2021, sendo estimados 73 mil novos casos para o triênio 2023-2025. Ainda que seja diagnosticado de forma frequente entre mulheres, a detecção precoce através de mamografia tem permitido o tratamento de forma mais eficiente. Embora fatores genéticos e hereditários contribuam para seu surgimento, variáveis ambientais e comportamentais, assim como a história reprodutiva e hormonal da mulher são considerados os principais determinantes no aparecimento dos tumores de mama (SANTOS et al., 2023).

Compreendida pela heterogeneidade, as diferenças observadas nas neoplasias malignas de mama servem de base para sua classificação. Os carcinomas mamários são separados em 19 tipos histológicos, dos quais o carcinoma invasivo de tipo não especial – anteriormente denominados carcinoma ductal invasivo - corresponde pela maioria (>70%) dos casos diagnosticados, seguido pelo carcinoma lobular invasivo (10~14%) e outros tipos de classificação especial. A diversidade dos tumores de mama ainda se traduz a partir do grau da doença, em que é determinado o nível de diferenciação das células tumorais em relação às células do epitélio normal, tornando sua avaliação imprescindível para a determinação do prognóstico da doença (HARBECK et al., 2019)

Similar ao desenvolvimento de outros tipos de neoplasias, alterações histopatológicas são frequentemente precedidas por alterações genéticas, de modo que sua avaliação agrega valor essencial no diagnóstico e prognóstico da doença. Embora consideradas raras, alterações em genes de supressão tumoral são historicamente reconhecidas por sua associação com o desenvolvimento do câncer de mama, em destaque os genes *BRCA1* e *BRCA2*, ambos envolvidos no reparo genético através de recombinação homóloga (HARBECK et al., 2019). Em função de sua elevada penetrância, alterações em tais genes aumentam acentuadamente as chances de desenvolvimento tumoral ao longo da vida. De acordo com Godet e Gilkes, entre 55 a 65% de mulheres que carregam mutação no gene *BRCA1* e aproximadamente 45% daquelas com mutações em *BRCA2* desenvolverão câncer de mama ao redor dos 70 anos de idade (GODET; GILKES, 2017). Mutações em genes relacionados a modulação do ciclo celular, proliferação, inibição

de apoptose e vias oncogênicas – em destaque *TP53, PIK3CA, MYC, PTEN, ERBB2, FGR1* e *GATA3* - também podem ser detectados em pacientes.

Igualmente importantes aos genes e vias de sinalização supracitados, hormônios reprodutivos como os estrogênios, e em menor grau, a progesterona, também influenciam no curso da doença. Ainda que fisiologicamente produzidos em indivíduos do sexo feminino e masculino, e possuam diferentes papeis - incluindo a regulação do ciclo menstrual e reprodutivo, mobilização de colesterol, regulação da densidade óssea e desenvolvimento de órgãos sexuais e da mama, a exposição excessiva a tais hormônios está ligada ao maior risco do surgimento de câncer de mama, especialmente em mulheres na pós-menopausa (TRAVIS; KEY, 2003).

Descoberto em trabalho pioneiro por Elwood Jensen em 1958, a partir da interação com receptor, hormônios estrogênios atuam na modulação da expressão gênica (FUENTES; SILVEYRA, 2019). Além disso, é verificado que estrógenos são capazes de interagir diretamente com receptores de fator de crescimento, de maneira a potencializar a proliferação e sobrevivência celular (HIGA; FELL, 2013). Ainda que não esteja diretamente relacionado às vias de sinalização hormonais, o receptor de fator de crescimento epidermal 2 (HER2) também possui papel relevante nas neoplasias de mama. Amplificado entre 13 a 15% nas neoplasias de mama, esta proteína de membrana possui em sua extremidade citoplasmática um domínio catalítico tirosina quinase. A partir da interação com o domínio extracelular e consequente dimerização do receptor, a cascata é iniciada e conduzida através de diferentes vias intracelulares, tais como a via de RAS e PI3K-ATK-MAPK, de modo a estimular a proliferação, sobrevivência celular e, em última instância, o estabelecimento de sítios de metástase (HARBECK et al., 2019).

Ainda que seja uma doença de caráter individual, a análise conjunta das alterações histopatológicas, genéticas e moleculares torna possível segmentar as pacientes em diferentes tipos e subtipos da doença, aprimorando o acompanhamento e tratamento das neoplasias de mama. A partir da análise de expressão gênica de amostras de tumores de mama, Perou e colaboradores segmentaram pacientes baseado em diferentes perfis de expressão gênica, definindo quatro subtipos – Luminais A e B, basal-símile e HER2-positivo, cada qual associado a prognostico diferenciado (PEROU et al., 2000). Em anos subsequentes, novos subgrupos foram investigados e incorporados, como claudina-baixo e normal-símile (PRAT; PEROU, 2011).

Compreendido por uma coleção de tumores caracterizados pela baixa expressão ou ausência de receptores hormonais - progesterona (PR), estrógeno (ER) e receptor do fator de crescimentos epidermal (HER2), tumores de mama triplo-negativo (TNBC) são

reconhecidos por sua elevada agressividade, recidiva precoce, alta taxa de mortalidade e número limitado de modalidades terapêuticas, de forma que a maioria das pacientes ainda recorre a drogas quimioterápicas e radioterapia. Correspondendo entre 10 a 15% dos diagnósticos, a maior parcela dos TNBC são caracterizados pelo elevado grau histológico, elevado pleomorfismo nuclear e número de células em mitose, além de apresentarem zonas com tecido necrótico e infiltrados linfocitários tumorais (BIANCHINI et al., 2016). Ainda que o carcinoma invasivo de tipo não especial seja o principal tipo histológico, subtipos como apócrino, medular e metaplásico também são observados neste tipo da doença. Embora raros, tumores de baixo grau podem ser detectados dentro do espectro das neoplasias triplo-negativas (GEYER et al., 2017). A melhor compreensão dos diferentes tipos e subtipos histológicos da doença é imprescindível para o tratamento adequado destes tumores. De acordo com pesquisas recentes, a classificação histopatológica possui impacto relevante no prognóstico das pacientes portadores de tumores triplo-negativo (LIAO et al., 2018; BALKENHOL et al., 2020).

Igualmente relevante à classificação histopatológica, a detecção de alterações genéticas e moleculares no TNBC permite avaliar o prognóstico e melhores modalidades de tratamento. É verificado que a maior parcela das pacientes recebem classificação intrínseca basal-símile, subtipo caraterizado pela elevada expressão de marcadores de células basais presentes no parênquima mamário, destacando-se as citoqueratinas 5 (KRT5), 14 (KRT14), 17 (KRT17) e receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) (HUBALEK; CZECH; MÜLLER, 2017). Além disso, tumores basal-símile possuem elevada instabilidade genética, e frequentemente apresentam mutações em genes da linhagem germinativa como *BRCA1/2* e *TP53*. Ainda que o basal-símile represente o subtipo mais frequente, outros subtipos estão presentes e podem ser detectados, como claudina-baixo e normal-símile (PRAT; PEROU, 2011). Apesar das similaridades encontradas, os termos triplo-negativo e basal-símile não são sinônimos, ainda que trabalhos conduzidos nos últimos anos tenham utilizado a nomenclatura de modo intercambiável (Figura 1) (BADVE et al., 2011).

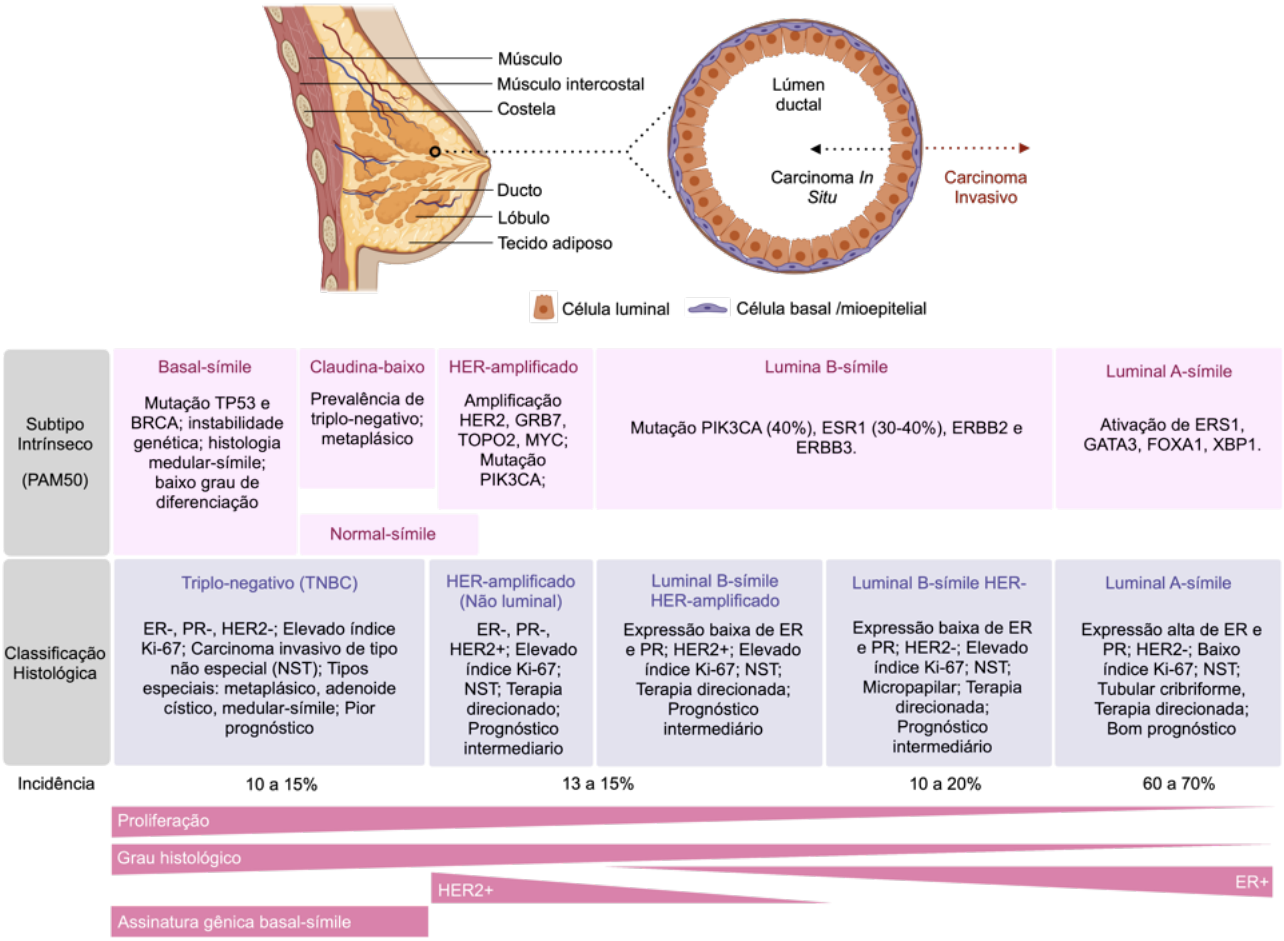


Figura 1. Origem e classificação dos tumores de mama. Ainda que possuam prognóstico diferente, todos os tumores de mama formam-se a partir do acúmulo de mutações genéticas em células luminais ou mioepiteliais que conjuntamente compõem a unidade mais básica do parênquima mamário (parte superior da figura). O crescimento destas células pode estar contido dentro dos limites físicos dos ductos e lóbulos, caracterizando os carcinomas ductais e lobulares *in situ* – respectivamente, ou transpor a lâmina basal e estender-se ao estroma adjacente, denominados carcinomas invasivos. Baseado nas diferenças histológicas e moleculares, as neoplasias de mama podem ser segmentadas em diferentes tipos e subtipos, cada qual associado a seu prognóstico. Os subtipos intrínsecos de Perou e colaboradores são baseados no perfil de expressão de 50 genes (PAM50) (PRAT; PEROU, 2011). A classificação histológica pode ser utilizada conjuntamente à classificação do PAM50 e baseia-se na análise da morfologia da neoplasia, assim como investigação de marcadores cruciais: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), e marcador de proliferação Ki67. Tumores que possuem expressão de ER e/ou PR são denominados 'hormônio positivos', enquanto tumores que não expressam receptores hormonais e HER2 são chamados de triplo-negativo (Adaptado de HARBECK *et al.,* 2019).

A fim de compreender melhor a diversidade encontrada nos TNBCs, Lehmann e colaboradores definiram seis novos subtipos a partir de análise transcriptômica: Basal-símile 1 (BL1) e Basal-símile 2 (BL2), caracterizados pela expressão elevada de genes relacionados ao ciclo celular, resposta ao dano de DNA, e vias de sinalização metabólica; Mesenquimal (M) e Mesenquimal células tronco (MSL), por apresentarem envolvimento de diversas vias de sinalização celular, tais com TGF-β, mTOR, Rac1/Rho, vias estas essenciais no processo de transição epitélio-mesenquimal e mobilidade celular; Luminal Androgênico (LAR) devido aos elevados níveis de expressão de citoqueratina luminal e

genes relacionados à sinalização do receptor androgênico; Imunomodulatório (IM), caracterizadas pela elevação de marcadores relacionadas à resposta imunológica (LEHMANN et al., 2011). Em anos posteriores, a partir de refinamento da análise previamente realizada, Lehmann e pesquisadores reduziram o número de subtipos em quatro: BL1, BL2, M e LAR (LEHMANN et al., 2016). De forma semelhante aos achados de Lehmann, Burstein e colaboradores segmentaram o TNBC em quatro subtipos - Luminal androgênico, Mesenquimal, Basal-símile imunossuprimido e Basal-símile imunoativado, cada qual com diferentes prognósticos (Figura 2) (BURSTEIN et al., 2015).

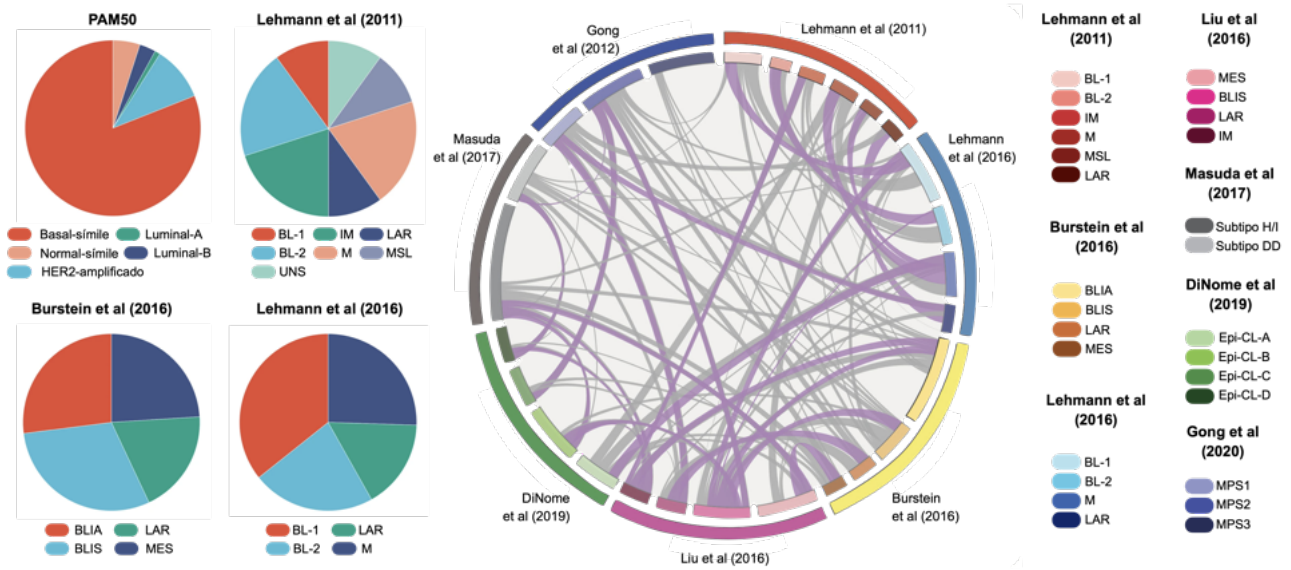


Figura 2. Subtipos intrínsecos moleculares de tumores triplo-negativo. Estratificação através da análise genômica e transcriptômica de tumores triplo-negativo de acordo com o PAM50 (PRAT, PEROU, 2011) e definições por Lehmann *et al.,* Burstein *et al.* (esquerda). Similaridade entre os diferentes sistemas de classificação (circus plot). As fitas representam a sobreposição parcial entre os diferentes subtipos. Fitas com sobreposição elevada são destacadas em roxo. BL-1: basal símile 1, BL-2: basal-símile 2, IM: Imunomodulatório, LAR: luminal andrógeno, MSL: mesenquimo-epitelial, M/MES: mesenquimal, UNS: instável, BLIA: basal-símile imunoativado, BLIS: basal-símile imunossuprimido (Adaptado de MARRA, A. *et al.,* 2020; ENSENYAT-MENDEZ *et al.,* 2021).

Ainda que os estudos conduzidos por Lehmann *et al.* e Burstein *et al.* tenham focado na análise dos perfis de DNA e RNA, também houveram tentativas de segmentar os tumores triplo-negativos com base nas diferenças de expressão de RNAs longos não codificantes (lncRNAs) (LIU et al., 2016), perfil de expressão proteica (MASUDA et al., 2017), perfil de metilação do DNA (DINOME et al., 2019) e vias metabólicas (GONG et al., 2021). Interessantemente, embora as diferentes abordagens metodológicas tenham gerado diferentes agrupamentos, a concordância – ainda que parcial - entre os estudos reforça a existência de subtipos da doença (Figura 2).

Embora estes estudos tenham acarretado na melhor compreensão dos tumores triplo-negativo, as classificações sugeridas pelos autores ainda são pouco utilizadas na

prática clínica, em parte devido à existência de limitações nas abordagens utilizadas. Levando em consideração a elevada heterogeneidade intra-tumoral, a coleta e subsequente análise de apenas uma parcela do tumor pode não retratar de forma fidedigna as mutações presentes. Igualmente importante, tumores triplo-negativo apresentam elevada heterogeneidade entre indivíduos, de maneira que os mesmos pacientes recebendo a mesma classificação molecular, podem apresentar prognósticos diferentes (ENSENYAT-MENDEZ et al., 2021). Em 2019, Wang, D. *et al* demonstraram que pacientes classificadas como BL-1 apresentaram diferença significativa na taxa de sobrevida global (OS) quando estratificadas quanto ao nível de expressão de PTEN (WANG et al., 2019). Ainda que incompletas, as diferentes estratégias de classificação existentes têm servido de base não somente para compreender novas modalidades terapêuticas, mas também as diferenças quanto à elaboração da resposta imunológica entre os diferentes subtipos (VALENCIA et al., 2022).

1.2. A resposta imunológica nos tumores de mama triplo-negativo

Seja iniciado por um quadro inflamatório persistente, exposição a agentes carcinogênicos, ou mesmo mutações em genes da linhagem germinativa (ex.: *PTEN*, *BRCA1/2*), é reconhecido que neoplasias de mama são majoritariamente oriundas de lesões inicialmente benignas (ex.: hiperplasia ductal atípica), mas que, devido ao acúmulo de mutações em proto-oncogenes e genes de supressão tumoral, passam a proliferar-se de maneira indefinida e adquirem o status de malignidade (ex.: carcinoma ductal invasivo) (HANAHAN, 2022). Além de mudanças morfológicas e gênicas nas células luminais e/ou mioepiteliais (basais), a progressão tumoral é acompanhada por uma mudança contínua na resposta imunológica (Figura 3). Proposto por Dunn e colaboradores (DUNN et al., 2002), e incorporando conceitos propostos por autores em anos anteriores (BURNET, 1970; HERBERMAN; HOLDEN, 1978; THOMAS, 1982; DIGHE et al., 1994), a carcinogênese é segmentada em diferentes fases: eliminação, equilíbrio e escape.

A fase de eliminação se refere aos momentos iniciais do processo de tumorigênese, em que células do sistema imunológico reconhecem e eliminam células potencialmente tumorais. Embora mecanismos da resposta inata e adaptativa sejam capazes de eliminar células transformadas, parcela das células tumorais resistem, de modo que o sistema imunológico e estas células sobreviventes entram em um processo dinâmico, caracterizando a fase de equilíbrio. Neste estágio, a partir de um processo de seleção darwiniana, ainda que parcela das células que deram origem ao tumor tenham sido

eliminadas, novas variantes carregando mutações que conferem resistência às ações do sistema imunológico são selecionadas, permitindo a expansão descontrolada e caracterizando o estágio de escape (DUNN et al., 2002).

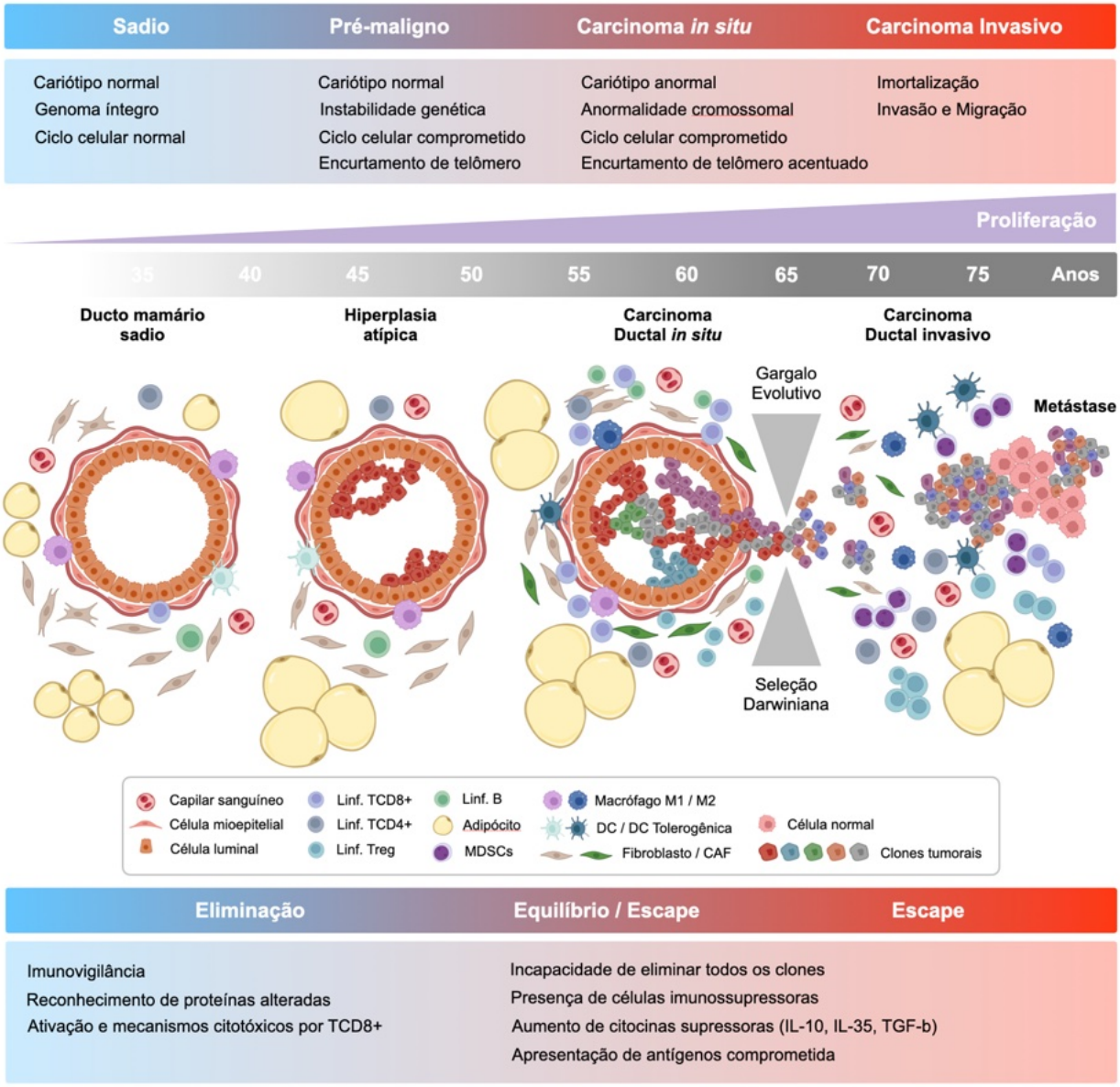


Figura 3. Interface imunológica durante a carcinogênese mamária. A íntima associação de macrófagos, células dendríticas e linfócitos aos lóbulos e ductos, permite com que células luminais e mioepiteliais mutantes sejam eliminadas. Ainda assim, a instabilidade genética, diminuição telomérica e comprometimento do ciclo celular ocasionado por quadros inflamatórios crônicos e exposição a carcinógenos ao longo dos anos, potencializa o surgimento de células hiperproliferativas (ex.: hiperplasia atípica). Ainda que em estágio benigno, determinados clones podem evadir os mecanismos empregados pela resposta inata e adaptativa (ex.: expressão elevada de PD-L1, promoção de Tregs, MDSCs, secreção IL-10, IL-35, TGF-β) sendo selecionados ao longo do tempo através de pressão evolutiva. A perpetuação de clones resistentes é frequentemente visto em estágio já maligno da doença, este caracterizado por extensa anormalidade cromossomal, imortalização e capacidade de invasão de tecidos adjacentes (Adaptado de GOFF, S.L; DANFORTH, D.N., 2021 e (GIL DEL ALCAZAR; ALEČKOVIĆ; POLYAK, 2020).

A progressão tumoral é caracterizada pela modulação não somente da resposta imunológica, mas também na dinâmica celular que ocorre na matriz extracelular.

Fundamental para a produção de colágeno, acido hialurônico e fatores de crescimento, ainda que fibroblastos sejam importantes na sustentação do tecido glandular mamário, estas células podem contribuir com o desenvolvimento de tumores de mama. Capazes de remodelar a matriz extracelular através da secreção de metaloproteases e contribuindo para o processo de neovascularização tumoral, CAFs *(Cancer-associated fibroblasts)* são frequentemente associados a tumores malignos de mama triplo-negativo (MARTINEZ-OUTSCHOORN; LISANTI; SOTGIA, 2014). Em estudo recente, autores demonstram que além de facilitar o estabelecimento de metástases, esta população é capaz de inibir a atividade de linfócitos citotóxicos através das vias de PD-L2 e Fas. Adicionalmente, foi-se observado pior prognóstico entre pacientes com níveis elevados de genes associados a CAFs (*ADAMTS12, AEBP1, COL10A1*) (WANG et al., 2022). Adicionalmente, estudos demonstram que CAFs estão associados a resistência a quimioterapia e indução de Tregs no microambiente tumoral (FENG et al., 2022). Interessantemente, em estudo pré-clinico foi observado diminuição na proliferação de células tumorais a partir da inibição de CAFs (TAKAI et al., 2016).

Tão importantes quanto fibroblastos durante o reparo tecidual, macrófagos atuam no combate de tumores desde estágios iniciais da doença, processando a apresentação de antígenos alterados a linfócitos associados ao parênquima mamário (Figura 4). Ainda assim, é reconhecido que determinadas populações de TAMs (*Tumor-associated macrophages*) podem contribuir com a carcinogênese e imunossupressão (QIU et al., 2018). Englobando diferentes fenótipos, estudos demonstram que TAMs possuem elevada plasticidade e, ainda que compartilhem funções e marcadores em comum, estas populações diferenciam-se dos clássicos fenótipos M1/M2 (QIAN; POLLARD, 2010). Autores demonstraram que em adição a marcadores como CD68, MHC-II e Ly-6C, TAMs também possuem expressão diferencial de Tie2, MARCO e EST2, marcadores utilizados para segmentar subpopulações específicas associadas a metástase, angiogênese e imunorregulação (QUATROMONI; ERUSLANOV, 2012). Corroborando com este estudo, a análise de transcritoma de tumores de mama revelou a existência de diferentes estados celulares, incluindo macrófagos M1-símile com elevada expressão de CXCL10, receptor de citocina associado à resposta anti-inflamatória e resposta anti-tumoral. Adicionalmente foram observadas populações M2-símile com elevada expressão de EGR1 e SIGLEC1, além de perfis associados a tecido adiposo (WU et al., 2021).

Ainda que TAMs possuam elevada heterogeneidade fenotípica e funcional, é demonstrado que o microambiente tumoral exerce grande influência no processo de diferenciação celular, de maneira que macrófagos M1-símile são progressivamente

superados por populações M2-símile (GUO et al., 2022). Estes são frequentemente observados em associação a CAFs e associados a pior prognóstico em tumores de mama triplo-negativo (ZHOU et al., 2018). Embora a origem ainda seja discutida, autores demonstram que TAMs podem originar-se a partir da diferenciação de monócitos circulantes e/ou macrófagos locais (HOURANI et al., 2021). Elevadas em amostras tumorais e produzidas por diferentes linhagens celulares de câncer de mama, autores demonstram que M-CSF, CCL2, CX3CL1, CCL3, CCL5 e VEGF-A possuem papel fundamental no recrutamento de monócitos ao microambiente tumoral, estimulando a diapedese e a proliferação de fenótipos imunossupressores (HOURANI et al., 2021). Igualmente importantes, citocinas imunossupressoras presentes no TME como IL-4, IL-10 e TFG-β também contribuem para no processo de diferenciação (MIRLEKAR, 2022). Em oposição a macrófagos M1-símile que possuem elevados níveis de MHC-II e co-estimuladores (ex.: CD40, CD86), e cuja produção de IL-6, IL-12 e TNF estimula indiretamente a proliferação de linfócitos citotóxicos e células NK (DUNGAN et al., 2014), populações M2 atuam de maneira a sustentar o desenvolvimento tumoral, incluindo: (1) expressão elevada de inibidores de checkpoint como PD-L1, permitindo a inativação de linfócitos citotóxicos através da interação com receptor PD-1, (2) produção elevada de IL-10 e TGF-β que além de inibirem a proliferação de linfócitos TCD4 e TCD8, contribuem para indução de linfócitos Treg (3) estimulam a angiogênese através da produção de fatores de crescimento VEGF e FGF2, além de enzimas modulares como MMP e COX-2, (4) promoção de metástase através do remodelamento da matriz extracelular por ação de metaloproteases e catepsinas (ZHOU et al., 2020; LIU et al., 2021b; HOURANI et al., 2021).

De maneira similar a CAFs e TAMs, as funções de células dendríticas (DCs) são igualmente subvertidas a partir da interação com células tumorais. Estudos apontam que embora presentes no microambiente tumoral, DCs são frequentemente observadas em estado tolerogênico, caracterizado pela baixa capacidade de apresentação de antígenos devido à diminuição nos níveis de MHC (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015). Adicionalmente, DCs tolerogênicas também apresentam expressão elevada de PD-L1 e IDO1, contribuindo para a inativação e anergia de linfócitos T através da interação com PD-1 e depleção de triptofano no microambiente (HARDEN; EGILMEZ, 2012). Ainda que a indução de células dendríticas tolerogênicas não seja completamente compreendida, autores demonstram que diferentes fatores influenciam a mudança funcional. Em adição a citocinas de caráter supressor (IL-10, TGF-β) é verificado que exossomos derivados de células tumorais contendo arginase-1 e microRNAs são capazes de interferir nas vias celulares associadas a expressão de MHC-II (DING et al., 2015).

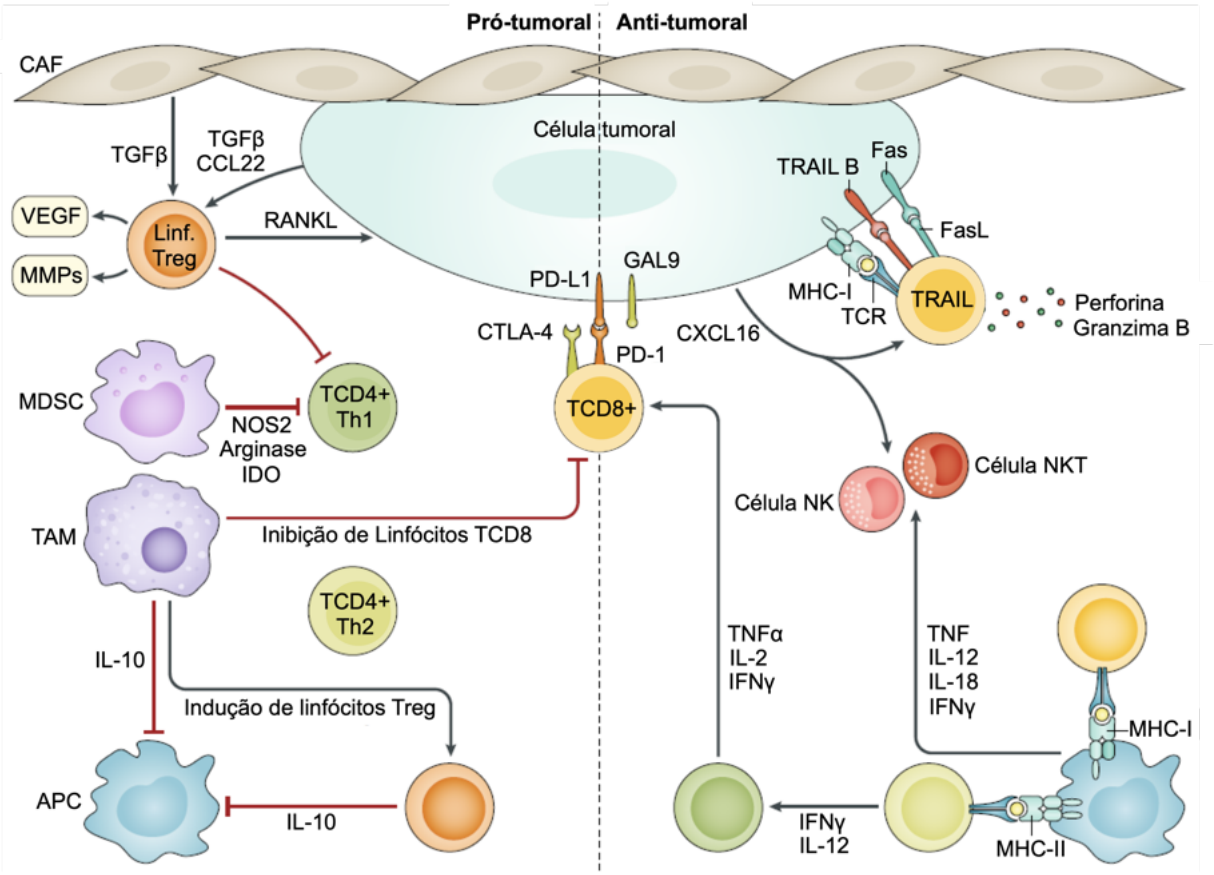


Figura 4. Interação entre diferentes células e funções no microambiente tumoral de mama. A resposta imunológica antitumoral inicia-se a partir do reconhecimento de antígenos tumorais. Proteínas codificadas por genes alterados ou superexpressos são apresentadas em moléculas de MHC I ou II em células APCs. A apresentação de tais antígenos acarreta na ativação de linfócitos TCD8+ e TCD4+. Linfócitos TCD8+ são reconhecidamente células efetoras, contribuindo para eliminação de células cancerígenas a partir da secreção de moléculas citotóxicas (Granzima B e perforinas). A atividade destas células é potencializada por citocinas de caráter inflamatório secretadas por linfócitos TCD4, tais como IFN-ɣ. Componentes da imunidade inata, como células NK e NKT são igualmente capazes de eliminar células cancerígenas, ainda assim sua atividade é limitada, não sendo o suficiente para erradicar a massa tumoral em desenvolvimento. Células cancerígenas são conhecidas por influenciar o microambiente tumoral, através da expressão de *immune checkpoint* e secreção de citocinas imunoregulatórias. Estas células modulam a resposta imunológica no local. TAMs, CAFs, MDSCs, diferentes subpopulações de linfócitos regulatórios, assim como citocinas associadas – tais como IL-10 e TGF-β contribuem para a progressão da doença (Adaptado de (HARBECK et al., 2019).

Igualmente importante na manutenção do ambiente imunossuprimido, células supressoras derivadas de linhagem mielóide (MDSCs) são observadas em amostras de tumores de mama e descritas em modelos pré-clínicos (LIU et al., 2023). É observado que células tumorais produzem diferentes fatores que contribuem para a amplificação e ativação de MDSCs, como fatores estimuladores de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e granulócitos (G-CSF), além de VEGF, IL-1, IL-6, IL-13 (CONDAMINE; MASTIO; GABRILOVICH, 2015; MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2016; LIU et al., 2023). Estudos apontam que CSFs elevam a expressão de FcyRIIB em células progenitoras

hematopoiéticas (HPCs) através da proteína Sp1, por sua vez, ativando a via de sinalização STAT3 e direcionando a hematopoese para células de linhagem mielóide (CONDAMINE; MASTIO; GABRILOVICH, 2015; MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2016). Interessantemente, além de CSFs, autores sugerem que a diminuição de pH ocasionado pela atividade de aldeído-desidrogenase 1 (ALDH1A1), acarreta na maior atividade de enzima quinase TAK1 e NF-kB, por sua vez, induzindo a secreção de GM-CSF e amplificando a indução de MDSCs no microambiente tumoral (LIU et al., 2021a).

Embora existam diferenças quanto ao fenótipo de MDSCs em humanos e camundongos, estas células são segmentadas em populações monocíticas e granulocíticas, ambas capazes de modular a resposta imunológica no TME (BRONTE et al., 2016). De maneira semelhante a DCs tolerogênicas, MDSCs são igualmente capazes de causar inativação e anergia em linfócitos T através da depleção nutricional, como a formação de metabólitos citotóxicos a partir da conversão de triptofano em quinurenina pela atividade de IDO1 (LI et al., 2018). Adicionalmente, é observado que MDSCs causam depleção de cisteína no microambiente, aminoácido essencial para funcionamento adequado de linfócitos T (SRIVASTAVA et al., 2010). Além disso, é constatada inibição e mesmo apoptose de células T a partir da peroxinitração do TCR pela reação com ROS e NOS produzidos por MDSCs no TME (LU et al., 2011). Interessantemente, as ações destas células não se resumem a linfócitos T, de forma que autores sugerem que MDSCs suprimem respostas de linfócitos B através de contato e também por ação de NO e Arg1, além de promoverem a diferenciação em fenótipos regulatórios (LELIS et al., 2017; SHEN et al., 2018; NAM et al., 2019).

As ações imunossupressoras no microambiente tumoral também afetam a resposta imune adaptativa. Embora linfócitos T citotóxicos possuam ações antitumorais através de ação direta pela interação de Fas-FasL e TRAIL na interface com células tumorais, assim como a liberação de granzimas, perforinas, e citocinas inflamatórias (IFN-ɣ, TNF), estas ações são comprometidas pela intensa modulação e escape da resposta imunológica (HARBECK et al., 2019). É observado que parcela considerável de tumores triplo-negativo possuem expressão elevada de moléculas regulatórias, em destaque o PD-L1. Pertencente à família de ligantes B7, a interação do PD-L1 e seu ligante PD-1 acarreta na modulação do sinal de ativação acarretado pelo reconhecimento antigênico, causando em última instância em menor capacidade efetora. Especificamente, o receptor PD-1 em células T promove sinalização intracelular que inibe a produção de IL-2 e proliferação celular. Além disso, citocinas como TGF-β secretadas por células tumorais, CAFs e TAMs promovem a diferenciação de células T em subtipo regulatório (Treg), por sua vez, acentuando a inibição

de linfócitos TCD4+, TCD8+, e promovendo MDSCs, TAMs e CAFs (HARBECK et al., 2019; MALLA et al., 2022).

Apesar da melhor compreensão de TILs nos tumores triplo-negativo representar um avanço importante para o tratamento adequado da doença, é necessário mencionar que a definição TIL compreende diferentes populações, de maneira que estas podem estar associadas a prognósticos diferentes. Igualmente importante para o desenvolvimento adequado de resposta imunológica antitumoral, dados recentes sugerem que linfócitos B estão intimamente associados ao desenvolvimento de tumores de mama. Ainda assim, as funções e prognóstico são debatidos. A melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na elaboração da resposta humoral no contexto de tumores triplo-negativo permite que novas abordagens possam ser empregadas.

1.3. A resposta imunológica humoral no TNBC

Embora o valor prognóstico da infiltração por linfócitos T no câncer de mama seja amplamente aceito, a presença e o papel desempenhado por diferentes populações de linfócitos B no microambiente tumoral ainda é discutido. Apesar de não ser considerada a população predominante, crescente corpo de evidências têm demonstrado a presença de linfócitos B como achado positivo, de modo que a população seja considerada um fator prognóstico relevante nas neoplasias de mama, em destaque no TNBC (SHEN; WANG; REN, 2018; YEONG et al., 2018). As funções desempenhadas por linfócitos B e suas subpopulações estendem além da intensa produção de anticorpos. A partir da produção de IFN-ɣ e IL-4, linfócitos B influenciam a polarização de linfócitos TCD4+ em subtipos Th1 e Th2 no microambiente tumoral (DISIS; STANTON, 2015). Além disso, estudo recente demonstrou que células B contribuem ativamente pela produção local de citocinas tipo 1 no microambiente tumoral - em destaque IFN-ɣ e TNF-α, citocinas estas que atuam na ativação e aprimoramento da função citotóxica de linfócitos TCD8+ (GARAUD et al., 2019).

Ainda que as células B sejam encontradas entremeadas entre células tumorais e em contato com outros componentes do estroma mamário, a população também pode ser localizada em estruturas adjacentes ao tumor, nos denominados TLS (*Tertiary Lymphoid Structure)*. Apresentando arquitetura similar à observada em órgãos linfoides secundários (SLO), linfócitos B são observados agrupados junto a células dendríticas foliculares (FDC), por sua vez rodeados por células T, células dendríticas (DC) e HEVs (*High Endothelial Venules)*(FIGENSCHAU et al., 2015). A semelhança entre TLSs e SLOs leva a crer que

mecanismos análogos estejam presentes e sejam fundamentais para formação de tais estruturas.

Frequentemente vistos em tumores com elevado grau histológico (FIGENSCHAU et al., 2015), a existência de TLSs sugere a contínua formação de linfócitos B e plasmócitos no combate de células cancerígenas. Ainda assim, os mecanismos envolvidos em sua geração e sua influência na resposta antitumoral permanecem por ser melhor compreendidos. De acordo com dados recentes, a produção local de CXCL13 e IL-7 por linfócitos T ou células estromais permite o recrutamento de células indutoras de tecido linfóide (LTi) ao local de desenvolvimento tumoral. Interessantemente, dados sugerem que linfócitos Th17, B, e macrófagos M1 também são capazes de iniciar a formação de TLS. Através da interação com o receptor de linfotoxina e subsequente produção de VEGFC por células estromais, estas células induzem a formação local de HEVs. Além disso, LTis promovem a secreção de moléculas de adesão à matriz extracelular e produção de citocinas – em destaque, CXCL12, CXCL13, CCL19 e CCL21. A combinação de tais fatores acarreta na migração de linfócitos B e T ao local, acarretando em última instância na geração de resposta antitumoral (Figura 5) (SAUTÈS-FRIDMAN et al., 2019). Em suporte a estes dados, diferentes autores demonstram que elevação nos níveis de CXCL13 esteve associado a maior densidade de TILs e HEs, assim como maior taxa de sobrevivência global e período prolongado de recidiva da doença (SONG et al., 2017; CRISCITIELLO et al., 2018; SCHMIDT et al., 2018).

Ainda que o processo de migração e proliferação local de linfócitos B nos tumores de mama, assim como o motivo de pacientes portadas de TNBC apresentarem níveis mais elevados de células B tumor infiltrantes em comparação aos demais subtipos da doença não sejam completamente elucidados, diferentes hipóteses têm sido elencadas. Autores argumentam que a elevada instabilidade cromossômica e mutações existentes nos tumores triplo-negativos confere a geração de número mais diverso de neoantígenos, acarretando na ativação mais pronunciada de linfócitos B (DISIS; STANTON, 2015). Corroborando com esta hipótese, estudos conduzidos em modelos animais e humanos apontam que a elevação na carga mutacional (TMB) acarretou em infiltração mais pronunciada de linfócitos B, maior sensibilidade ao tratamento imunoterápico, assim como melhor taxa de resposta patológica (HOLLERN et al., 2019; KARN et al., 2020).

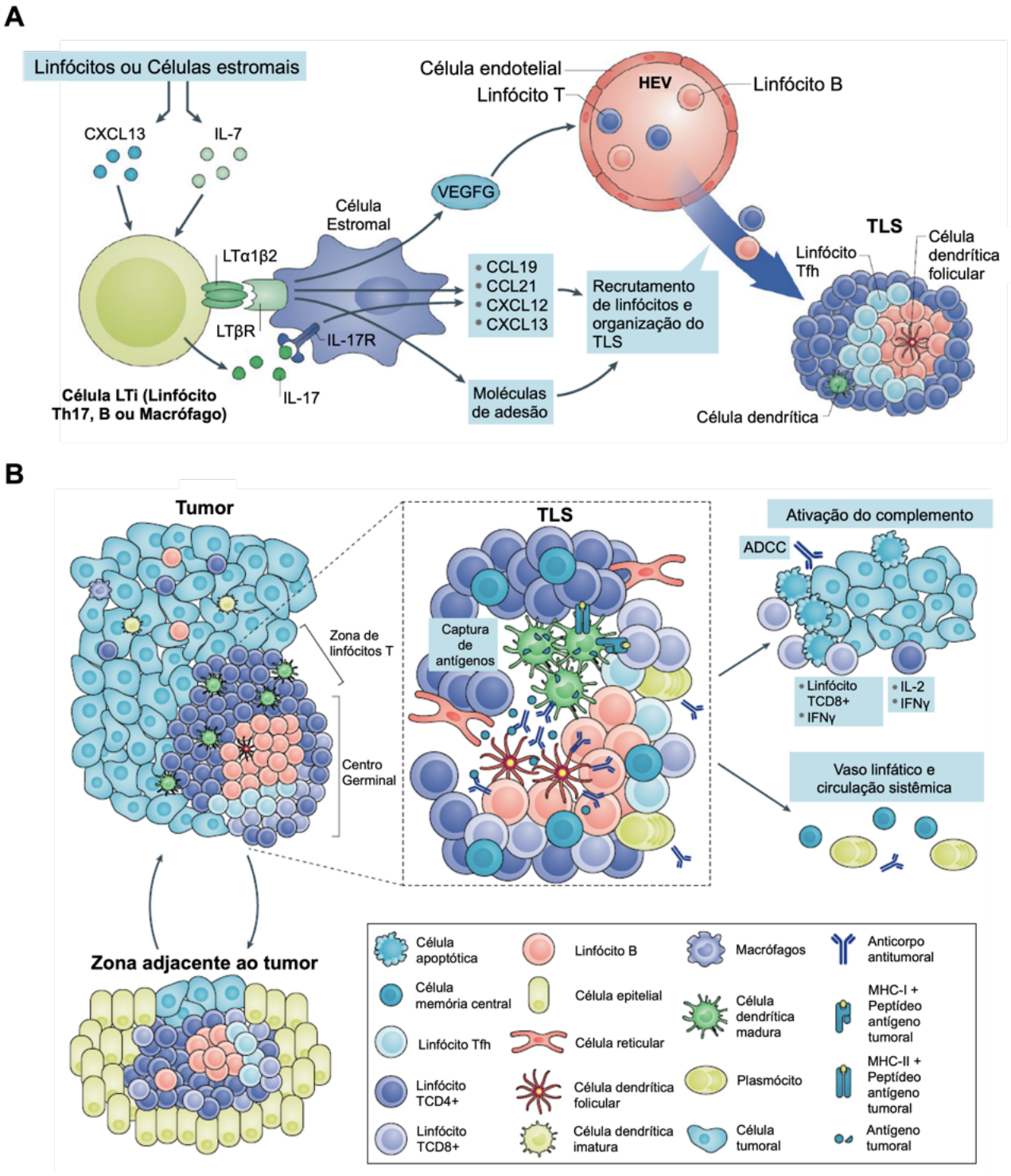


Figura 5. Gênese de órgãos linfoides terciários (TLSs). (A) Células LTi possuem papel fundamental na iniciação da organização destes agregados linfocitários. A partir da interação com células estromais presente no local de inflamação, estas células estimulam a formação de TLS a partir da secreção inicial de CXCL13, IL-7, além de estimular a secreção de citocinas e VEGFC por células estromais. A formação de TLS é potencializada a partir da atuação de linfócitos Tfh, células que também produzem CXCL13. **(B)** TLSs estão usualmente localizados às margens da massa tumoral, possuindo estrutura semelhante àquela observada em órgãos linfoides secundários (SLOs). A interação entre Linfócitos TCD4+, células dendríticas foliculares, FDRs e células B permite a geração de resposta antitumoral. Anticorpos produzidos por plasmócitos em TLSs atuam na eliminação de células tumorais a partir da resposta dependente de anticorpos (ADCC) e ativação do sistema complemento, ao passo que linfócitos TCD8+ atuam diretamente na eliminação das células cancerígenas. A atuação de tais células a partir da organização de TLSs na periferia tumoral permite não somente a eliminação *in situ* do tumor, mas, também, acarretam na geração de células B e T de memória central capazes de proteger o hospedeiro contra metástases (Extraído de SAUTÈS-FRIDMAN *et al*, 2019).

Apesar de a instabilidade cromossômica e mutações em tumores triplo-negativo estarem potencialmente associada à maior antigenicidade, é fundamental mencionar que a elevação da TMB é somente encontrada em cerca de 5% de todos os tipos de câncer de mama (BARROSO-SOUSA et al., 2020), o que leva a crer que outros mecanismos celulares contribuam com a infiltração de linfócitos B em pacientes TNBC (SHAH et al., 2012; SOLINAS et al., 2019). Embora em estágios avançados células tumorais tenham expressão diminuída de MHC-I a fim de evadir do reconhecimento por células do sistema imunológico, autores demonstram que a expressão em tumores triplo-negativo está não somente associadas à maior infiltração por linfócitos B e T, mas também correlacionada a melhor prognóstico, melhor taxa de pCR e menor probabilidade de recidiva da doença (FORERO et al., 2016; PARK et al., 2017; STEWART et al., 2020).

Independente dos mecanismos celulares e moleculares que impulsionam a maior presença de linfócitos B em tumores triplo-negativos, a detecção de plasmócitos nas amostras tumorais reforça a hipótese de maior imunogenicidade, de modo que a elevação do número de antígenos neste subtipo de neoplasia mamária potencialize o processo de diferenciação celular no local. Considerado estágio celulares tardios, plasmócitos são caracterizados pela intensa produção de anticorpos, de modo que 2/3 de sua expressão gênica está relacionada à produção de proteínas que compõem a cadeia leve e pesada de imunoglobulinas (TELLIER; NUTT, 2017). Semelhante aos compartimentos linfoides secundários, a frequência desta população no microambiente tumoral é baixa, correspondendo a aproximadamente <1~5% das populações de linfócitos infiltrantes (YEONG et al., 2018). Apesar de numericamente inferior, plasmócitos possuem capacidade de sintetizar milhares de anticorpos (LAM; BHATTACHARYA, 2018). Ainda que o alvo dos anticorpos produzidos por estas células não sejam completamente conhecidos, a presença de plasmócitos têm sido apontada como aspecto positivo, com diferentes autores demonstrando associação a um melhor prognóstico, taxa pCR e sobrevivência global (SCHMIDT et al., 2018; YEONG et al., 2018; GARAUD et al., 2019; DENG et al., 2019; SEOW et al., 2020).

Tão relevante quanto a detecção de plasmócitos nas amostras de pacientes TNBC, diferentes autores demonstram que a concentração de imunoglobulinas detectada nas amostras tumorais aumenta progressivamente em função do grau de infiltração linfocitária. Embora diferentes isotipos de imunoglobulinas sejam detectadas, como IgD, IgA e IgM (BAR et al., 2019; GARAUD et al., 2019; SEOW et al., 2020) - sugerindo portanto diferentes tipos de resposta biológica, parcela majoritária de literatura aponta a IgG como principal

isotipo atuante no microambiente tumoral (GARAUD et al., 2019; HOLLERN et al., 2019; HSU et al., 2019; SEOW et al., 2020). Além do predomínio de isotipo, pesquisa recente aponta para a existência de oligoclonalidade entre linfócitos B no microambiente tumoral e em linfonodos drenantes (tDLN), reforçando a interação entre os dois compartimentos na geração da resposta imunológica humoral (NOVINGER; ASHIKAGA; KRAG, 2015). Curiosamente, embora a detecção deste e outros isotipos de anticorpos corrobore com a hipótese de diferenciação de linfócitos B no local, com subsequente produção de anticorpos contra alvos tumorais, pesquisadores demonstraram que anticorpos também podem atuar de forma pró-tumoral, contribuindo para expansão da massa tumoral e iniciação de sítios de metástase (GU et al., 2019).

Ainda que ações efetivadas por linfócitos B e plasmócitos possam contribuir para o controle e eliminação de células tumorais e estejam majoritariamente associados a melhor prognóstico em pacientes TNBC, as funções destas células também são subvertidas, de forma que estas células auxiliem a progressão da doença. Descritas ainda na década de 70 por Katz e colaboradores (KATZ; PARKER; TURK, 1974) e cujas funções somente foram desvendadas no início dos anos 2000 (MIZOGUCHI et al., 2002), linfócitos B regulatório (Bregs) através da secreção de IL-10, IL-35 e TGF-β são capazes de inibir a atuação de células e processos pró-inflamatórios. Além de promoverem a produção de TNF-α e IL-12 por macrófagos e células dendríticas, e dificultarem a polarização da resposta Th1 em linfócitos TCD4, estas células atuam induzindo a diferenciação de linfócitos T regulatórios (Treg) (ROSSER; MAURI, 2015).

Embora a secreção de citocinas supressoras seja tida como o principal mecanismo de ação, estudos sugerem a existência de outras frentes de ação. Frequentemente detectado em Bregs oriundos da zona marginal no baço (ROARK et al., 1998), o CD1d é um receptor não polimórfico similar ao MHC-I e cuja função está associada à apresentação de antígenos glicolipídicos a células NKT (GIRARDI; ZAJONC, 2012). A partir da interação com seu receptor, células NKT produzem quantidades expressivas de citocinas de resposta Th2, como IL-4, IL-10 e IL-13, além de promoverem Tregs, contribuindo em última instância para a regulação da resposta imunológica (LA CAVA; VAN KAER; FU-DONG-SHI, 2006; PILLAI et al., 2009; SHALEV et al., 2011). Além do CD1d, estudos apontam que Bregs também fazem uso de outros receptores na promoção da imunossupressão, como através da interação por Fas:FasL, comprometendo a atuação de linfócitos TCD4 (SIEGEL et al., 2000; TAO et al., 2015).

A diversidade de Bregs é também verificada pela expressão de receptores de *immune checkpoint.* Apresentando diferentes fenótipos, como PD-L1+ $CD81^{hi}$ $CD86^{hi}$

$CD62L^{lo}$ e PD-L1+ TGF-β+ CD80+ CD86+, estudos demonstram que estes perfis celulares são capazes de produzir IL-10, suprimir a atividade de linfócitos T, além de induzir a diferenciação em Tregs. Igualmente relevante, a presença destes fenótipos esteve associado ao estabelecimento de metástase pulmonar em modelo murino de câncer de mama (OLKHANUD et al., 2011; SHEN et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Embora a carcinogênese e dinâmica da resposta sejam diferentes, populações e mecanismos similares são reportados em modelos pré-clínicos de hepatocarcinoma, tumores cervical e de próstata (XIAO et al., 2016; TANG et al., 2016; LIU et al., 2018, p. 15).

Embora PD-1/PD-L1 e CTLA-4 sejam frequentemente observados em populações regulatórias, novos receptores de *immune checkpoint* têm sido avaliados. Fazendo parte da família de receptores TIM e possuindo papel fundamental na modulação da resposta imunológica, TIM-1 é verificado em linfócitos T ativados, linfócitos B, células NKT, macrófagos e células dendríticas (MEYERS et al., 2005). Ainda que associado à fagocitose de corpos apoptóticos por APCs (RENNERT, 2011), TIM-1 é um importante co-estimulador na ativação de linfócitos T, também promovendo a maturação de células dendríticas (MEYERS et al., 2005). Interessantemente, em linfócitos B sua expressão tem sido associaao à indução de tolerância e produção de IL-10 e TGF-β (MOHIB et al., 2020), com estudos pré-clínicos demonstrando a redução da severidade de quadros inflamatórios alérgicos (DING et al., 2011) e colite (XU et al., 2020). Relevante ao processo tumoral estudo sugere que estas populações também contribuem para a expansão de células cancerígenas, sendo demonstrado maior enriquecimento de células CD19+ TIM-1+ no sangue periférico e amostras de carcinoma de células escamosas (SCC) (SHANKAR et al., 2022). Ainda que a população em questão não tenha sido descrita em tumores de mama, autores observaram que células $CD19^{low}CD27^{high}$TIM-1+ foram capazes de suprimir a secreção de IFN-ɣ e TNF-α em linfócitos T no carcinoma colorretal (MAO et al., 2017). Adicionalmente, autores também observaram supressão de linfócitos T citotóxicos por células $CD5^{high}$ $CD38^{+/high}$ TIM-1+ em casos de carcinoma hepatocelular (YE et al., 2018).

Apesar de ter sido descrito ainda na década de 90 e compartilhando homologia com o receptor de CD4, o papel do receptor LAG-3 nas neoplasias malignas ainda é alvo de discussão (TRIEBEL; JITSUKAWA; BAIXERAS, 1990). Expresso majoritariamente em linfócitos T e cuja função é contrabalancear os sinais de ativação promovidos pela interação TCR-MHC, LAG-3 também é detectado em células NK, B e células dendríticas em condições fisiológicos. Ainda assim, o papel e dinâmica de populações B LAG-3+ permanece pouco conhecido. Apesar de estudos demonstrarem que o MHC-II é o principal receptor de interação, moléculas como galectina-3, FGL-1 e LSECtin também demonstram

capacidade de ligação ao receptor (HUO et al., 2022). Interessantemente, autores têm constatado a expressão elevada do marcador em diferentes tipos de tumores sólidos, como melanoma, fibrosarcoma, adenocarcinoma de colon e tumor ovariano (MATSUZAKI et al., 2010; WOO et al., 2012). Embora estudos demonstrarem que LAG-3 em tumores esteja associado à exaustão celular de linfócitos TCD4 e TCD8, evidências recentes sugerem que o marcador também é observado em populações Bregs. Apesar de contexto patológico distinto, utilizando modelo de infecção bacteriana por *Salmonella typhimurium,* Lino, A.C. *et al,* demonstram a existência de plasmócitos LAG-3+ capazes de expressar IL-10 e suprimir a resposta imunológica do hospedeiro. Adicionalmente, foi-se constatado co-expressão de PD-L1 (LINO et al., 2018).

1.4. Novas modalidades terapêuticas

Embora a taxa de resposta a quimioterápicos em pacientes TNBC seja satisfatória, pacientes que não atingem resposta patológica completa tendem a ter pior prognóstico, com recidiva precoce da doença e estabelecimento de metástases (KASSAM et al., 2009). A resposta terapêutica insuficiente em parcela das pacientes está intimamente relacionada ao surgimento de clones tumorais que empregam diferentes mecanismos de resistência. Autores demonstram que tais mecanismos são multifacetados e baseados em complexas redes de interação no microambiente tumoral, incluindo extrusão de drogas por receptores dependentes de ATP – como ABCC1/MRP1, ABCG2/BCRP, e alterações em vias e cascatas intracelulares relacionadas à proliferação celular – como TGF-β, Notch e Wnt/B-catenina. Além disso, neoplasias triplo-negativas apresentam frequentemente baixa vascularização e estabelecimento de zonas de hipóxia que comprometem o transporte de quimioterápicos (NEDELJKOVIĆ; DAMJANOVIĆ, 2019). Adicionalmente, autores demonstram que tumores resistentes apresentam células-tronco tumorais que permitem o reestabelecimento da doença após o término do tratamento (CREIGHTON et al., 2009).

Embora a ausência de receptores hormonais, heterogeneidade da doença, assim como as alterações frequentemente encontradas no microambiente tumoral dificultem o estabelecimento de terapias eficazes, estudos incorporando novos agentes têm sido avaliados (BASHO et al., 2017; GUNEY ESKILER; OZTURK, 2022). Para além de inibidores de vias intracelulares hiperativas e antagonistas de receptores citoplasmáticos (ex.: Olaparibe, Evelorimus, Ipatasertib) (ROBSON et al., 2019), nas últimas décadas tem sido crescente o interesse por abordagens terapêuticas que procuram reestabelecer a resposta imunológica em tumores triplo-negativo, haja visto que pacientes TNBC

apresentam maior relação de infiltrado linfocitário, assim como expressão diferencial de *immune checkpoints.* Em levantamento recente realizado por Li, L. *et al.,* foi constatado o registro de centenas de estudos clínicos para o tratamento de tumores de mama triplo-negativo na última década, majoritariamente direcionados para casos avançados e em metástase. Além disso, os autores reportaram que parcela majoritária envolvem o uso de inibidores de PD-L1, em monoterapia ou em combinação com drogas quimioterápicas – como paclitaxel, carboplatina e gemcitabina (LI et al., 2023).

Frequentemente expresso em linfócitos T exaustos e Tregs, estudos pré-clíncicos e clínicos randomizados (RCTs) em diferentes fases demonstram que o bloqueio do eixo PD-1/PD-L1 é capaz de restaurar as funções de linfócitos no microambiente tumoral em pacientes de câncer de mama (MOHAN et al., 2019; ŁUKASIEWICZ et al., 2021). Embora estudos demonstrarem que a administração de anti-PD-1/PD-L1 (ex.: Nivolumab, Atezolizumab) é bem tolerada pelas pacientes, o percentual de pacientes que atinge um nível de resposta adequado ainda é considerado moderado a baixo (REN et al., 2022). Além disso, estudos demonstram que a resposta a bloqueadores de PD-1/PD-L1 varia de acordo com o momento do tratamento, sendo observados melhores resultados em pacientes tratadas em primeira linha do que em segunda linha (24% vs. 6%) (NANDA et al., 2016; EMENS et al., 2019).

A fim de superar tais limitações, novos estudos procuram avaliar o impacto da combinação de anti-PD-1/PD-L1 com quimioterápicos. Autores demonstram que além da ação citotóxica direta em células tumorais, quimioterápicos contribuem para maior imunogenicidade tumoral, estimulando o deslocamento de APCs, aprimorando o processo de apresentação antigênica e contribuindo na ativação de células T (GALLUZZI et al., 2015). Em estudo em fase III foi observado que o tratamento combinado de anti-PD-L1 e nab-paclitaxel conferiu às pacientes maior taxa de OS em comparação à coorte tratada com placebo (SCHMID et al., 2020a). Similarmente, em outro estudo clínico de fase III foi reportado que a adição de paclitaxel, gemcitabina/carboplatina ao anti-PD-L1 conferiu maior taxa PFS aos pacientes. Além disso, aprimoramento da sobrevida também foi observado, de maneira que pacientes tratadas em regime combinatório tiveram taxa OS elevada em quase 7 meses após a adição de anti-PD-L1 ao regime quimioterápico (CORTES et al., 2020, 2022). Ainda que resultados sejam encorajadores, ainda restam dúvidas sobre parâmetros utilizados na seleção de pacientes para o tratamento com inibidores de PD-L1. Embora estudos demonstrem o valor preditivo da expressão de PD-L1 para o tratamento monoterápico e combinatório em estágios avançados da doença (NANDA et al., 2016; CORTES et al., 2020; SCHMID et al., 2020b), outros argumentam que

a expressão do marcador é menos efetiva para a predição em estágios iniciais (MITTENDORF et al., 2020). Além disso, a expressão de outros marcadores imunoregulatórios podem potencialmente diminuir o benefício clínico de terapias anti-PD-1/PD-L1, sendo observado elevação de TIM-3 (*T-cell immunoglobulin mucin-3)* em modelo pré-clínico e pacientes que desenvolveram resistência ao tratamento imunoterápico (KOYAMA et al., 2016).

A fim de superar tais limitações, estudos também avaliam o uso combinatório de anti-PD-1/PD-L1 com outros inibidores de *immune checkpoint* , haja visto que resultados positivos são observadores para modelos pré-clínicos e outros tipos de tumores sólidos (ROTTE, 2019). Embora utilizando número amostral limitado, autores demonstram elevação na taxa de resposta em pacientes TNBC em estágio metastático tratados pela combinação de anti-CTLA-4 e anti-PD-L1 (SANTA-MARIA et al., 2017). Igualmente relevante, diferentes estudos demonstram que o bloqueio combinatório de PD-1/PD-L1 e LAG-3 é capaz de restaurar imunidade antitumoral, acarretando em produção de IFN-ɣ, elevação na atividade de linfócitos T citotóxicos, e apresentação antigênica em diferentes modelos e tipos de tumores sólidos (WEI; LI, 2022). Embora atualmente não constem estudos clínicos avaliando o efeito combinatório de PD-1 e LAG-3 em tumores de mama triplo-negativo, evidências positivas foram reportadas em modelo pré-clínico, demonstrando que o tratamento combinatório é mais eficaz na redução do volume tumoral que o regime monoterápico (DU et al., 2020).

Embora inibidores de *immune checkpoints* tenham revolucionado o tratamento de tumores sólidos e apresentam resultados promissores para a contenção de neoplasias malignas de mama, parcela majoritária dos estudos conduzidos têm focado nos efeitos desencadeados em linfócitos TCD4 e TCD8. Ainda assim, evidências sugerem que estas terapias possam ter efeito positivo sob linfócitos B, promovendo a expansão de clones que produzam anticorpos direcionados a proteínas tumorais, e auxiliando em última instância a eliminação de células tumorais. Apesar disso, pouco se sabe sobre o impacto destas modalidades terapêuticas na elaboração da resposta imunológica humoral, de modo que a sua melhor compreensão tem potencial de auxiliar futuras pesquisas e direcionamentos terapêuticos.

2. JUSTIFICATIVA

Ainda que compreendendo parcela minoritária dos casos de câncer de mama, caracterizados pela ausência de receptores de estrogênio, progesterona e HER2/neu, tumores de mama triplo-negativo desafiam médicos e profissionais da saúde. Possuindo elevada heterogeneidade, este grupo de neoplasias mamárias é reconhecido pela intensa proliferação, estabelecimento de metástases, recidiva precoce da doença, além de número limitado de terapias direcionadas (BIANCHINI et al., 2016). Apesar disso, dentre os diferentes tipos e subtipos dos tumores mamários, é o que apresenta maior intensidade de resposta imunológica, com parcela dos pacientes apresentando intensa infiltração linfocitária na massa tumoral (BLACKLEY; LOI, 2019).

Embora nas últimas décadas, avanço inquestionável tenha sido feito para melhor compreensão do impacto do desenvolvimento tumoral sob a dinâmica de linfócitos T, ainda carecem estudos sob a cinética de linfócitos B e suas subpopulações. A relevância desta investigação se dá em face a evidências emergentes nos últimos anos, pelos quais a maioria dos estudos associam a detecção de células B em amostras tumorais de mama a um bom prognóstico (YEONG et al., 2018; HARRIS et al., 2021; HU et al., 2021a; KURODA et al., 2021). Apesar disso, evidências demonstram que tumores de mama contribuem com a emergência de diferentes fenótipos de linfócitos B regulatórios, incluindo populações que expressam receptores de *immune checkpoint* (OLKHANUD et al., 2011; BIRAGYN; BODOGAI; LEE-CHANG, 2014; SHEN et al., 2018; FLORES-BORJA; BLAIR, 2022).

Tão importante quanto avaliar a resposta imunológica humoral durante o desenvolvimento de tumores de mama triplo-negativo, é investigar qual o impacto de novas modalidades terapêuticas na dinâmica de linfócitos B. Embora na última década o uso de inibidores de receptores de *immune checkpoint* (ex.: Ipilimumab, Nivolumab, Prembrolizumab) tenha demonstrado efetividade em reverter a exaustão de linfócitos T no microambiente tumoral, escassa é a literatura avaliando as consequências destas modalidades terapêuticas sob a dinâmica de linfócitos B, em especial no subtipo triplo-negativo (DUFAUD et al., 2021; ABDOU et al., 2022). Em face a estas limitações e dado o impacto do TNBC na sobrevida das pacientes, a melhor compreensão da resposta imunológica humoral em condições não tratadas e tradadas adiciona informações relevantes e que podem impactar no diagnóstico e na terapia clínica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o impacto do desenvolvimento de tumores triplo-negativo sob a resposta imunológica utilizando dados de humanos e modelo murino.

3.2. Objetivos Específicos

I. Comparar as populações de linfócitos B entre tecido não tumoral e tumoral de pacientes TNBC;
II. Aprimorar a determinação de subpopulações de linfócitos B em pacientes TNBC;
III. Verificar o impacto de subpopulações de linfócitos B de pacientes com TNBC quanto a sobrevivência global (OS) e tempo livre de progressão da doença (PFS);
IV. Avaliar o impacto do desenvolvimento de tumores triplo-negativo na dinâmica de subpopulações de linfócitos B em modelo murino;
V. Determinar o impacto do tratamento por inibidores de *immune checkpoint* na dinâmica de linfócitos B no TME e tDLNs.

4. METODOLOGIA

4.1. Análise de subpopulações de linfócitos B em pacientes TNBC

4.1.1. Seleção de pacientes TNBC

Utilizando o pacote TCGABiolinks (v.3.17)(COLAPRICO et al., 2016) no ambiente do RStudio foram obtidos todos os dados clínicos harmonizados de câncer de mama disponíveis no banco de dados TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), sendo sequencialmente verificado a disponibilidade de dados para classificação histopatológica (Data de realização: 27/07/2020). A partir disso, foram excluídos da análise pacientes que não haviam informação para imunohistoquímica (IHC) dos receptores de progesterona (PR), estrógeno (ER) e HER2/neu. Pacientes TNBC foram selecionadas a partir da ausência de expressão dos receptores de ER, PR e HER2/neu.

4.1.2. Avaliação de subpopulações de linfócitos B em pacientes TNBC

Utilizando o pacote TCGABiolinks (v.3.17) no ambiente do RStudio e baseado na classificação histopatológica, foi verificado dentre as pacientes portadoras de TNBC aquelas que apresentavam dados de transcritoma (*bulk* mRNA-Seq) para tecido de mama não tumoral. Somente foram incluídas para análise pacientes que apresentaram dados de tecido de mama não tumoral e tumoral, estas selecionadas através da identificação individual (ex.: TCGA-BH-A0B3-11B-21R-A089-07). Após verificação de potenciais inconsistências, os dados de transcritoma já normalizados (RPKM) foram obtidos através do pacote TCGABiolinks (v.3.17) e agrupados em uma única matriz (.txt), por sua vez utilizada como *input* para a análise através das ferramentas xCell (RStudio)(ARAN; HU; BUTTE, 2017) e CIBERSORTx (web: https://cibersortx.stanford.edu)(NEWMAN et al., 2019). Para a análise de deconvolução no CIBERSORTx, utilizamos a matriz de comparação padrão (LM22), esta derivada de microarranjo, sendo sequencialmente selecionado a opção "*Imput Cell Fractions".* As pontuações obtidas foram obtidas em formato .txt e analisadas de acordo com método estatístico adequado (ver Metodologia 4.7).

4.1.4. Aquisição de dados de RNA-seq de células única

A fim de melhor determinar as subpopulações de linfócitos B em tumores de mama, dados clínicos e dados de RNA-Seq de células únicas (scRNA-seq), ainda não publicados, foram gentilmente compartilhados pelo Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional do Instituto Nacional de Câncer/RJ (GUIMARÃES *et al.*, 2023). As células identificadas como Linfócitos B (que expressavam *CD79A/B*, *MS4A1* e *MZB1*) foram selecionadas. Então, os 3.000 genes altamente variáveis foram calculados, com o efeito de lote corrigido para cada amostra, seguido da integração através do pacote scVI (XU et al., 2021) da biblioteca scvi-tools (v1.1.0) (GAYOSO et al., 2022). O espaço latente gerado pelo scVI foi projetado em um espaço 2D usando a Aproximação e Projeção Uniforme de Manifold (UMAP) (MCINNES; HEALY; MELVILLE, 2018). A clusterização foi realizada utilizando o algoritmo Leiden (TRAAG; WALTMAN; VAN ECK, 2019) em uma faixa de valores que variou de 0.3 a 1. A resolução Leiden analisada foi a 0.7, a anotação manual foi realizada observando marcadores canônicos descritos por Hu et al (2021) e sua relação com genes diferencialmente expressos calculados pelo algoritmo *Model-based Analysis of Single Cell Transcriptomics* (MAST) (FINAK et al., 2015) usando a função *FindAllMarkers()* do Seurat (v 4.3.0) (HAO et al., 2021).

4.1.5. Citometria digital e análise de sobrevida

Para estudar o impacto clínico das diferentes subpopulações de linfócitos B, baixamos os dados de *bulk* RNA-Seq e dados clínico-patológicos da coorte de câncer de mama (BRCA) do banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) usando o pacote TCGAbiolinks (v.3.17)(COLAPRICO et al., 2016). Em seguida, estimamos as proporções dos subtipos celulares encontrados na análise nessas amostras de RNA-Seq em massa através de uma abordagem de deconvolução usando a ferramenta de citometria digital BayesPrism (v2.1) (CHU et al., 2022). Foram classificadas 45 assinaturas celulares, excluindo as subpopulações descritas com perfil proliferativo - incluindo fibroblastos, células endoteliais, mastócitos, células dendríticas plasmocitoides, células malignas e células normais de mama, macrófagos (n = 12), monócitos (n = 6), células dendríticas convencionais (n = 8), células T (n = 9), células NK (n = 2), neutrófilos (n = 3) (GUIMARÃES *et al.*, 2023). Sendo classificados e caracterizados 6 populações de linfócitos B (n = 6). Genes expressos em menos de 5 células, genes ribossômicos, genes mitocondriais, genes ligados aos cromossomos X e Y, além do gene MALAT, foram removidos usando a função *cleanup.genes()*. Depois disso, para obter resultados mais consistentes, filtramos genes codificadores de proteínas e usamos a função *get.exp.stat()* para selecionar genes

diferencialmente expressos entre estados celulares de diferentes tipos de células usando os parâmetros padrão, exceto para o parâmetro pseudo.contagem 0.1, uma vez que o dado era majoritariamente de 10x. Os parâmetros default da função *new.prism()* foram aplicados e utilizamos as células tumorais como referência. Em seguida, para avaliar o impacto de todos os tipos de células na sobrevida, calculamos o *hazard ratio* (HR) das frações relativas de cada população de tipo de célula dividida em quartis, com intervalos de confiança (IC) de 95% com base em estimativas de máxima verossimilhança para cada covariável através da utilização de modelo de regressão univariada de Cox ($p < 0.05$). Para essas análises foram utilizados os pacotes Survival (v3.5) e Survminer (v0.4.9) (KASSAMBARA *et al.*, [*s. d.*]; THERNEAU, 2023). A função *surv_cutpoint*() do pacote Survminer foi aplicada para dividir amostras entre grupos *High* e *Low* baseados no enriquecimento das subpopulações de linfócitos B entre os pacientes do TCGA. Em seguida, o método de Kaplan-Meier foi utilizado para visualizar a diferença entre as curvas de sobrevida global (OS) e tempo livre de progressão (PFI).

4.2. Modelo experimental murino de câncer de mama triplo negativo

4.2.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares de tumor de mama triplo-negativo 4T1 (ATCC, CRL-2539) e E0771 (CH3 Biosystems, 94001) foram gentilmente cedidas pela Drª. Miriam Lopes, Drª. Catarina Raposo Dias Carneiro e Dr. Sohail Tavazoie pertencentes ao Departamento de Farmacologia (ICB/UFMG), Faculdade de Ciências Farmacológicas (Unicamp), e Laboratório de Biologia Sistêmica do Câncer (Rockefeller University/EUA). (*) Ambas as linhagens utilizadas foram cultivadas sob condições estéreis em frascos de cultivo celular T25 ou T75 (Sarstedt) em meio RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco) suplementado com 10% de solução inativada de Soro Bovino Fetal (Gibco) e 1% de solução antibiótica penicilina/estreptomicina (10.000U/mL/10.000 µg/mL)(Gibco), mantidas em estufa a 37ºC e atmosfera de 5% de CO_2. Para manutenção das linhagens, o meio de cultura foi substituído a cada 2 ou 3 dias. Ao atingir aproximadamente 70% de confluência no frasco, as células foram subcultivadas, para tal o meio de cultura foi removido, as células lavadas com solução estéril de tampão fosfato salino 1X (PBS)(Gibco) e sequencialmente incubadas por 5 minutos a 37ºC na presença de 0.5 a 2 mL de solução de tripsina-EDTA (Gibco). Após o período correspondente, a solução foi neutralizada pela adição de 3x o volume de meio suplementado, transferidas para um tubo cônico de 15 mL (Sarstedt) e

centrifugas por 5 minutos a 1500 RPM em temperatura ambiente. Descartado o sobrenadante, as células foram ressuspendidas em meio suplementado e adicionados a um novo frasco.

A linhagem celular geneticamente modificada NB-21.2D9 foi gentilmente cedida por Dr. Garnett Kelsoe da Escola de Medicina (Duke University/EUA). A linhagem foi cultivada sob condições similares às descritas anteriormente(*), exceto pelo meio de cultura utilizado, sendo este OptiMEM (Invitrogen) suplementado com 10 nm HEPES (Gibco), 10% de solução Soro Bovino Fetal Hyclone (ThermoFisher), 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 50 μM 2-mercaptoetanol, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, 1 mM Vitaminas e 1 mM aminoácidos não essenciais (Gibco para todos).

4.2.2. Animais

Os estudos e experimentos descritos no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) e pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (Rockefeller University/EUA), sob protocolo de N° 215/2018. Camundongos fêmea isogênicos da linhagem BALB/c (△), C57BL/6 (┼) e S1PR2^{CreERT2} Rosa26$^{Low\text{-}Stop\text{-}Low\text{-}tdTomato}$ (*) com 8 semanas de idade, pesando entre 18 e 20 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)(△┼) ou Centro de Biociências Comparativas (┼*) (Rockefeller University/EUA). Os animais foram mantidos em condições sanitárias livre de patógenos específicos (*Specific pathogen-free – SPF)*, em mini-isoladores com racks ventiladas com acesso a água e ração autoclavadas *ad libitum*, temperatura entre 20 e 25°C e ciclo de luz controlada (ciclo de 12 horas).

4.2.3. Modelo tumoral de câncer de mama

Células tumorais 4T1 e E0771 livres de contaminação por *Mycoplasma sp.* foram removidas do frasco de cultivo celular através de incubação em solução de tripsina-EDTA, centrifugadas, lavadas e sequencialmente ressuspendidas em solução PBS 1X estéril. 5X10^5 células foram inoculadas (s.c.) na almofada de gordura mamária dos animais (4T1-BALB/c, E0771-C57BL/6 -S1PR2^{CreERT2} Rosa26$^{Low\text{-}Stop\text{-}Low\text{-}tdTomato}$). Animais do grupo controle foram inoculados com volume equivalente de solução PBS 1X ou isotipo correspondente (Seção 3.2.4). Após o inóculo inicial, os animais foram acompanhados duas vezes na semana para o acompanhamento do desenvolvimento tumoral e mensuração dos tumores com paquímetro. Os volumes tumorais foram estimados utilizando a seguinte

fórmula, Volume (V) = (Largura)^2 x Comprimento x 3.14 / 6. Após atingir o período correspondente de análise os animais foram sacrificados através da injeção intraperitoneal (i.p.) de solução anestésica 100 mg/kg cetamina + 5 mg/kg xilazina ou câmara de CO_2, ambos seguidos de deslocamento cervical. Após a excisão dos órgãos de interesse, pesagem e mensuração, as carcaças foram descartadas em saco de risco biológico e armazenadas em freezer -80°C até a realização de transporte para incineração.

4.2.4. Tratamento com Imunoterápicos

Os camundongos C57BL/6 ou S1PR2^{CreERT2}Rosa26$^{Low\text{-}Stop\text{-}Low\text{-}tdTomato}$ foram distribuídos aleatoriamente nos grupos controle/isotipo e tratamento. A intervenção foi iniciada 10 dias após a injeção inicial de células tumorais E0771 (5x10^5 células). Camundongos pertencentes ao grupo controle/isotipo e tratamento foram injetados (i.p.) duas vezes por semana com 250µg/50µl de *Rat* IgG1 *anti-horseradish peroxidase* (BioXCell, BE0088) + *Rat* IgG2a *anti-trinitrophenol* (BioXCell, BE0089) e *anti-mouse* PD-1 (BioXCell, BE0146) + *anti-mouse* LAG-3 (BioXCell, BE0174), respectivamente. A eutanásia dos animais foi realizada a cada duas doses para a avaliação de dose-resposta, e após seis doses em experimento para avaliação de dose definida.

4.3. Análise de subpopulações de células B por Citometria de Fluxo

4.3.1. Processamento de amostras

Baço

O órgão foi removido e mantido em meio de cultura RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco) a 4°C até o momento de processamento. Transferido para placa de 24 poços ou microtubos de 2 mL, o órgão foi macerado com auxílio da extremidade do êmbolo de seringa de 5 mL ou, alternativamente, com pistilo estéril para microtubos. Após homogeneizar, a amostra foi transferida para tubo cônico de 15 mL através de *cell strainer* 70 µm (Corning), centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos à 4°C, o sobrenadante descartado e eritrócitos lisados a partir da ressuspensão em 9 mL de água destilada por 10 segundos seguido a adição de 1 mL de PBS 10X, ou alternativamente, incubando as células em solução cloreto amônio potássio (ACK)(Gibco) por 2 a 3 minutos em gelo. Após a lise de eritrócitos, a amostra foi centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o

pellet celular ressuspendido em 0.5-1 mL de solução tampão fosfato salino (PBS 1X)(Gibco). As amostras foram mantidas em gelo até o momento de incubação com anticorpos.

Linfonodo

Após a remoção do órgão, o mesmo foi transferido para placa de 24 poços ou microtubos de 2 mL, o órgão foi macerado com auxílio da extremidade do êmbolo de seringa de 5 mL ou, alternativamente, com pistilo estéril para microtubos. Após homogeneizar, a amostra foi transferida para tubo cônico de 15 mL através de *cell strainer* 70 µm (Corning) e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante, o pellet celular foi ressuspendido em 0.5-1 mL de solução tampão fosfato salino (PBS 1X)(Gibco). As amostras foram mantidas em gelo até o momento de incubação com anticorpos.

Tumor (método não enzimático) - (ICB/FMG)

Retirada a massa tumoral do animal, a mesma foi transferida para microtubo de 2 mL contendo 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco). Com o auxílio de uma tesoura, o tumor foi reduzido a partes menores (2~3 mm). O homogenato tumoral foi transferido com pipeta para um tubo cônico de 15 mL contendo solução Ficoll™-Paque PREMIUM 1.084 (GE). Após centrifugação a 400 xg por 40 minutos a 20°C, a camada correspondente aos PBMCs foi cuidadosamente transferida com auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta longa para um novo tubo cônico de 15 mL. Após lavagem das células com 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 e centrifugação a 400 xg por 5 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em solução tampão fosfato salino (PBS 1X), sendo mantidas até o momento de marcação com anticorpos.

Tumor (método enzimático) – (Rockefeller University/EUA)

Após a remoção do tumor, o mesmo foi transferido para tubo cônico de 15 mL contendo 1 mL de meio de cultura RPMI-1640 GlutaMAX (Gibco). Com o auxílio de uma tesoura, o tumor foi reduzido a partes menores (2~3 mm) e transferido com pipeta para um tubo *gentleMACS C* (Miltenyi) contendo 100 µL de enzima D, 50 µL enzima R e 12.5 µL de enzima A. Após completar o restante de volume tumoral até 2,35 mL com meio de cultura, os tubos foram fechados e processados a 37°C por cerca de 40 minutos no dissociador de

tecido *gentleMACS Octo Dissociator* (Miltenyi) sob o programa 37_m_TDK_2. Finalizado, o homogenato tumoral foi transferido para um novo tubo cônico de 15 mL, adicionado 3x o volume de meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS e centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. Descartado o sobrenadante, foi-se adicionado 0,5-1 mL de solução fosfato salino (PBS 1X), sendo as células mantidas até o momento de marcação com anticorpos.

4.3.2. Marcação com anticorpos, painéis e estratégia de *gating*

Após a contagem das células utilizando câmara de Neubauer, as suspensões celulares foram identificadas, distribuídas em placa de 96 poços de fundo redondo (Sarstedt) e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. Sequencialmente, o sobrenadante foi descartado e as células incubadas em 50 µL solução *FC Block – Purified Rat Anti-mouse CD16/CD32* (0.005 µg/µl) (BD) + marcador de viabilidade celular (1:1000) (ver painel) em PBS 1X por 10 minutos a 4°C sob o abrigo de luz. As células foram sequencialmente ressuspendidas em tampão de marcação (PBS 1X + 2% FBS) e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. Descartado o sobrenadante, as células foram incubadas durante 1 hora a 4°C sob o abrigado de luz de acordo com o painel designado abaixo (50 µL/poço). Após a marcação, as células foram lavadas em tampão de marcação, centrifugadas a 1500 RPM a 4°C e ressuspendidas em 200 µL de tampão. As células foram analisadas pelos citômetros BD FACSFortessa (Faculdade de Farmácia/UFMG) ou BD FACSymphony A5 (Rockefeller University/EUA).

Painel I

Marcador	Fluorescência	Diluição	Fabricante / N° Cat
Live/Dead Yellow	Yellow (570 nm)	1:1000	Invitrogen / L34959
Anti-mouse CD45	FITC	1:300	Biolegend / 103108
Anti-mouse CD3	PE-CF594	1:200	BD / 562332
Anti-mouse CD4	BV421	1:200	Biolegend / 100437
Anti-mouse CD8	APC	1:100	Biolegend / 100712
Anti-mouse CD19	PE	1:300	Biolegend / 557399
Anti-mouse CD11b	PerCP-Cy5.5	1:300	BD / 561114
Anti-mouse Ly-6C	PE-Cy7	1:200	BD / 560593
Anti-mouse Ly-6G	APC-Cy7	1:200	Biolegend / 127624

População celular	Fenótipo
Linfócitos TCD4	CD45+ CD3+ CD4+
Linfócitos TCD8	CD45+ CD3+ CD8+
Linfócitos B	CD45+ CD19+
Células Mielóides Mononucleadas (MN)	CD45+ CD11b+ Ly-6C+ Ly-6G-
Células Mielóides Polimorfonucleadas (PMN)	CD45+ CD11b+ Ly-6C^{low-} Ly-6G+

Tabela 1. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel I.

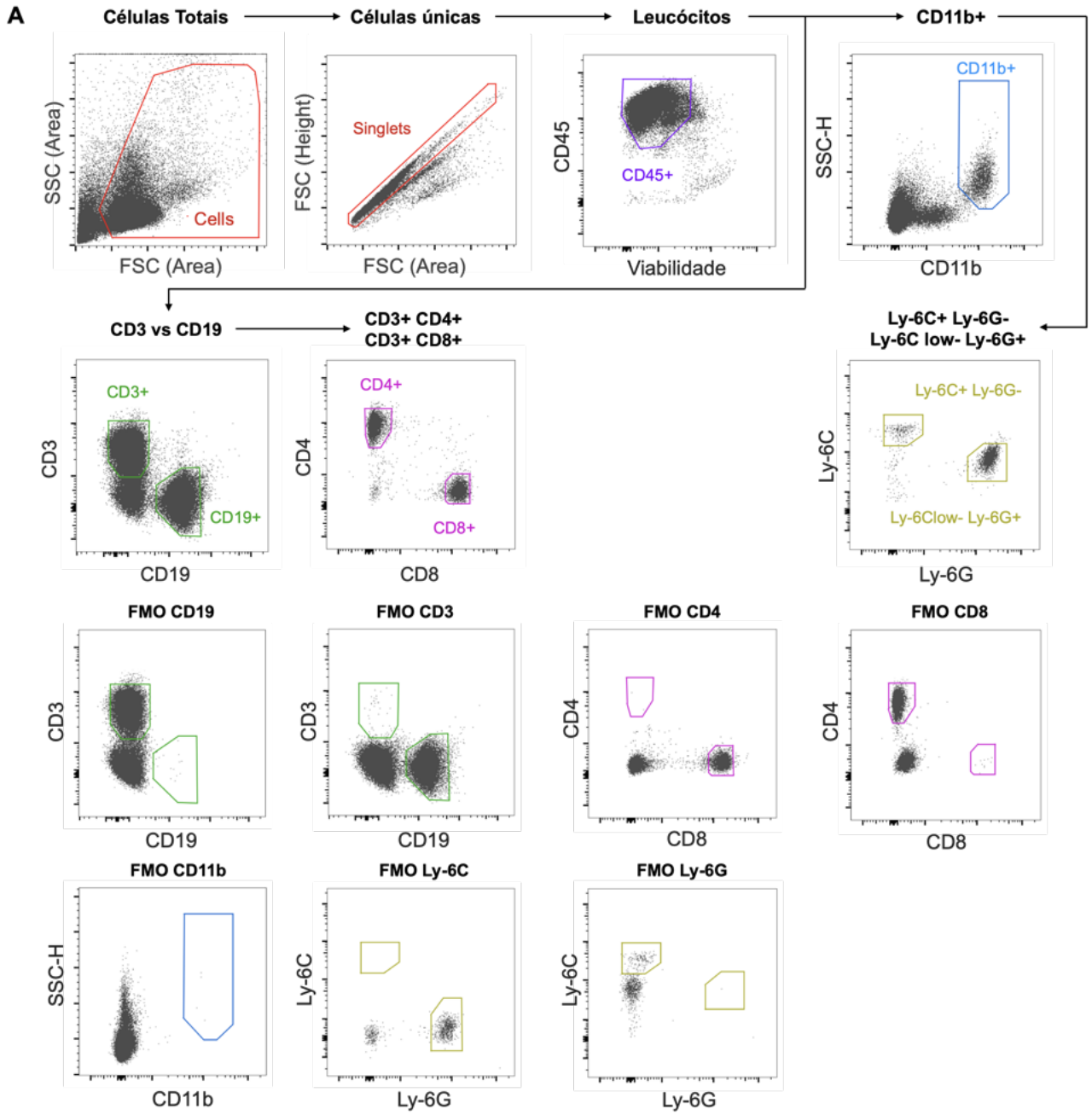


Figura 6. Estratégia de *gating* utilizada para análise de populações de origem linfoide e mielóide. Após a exclusão de debris, células totais foram selecionadas baseado em seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), sequencialmente foram selecionadas células únicas, leucócitos totais vivos baseados na expressão de CD45 e baixa / não expressão de marcador de células mortas. Células mielóides foram avaliadas a partir da expressão de CD11b e categorizadas em mononucleadas (MN)(Ly-6C+ Ly-6G-) e polimorfonucleadas (PMN)(Ly-6Clow- Ly-6G+). Linfócitos T foram avaliados a partir da expressão de CD3 e categorizados em TCD4 (CD3+ CD4+) e TCD8 (CD3+ CD8+). Linfócitos B foram determinados pela não expressão de CD3 e expressão de CD19. FMO (*Fluorescence minus one)*.

Painel II

Marcador	Fluorescência	Diluição	Fabricante / N° Cat
Live/Dead Yellow	Yellow (570 nm)	1:1000	Invitrogen / L34959
Anti-mouse CD45	AlexaFluor 700	1:300	BD / 560510
Anti-mouse CD19	PE-Cy5	1:300	Invitrogen / 15019381
Anti-mouse IgD	PE	1:300	Biolegend / 405706
Anti-mouse CD138	PE-Cy7	1:100	Biolegend / 142514
Anti-mouse CD5	FITC	1:100	BD / 553021
Anti-mouse CD1d	PacificBlue	1:100	Biolegend / 123517
Anti-mouse LAG-3	PE-Dazzle594	1:100	Biolegend / 125224

População celular	Fenótipo
Linfócitos B Naive	CD19+ IgD^{High}
Linfócitos B Naive ativado	CD19+ $IgD^{Int\text{-}Low}$
Plasmablastos e Plasmócitos	CD19 CD138+
Linfócitos B Pró B10	CD19+ CD5+ CD1d+
Linfócitos B LAG-3	CD19+ LAG-3+
Linfócitos B LAG-3 IgD	CD19+ LAG-3+ IgD^{High}
Plasmablastos/Plasmócitos LAG-3+	CD19 LAG-3+ CD138+

Tabela 2. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel II.

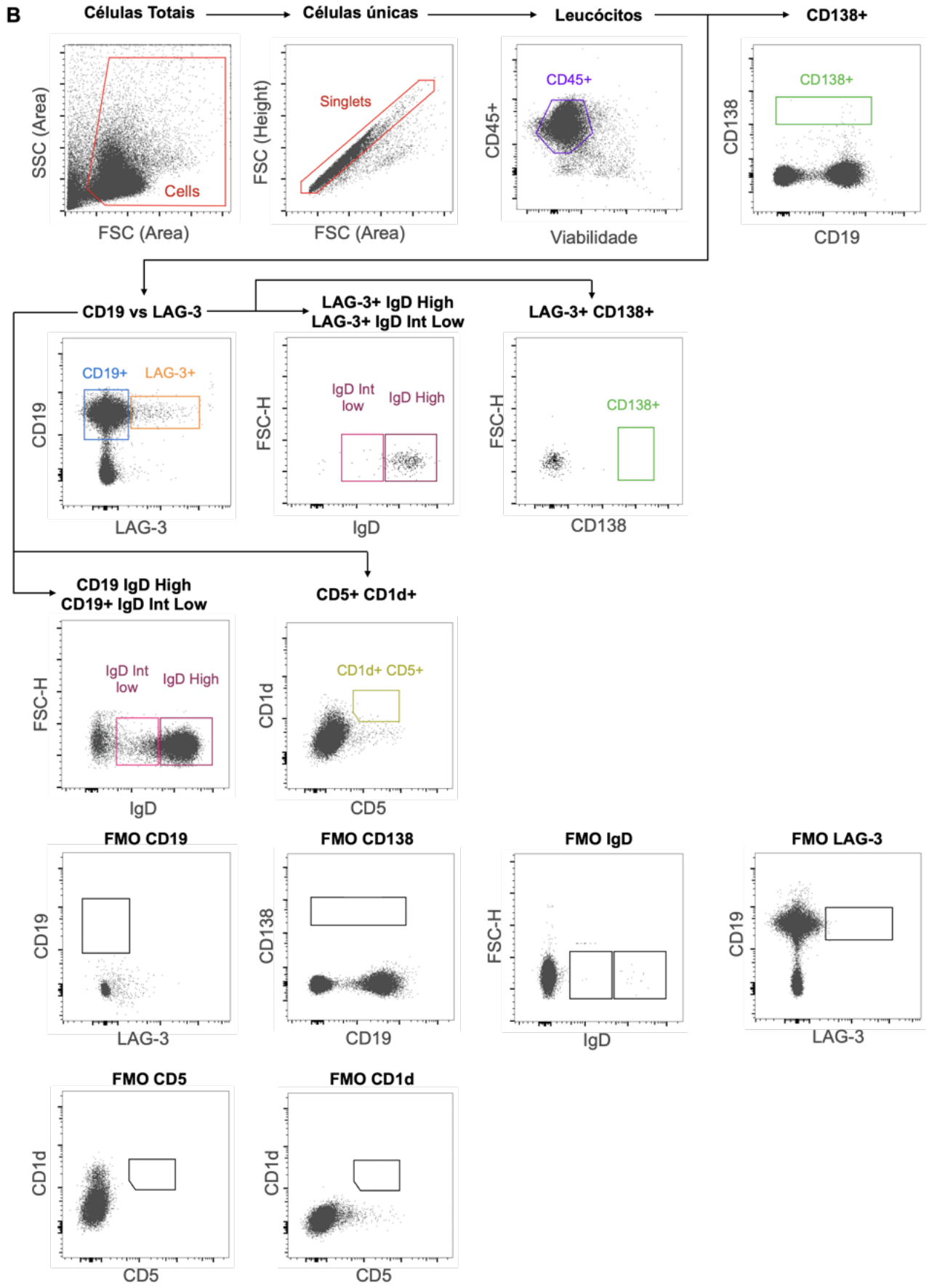


Figura 7. Estratégia de *gating* utilizada para análise de subpopulações de linfócitos B. Após a exclusão de debris, células totais foram selecionadas baseado em seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), sequencialmente foram selecionadas células únicas, leucócitos totais vivos baseados na expressão de CD45 e baixa / não expressão de marcador de células mortas. As diferentes subpopulações de linfócitos B foram

baseadas na expressão diferencial dos marcadores utilizados, sendo estes linfócitos B naive (CD19+ IgD^{High}), linfócitos B naive ativado (CD19+ $IgD^{Int-Low}$), linfócitos B Pró B10 (CD19+ CD5+ CD1d+), Plasmablastos/Plasmócitos (CD19 CD138+), linfócitos B LAG-3 (CD19+ LAG-3+), linfócitos B LAG-3 IgD (CD19+ LAG-3+ IgD+), Plasmasblastos/Plasmócitos (CD19 CD138+ LAG-3+). FMO (*Fluorescence minus one).*

Painel III

Marcador	**Fluorescência**	**Diluição**	**Fabricante / N° Cat**
Live/Dead IR	Yellow (785 nm)	1:1000	Invitrogen / L34992
Anti-mouse CD45	BUV395	1:300	BD / 564279
Anti-mouse CD19	BB515	1:300	BD / 564509
Anti-mouse B220	BV785	1:300	Biolegend / 130246
Anti-mouse CD95	PE-Cy7	1:100	BD / 557653
Anti-mouse CD38	BUV737	1:200	BD / 741748
Anti-mouse IgM *	PerCP-Cy5	1:300	Biolegend / 406511
Anti-mouse IgD *	APC	1:300	Biolegend / 405713
Anti-mouse IgG *	PE	1:100	Biolegend / 405307
Anti-mouse CD138	BV650	1:100	Biolegend / 142517

População celular	**Fenótipo**
Linfócitos B totais	CD45+ CD19+
Linfócitos B Centro Germinativo	CD19+ CD95+ $CD38^{low-}$
Plasmablastos / Plasmócitos	CD19 CD138+

Tabela 3. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel III. * Embora utilizados durante o processo de marcação, devido sinal ruim no momento da aquisição, os marcadores não foram utilizados na caracterização de populações celulares.

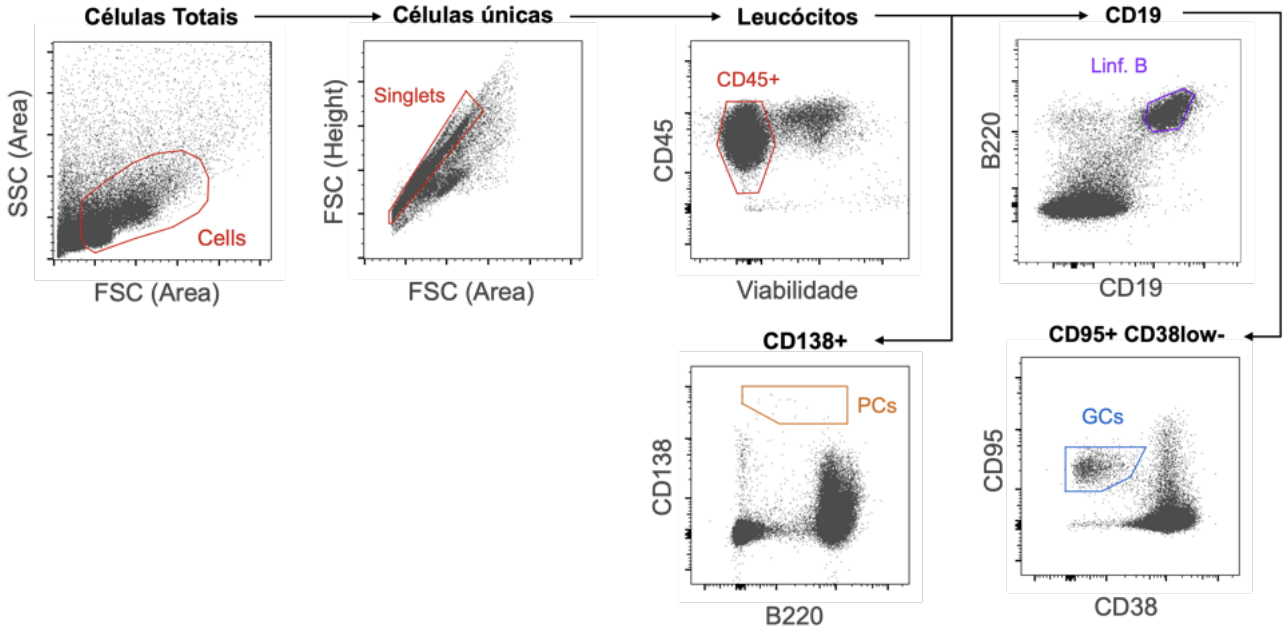


Figura 8. Estratégia de *gating* utilizada para análise de subpopulações de linfócitos B de centro germinativo e plasmócitos. Após a exclusão de debris, células totais foram selecionadas baseado em seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), sequencialmente foram selecionadas células únicas, leucócitos totais vivos baseados na expressão de CD45 e baixa / não expressão de marcador de células mortas. As diferentes subpopulações de linfócitos B foram baseadas na expressão diferencial dos marcadores utilizados, sendo estes linfócitos B totais (CD45+ CD19+ B220+), linfócitos B de centro germinativo (CD19+ CD95+ $CD38^{low-}$), plasmablastos/plasmócits (CD19 CD138+).

Painel IV

Marcador	Fluorescência	Diluição	Fabricante / N° Cat
Live/Dead IR	Yellow (785 nm)	1:1000	Invitrogen / L34992
Anti-mouse CD45	BUV395	1:300	BD / 564279
Anti-mouse CD3	BV786	1:200	Biolegend / 100232
Anti-mouse CD4	BV711	1:200	Biolegend / 100557
Anti-mouse CD8	BV605	1:200	Biolegend / 100744
Anti-mouse ICOS *	BV421	1:100	BD / 564070
Anti-mouse CXCR5 *	BV650	1:100	BD / 563981
Anti-mouse CD19	BB515	1:300	BD / 564509
Anti-mouse LAG-3	PE-Cy7	1:100	Biolegend / 125226
Anti-mouse PD-1	PerCP-Cy5.5	1:100	Biolegend / 135208

População celular	Fenótipo
Linfócitos B	CD45+ CD19+
Linfócitos TCD4	CD3+ CD4+
Linfócitos TCD8	CD3+ CD8+

Tabela 4. Marcadores, fluorescências, diluições, populações celulares e fenótipos referentes ao Painel IV. * Embora utilizados durante o processo de marcação, devido sinal ruim no momento da aquisição, os marcadores não foram utilizados na caracterização de populações celulares.

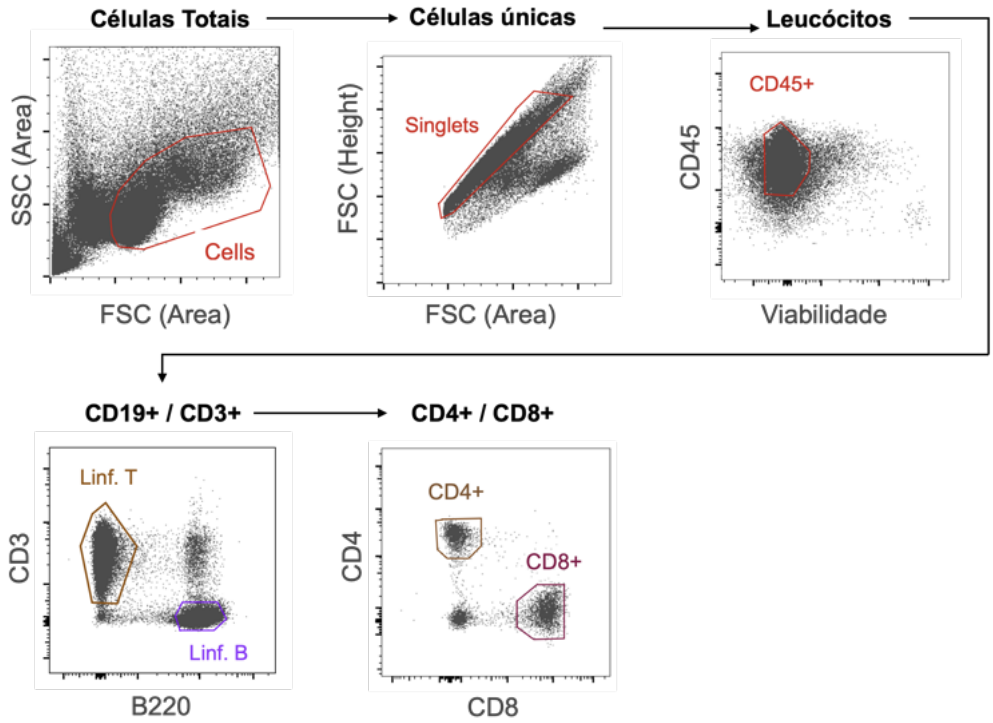


Figura 9. Estratégia de *gating* utilizada para análise de subpopulações de linfócitos B e T. Após a exclusão de debris, células totais foram selecionadas baseado em seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), sequencialmente foram selecionadas células únicas, leucócitos totais vivos baseados na expressão de CD45 e baixa / não expressão de marcador de células mortas. As diferentes subpopulações de linfócitos B foram baseadas na expressão diferencial dos marcadores utilizados, sendo estes linfócitos B totais (CD45+ CD19+ B220+), linfócitos TCD4 (CD3+ CD4+), e linfócitos TCD8 (CD3+ CD8+).

4.3.3. *Sorting* e cultura de linfócitos B de centro germinal

No dia anterior ao *sorting* de linfócitos B de centro germinativo (GC B), a linhagem celular NB-21.2D9 foi destacada do frasco de cultivo celular, ressuspensas em meio OptiMEM (Invitrogen) e expostas a 20 Gy (2.000 rads) de radiação gama durante 4 minutos e 30 segundos. Após a contagem das células utilizando um hemocitômetro, as células foram ressuspensas em OptiMEM suplementado e semeadas numa placa de fundo redondo de 96 poços (Corning) a 2500 células/poço. As células GC B foram separadas individualmente e cultivadas em co-cultura em meio OptiMEM suplementado com 4 ng/mL de IL-4 recombinante (R&D Systems) e 30 µg/m de LPS de *Salmonella typhimurium* (Sigma). No dia 2, metade do volume do meio de cultura foi removido e adicionado novo meio suplementado. Nos dias 3-6, dois terços do meio celular foram repostos. No dia 7, os

sobrenadantes das culturas foram recolhidos para ensaio ELISA. As células co-cultivadas foram mantidas em cultura por até 10 dias a 37°C e incubadas com 5% de CO2.

4.4. Visualização de Centros Germinais em linfonodos

4.4.1. Expressão condicional

A fim de visualizar as mudanças nos centros germinativos no linfonodo em função do desenvolvimento tumoral, fizemos o uso do sistema *Cre-Lox*. Para tal, realizamos a administração de 10 mg de tamoxifeno (Sigma) diluído em óleo de milho (Sigma, 50 mg/mL) por gavagem em animais S1PR2^{CreERT2} Rosa26$^{Low\text{-}Stop\text{-}Low\text{-}tdTomato}$. Foram realizadas duas administrações em intervalo de 3 dias nos dias 7 e 10 após o estabelecimento inicial de tumores E0771.

4.4.2. Imagem de linfonodos

Após a remoção, o linfonodo inguinal (iLN) coletados foram lavados em solução PBS 1X. O epitélio e o excesso de tecido gorduroso foram removidos sob microscópio de dissecação (Olympus, SZX7), lavado e montado em solução PBS 1X entre duas lamínulas unidas com graxa a vácuo. O iLN montado foi fotografado em um microscópio vertical Olympus FV1000 equipado com uma objetiva de imersão em água 25X 1.05NA Plan e um laser *Mai-Tai DeepSee Ti-Sapphire* (Spectraphysics). Para identificação de células B de centro germinativo tdTomato+, o iLN foi visualizado em l = 930 nm. O tecido foi mantido em um bloco de metal resfriado durante a preparação e a geração de imagens, que foram posteriormente plotadas e aprimoradas usando o software ImageJ.

4.5. Histologia e Imuno-histoquímica

4.5.1. Avaliação histopatológica e H&E

Após eutanásia, foram coletados o baço, linfonodo inguinal e tumor dos modelos tumores 4T1 e E0771. Brevemente, as amostras foram lavadas em solução PBS 1X e fixadas em solução tamponada de formaldeído – NBF (10% v/v) por 24 a 48h em temperatura ambiente (21°C). Após fixação o tecido foi extensivamente lavado em solução PBS 1X, avaliado macroscopicamente, clivados e incluídos em bloco de parafina. Foram confeccionadas lâminas histológicas de 4 µm com o auxílio de micrótomo, sendo estas

coradas por hematoxilina-eosina. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico convencional (Olympus, BX41).

4.5.2. Imuno-histoquímica

Para avaliação de linfócitos B totais e plasmablastos/plasmócitos nos tecidos tumorais, realizamos a marcação utilizando o kit Novolink (*Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Type, UK*). Foram preparados cortes histológicos dos tumores de 4 µm de espessura em lâmina gelatinizada. As lâminas foram submetidas a bateria de álcool etílico com concentrações decrescentes para hidratação do tecido, seguido da recuperação antigênica em calor úmido (banho-maria a 98 ºC por 20 minutos) ou calor úmido pressurizado (Pascal® *Pressure Cooker, Dako Cytomation, Glostrup*, *DNK*) por 2 minutos a 125°C com *Target Retrieval Solution Citrate* - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H_2O_2 10% v/v em álcool metílico. O bloqueio das proteínas endógenas foi realizado por 15 minutos seguido da incubação com o anticorpo primário de acordo com diluição e tempo especificados na Tabela 5. Em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário e polímero por 30 minutos cada e para marcação do complexo anticorpo primário/secundário utilizou-se o cromógeno 3'3-diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contra-corados com hematoxilina por 10 segundos.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de incubação
CD19	Invitrogen	60MP31	Pascal®	1:100	16h
CD138	Invitrogen	JM11-21	Pascal®	1:50	16h

Tabela 5. Reagentes de imuno-histoquímica. Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo.

A interpretação da marcação imuno-histoquímica foi realizada em microscopia óptica convencional (Olympus – BX41). Foram obtidas 10 imagens histológicas em aumento de 40x, por tumor/animal, para contagem de células imuno-marcadas (Microcâmera SPOT Basic® 3.4.5, adaptada em um microscópio Olympus - BX-41). Para quantificação de células marcadas com DAB, foram consideradas células com imunomarcação

citoplasmática, que apresentassem compatibilidade morfológica com linfócitos. A final foi obtida a média de células positivas em 10 campos de maior aumento (40x).

4.6. ELISA

4.6.1. Processamento de proteínas de linhagem celular e tecido tumoral

As culturas de células E0771 foram lavadas 3 vezes com PBS 1X estéril (Invitrogen) e separadas do frasco de tecido com um raspador de células estéril (Corning). As células foram brevemente ressuspensas em PBS estéril e subsequentemente centrifugadas a 1500 RPM durante 5 min (4°C). As células foram ressuspensas em tampão de lise (CellLytic MT, Sigma) contendo inibidor de protease (Halt Protease Inhibitor Cocktail, ThermoScientific) e incubadas durante 20 minutos em agitador a 4°C. As amostras de tumor removidas cirurgicamente foram lavadas 3 vezes com PBS estéril, pesadas e depois picadas com tesoura na presença de volume apropriado de tampão de lise CellLytic MT, Sigma) contendo inibidor de protease (Halt Protease Inhibitor Cocktail, ThermoScientific). As amostras de tumor foram ainda homogeneizadas com micropistilos descartáveis pré-resfriados (Fisher Scientific). As células lisadas foram centrifugadas a 4°C durante 15 minutos a 15.000 xg para sedimentar os restos celulares ou teciduais, e o sobrenadante contendo proteína foi transferido para um novo tubo. A proteína total foi avaliada através do ensaio BCA de acordo com as instruções do fabricante (Pierce, BCA Protein Assay Kit, Thermo). Os lisados celulares foram armazenados a -80°C até análise posterior.

4.6.2. Screening de produção de anticorpos por células B de centro germinativo

A produção total de Ig foi avaliada revestindo placas de 96 poços com *goat anti-mouse* Ig (Southern Biotech, 1010-01) a 1 µg/mL (1:2000) diluído em solução PBS 1X. Após incubação durante a noite a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS 1X Tween20 (0,05%) e bloqueadas com solução de BSA (2%) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavar as placas com solução PBS-Tween20, foram adicionados cerca de 20-30 µl do sobrenadante das culturas individuais de células B de centro germinal, sendo incubados por 2h a temperatura ambiente. Sequencialmente, as placas foram lavadas 3x com solução PBS-Tween20 e incubadas sob anticorpo secundário *Goat anti-mouse Ig, Horseradish Peroxidase (HRP)* diluído (1:2000) em solução PBS-BSA 1% por 2h a temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas 3x em solução PBS-Tween20 e o resultado relevado a partir da adição de solução TMB (Sigma). As reações foram desenvolvidas por cerca de 20 minutos ao abrigo de luz e finalizadas pela adição de 30 µl

de solução de HCl 1M. A absorbância a 450 nm foi medida num leitor de placas Fisher Scientific accuSkan FC. Para seleção de culturas produtivas foi-se estabelecido um valor de *cut off* de absorbância a 450 nm > 1. Os sobrenadantes de culturas produtivas foram devidamente identificados e transferidos para outra placa de 96 poços e armazenado a 4°C até análise posterior.

4.6.3. Capacidade de reconhecimento de antígenos tumorais

O reconhecimento de proteínas tumorais e de linhagem celular E0771 foi avaliado revestindo placas com 2,5 µg de proteína total previamente extraída. Após incubação durante a noite a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS 1X Tween20 (0,05%) e bloqueadas com solução de BSA (2%) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavar as placas com solução PBS-Tween20, foram adicionados cerca de 100 µl de sobrenadante das culturas individuais de células B de centro germinal previamente selecionadas, sendo incubados por 2h a temperatura ambiente. Sequencialmente, as placas foram lavadas 3x com solução PBS-Tween20 e incubadas sob anticorpo secundário *Goat anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase (HRP)* diluído (1:2000) em solução PBS-BSA 1% por 2h a temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas 3x em solução PBS-Tween20 e o resultado relevado a partir da adição de solução TMB (Sigma). As reações foram desenvolvidas por cerca de 20 minutos ao abrigo de luz e finalizadas pela adição de 30 µl de solução de HCl 1M. A absorvância a 450 nm foi medida num leitor de placas Fisher Scientific accuSkan FC. Como controle negativo foi-se utilizado o sobrenadante de células de centro germinal provenientes de modelo Sars-CoV.

4.6.4. Dosagem de anticorpos do soro

As placas de 96 poços foram recobertas com *goat anti-mouse* Ig (Southern Biotech, 1010-01) a 1 µg/mL (1:2000) diluído em solução PBS 1X. Após incubação durante a noite a 4°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS 1X Tween20 (0,05%) e bloqueadas com solução de BSA (2%) durante 2 horas à temperatura ambiente. O soro diluído (1:4000) foi adicionado ao poço correspondente ao isotipo testado e incubado por 2h a temperatura ambiente. Após lavar as placas com solução PBS-Tween20, foram adicionados cerca de 100 µl de anticorpo secundário conjugado com HRP em PBS-BSA 1% (Tabela 6), sendo incubados por 2h a temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas 3x em solução PBS-Tween20 e o resultado relevado a partir da adição de solução TMB (Sigma). As reações foram desenvolvidas por cerca de 20 minutos ao abrigo de luz e finalizadas pela

adição de 30 µl de solução de HCl 1M. A absorvância a 450 nm foi medida num leitor de placas Fisher Scientific accuSkan FC.

Anticorpo	Fabricante / N. Catálogo	Diluição
Goat anti-mouse IgA	SouthernBiotec, 1040-05	1:1500
Goat anti-mouse IgM	SouthernBiotec, 1021-05	1:2000
Goat anti-mouse IgG1	SouthernBiotec, 1070-05	1:2000
Goat anti-mouse IgG3	SouthernBiotec, 1100-05	1:2000

Tabela 6. Reagentes para mensuração de anticorpos no soro dos animais. Anticorpos secundários e diluições utilizadas.

4.7. Análise estatística

Os dados estão representados como média ± desvio padrão, ou somente dados individuais e média. Dados com distribuição normal foram analisados através do teste t de *Student* ou Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, já para amostras cuja distribuições consideradas não normais o teste de Mann- Whitney ou Análise de Variância Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foram utilizados. As análises foram feitas através do programa GraphPad-Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) e foram consideradas estatisticamente significativas os valores de $p \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Verificação de subpopulações de linfócitos B por ferramentas de bioinformática

Após a seleção de pacientes com tumores triplo-negativo no banco de dados TCGA que apresentavam amostras não tumorais pareadas, os dados de transcritoma foram obtidos através da ferramenta *TCGAbiolinks* e organizados para análise nas ferramentas de bioinformática xCell e CIBERSORTx. Ao final do processo de filtragem e verificação dos dados disponíveis foram obtidas dez pacientes com amostras não tumorais e tumorais pareadas (Tabela 7).

	Amostras não tumorais	Amostras tumorais
1	TCGA-BH-A0B3-11B-21R-A089-07	TCGA-BH-A0B3-01A-11R-A056-07
2	TCGA-BH-A0E0-11A-13R-A089-07	TCGA-BH-A0E0-01A-11R-A056-07
3	TCGA-BH-A18V-11A-52R-A12D-07	TCGA-BH-A18V-01A-11R-A12D-07
4	TCGA-BH-A1F6-11B-94R-A13Q-07	TCGA-BH-A1F6-01A-11R-A13Q-07
5	TCGA-BH-A1FC-11A-32R-A13Q-07	TCGA-BH-A1FC-01A-11R-A13Q-07
6	TCGA-E2-A158-11A-22R-A12D-07	TCGA-E2-A158-01A-11R-A12D-07
7	TCGA-E2-A1L7-11A-33R-A144-07	TCGA-E2-A1L7-01A-11R-A144-07
8	TCGA-E2-A1LH-11A-22R-A14D-07	TCGA-E2-A1LH-01A-11R-A14D-07
9	TCGA-E2-A1LS-11A-32R-A157-07	TCGA-E2-A1LS-01A-12R-A157-07
10	TCGA-GI-A2C9-11A-22R-A21T-07	TCGA-GI-A2C9-01A-11R-A21T-07

Tabela 7. Pacientes TNBC selecionadas para análise de subpopulações de linfócitos B. Identificação de amostras não tumorais (Coluna 1) e amostras tumorais (Coluna 2) pareadas por pacientes (linhas individuais).

Agrupando diferentes populações imunológicas para formulação da pontuação, a análise pela ferramenta xCell demonstrou elevação significativa de células imunológicas quando comparada às amostras pareadas de tecido mamário normal (Figura 10). A mudança no perfil celular no microambiente tumoral é reforçada pela diminuição na pontuação de células estromais, também sendo observado diferença significativa. Embora a análise por xCell tenha indicado a presença de diferentes perfis de linfócitos B nas amostras tumorais, foram detectadas elevações significativas para as subpopulações de linfócitos Pró-B, linfócitos B totais e plasmócitos, não sendo observados maiores alterações para linfócitos B naïve e linfócitos B de memória (total e *class-switched)* (Figura 10). De uma maneira discrepante, na análise pela matriz da ferramenta CIBERSORTx constatamos elevação significativa apenas para linfócitos B de memória, não sendo reportado diferença significativa para as populações de linfócitos B naïve ou plasmócitos (Figura 11).

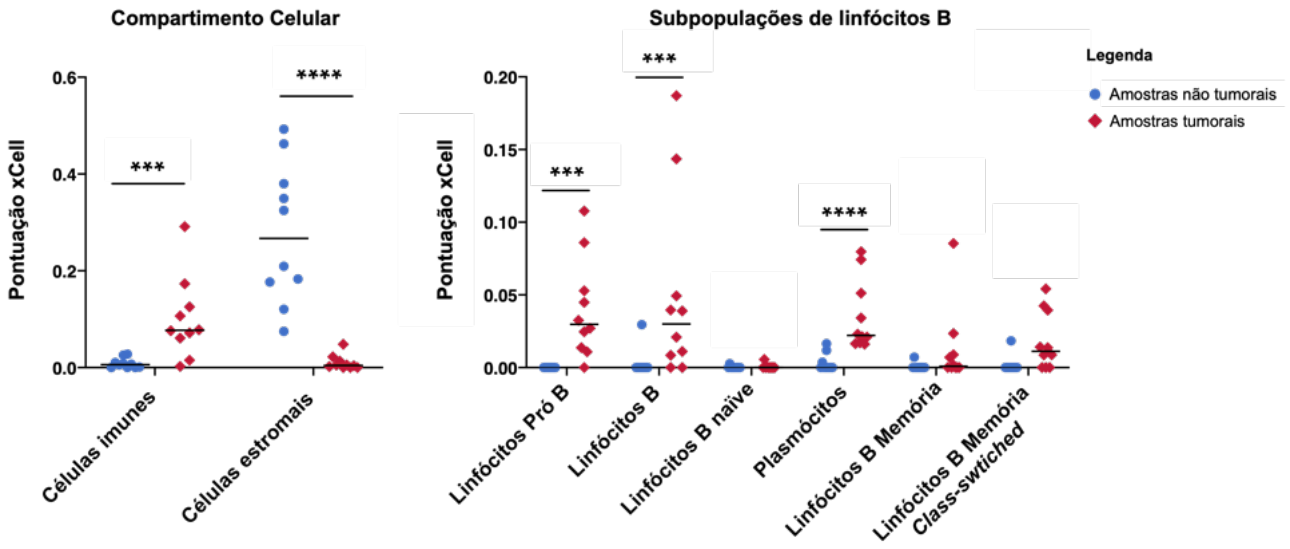


Figura 10. Análise comparativa entre diferentes populações celulares em amostras normais e tumorais. Comparativo de células imunes, estromais e subpopulações de linfócitos B (média) entre amostras não tumorais (azul) e tumorais (vermelho) de pacientes TNBC previamente selecionadas utilizando pontuações provenientes da análise pelo xCell. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

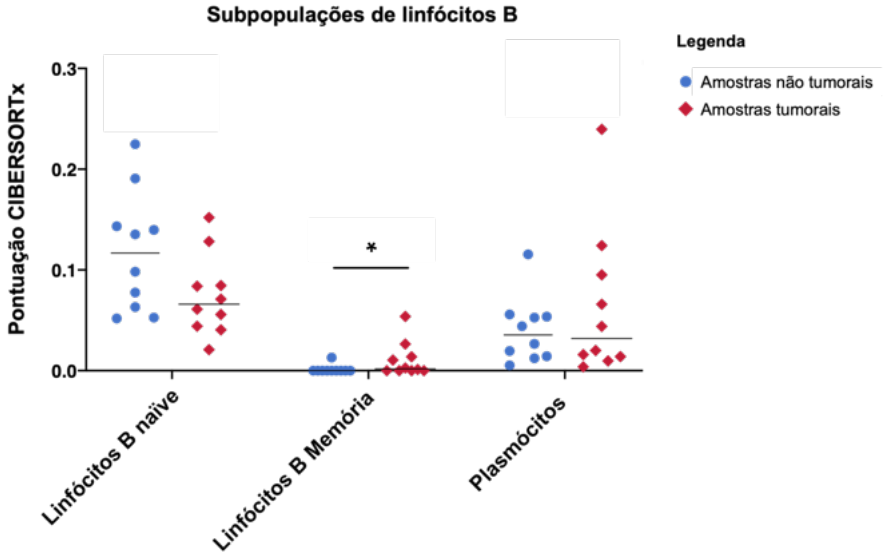


Figura 11. Análise comparativa de subpopulações de linfócitos B em amostras normais e tumorais utilizando CIBERSORTx. Comparativo de subpopulações de linfócitos B (média) entre amostras não tumorais (azul) e tumores (vermelho) de pacientes TNBC previamente selecionadas utilizando pontuações provenientes da análise pelo CIBERSORTx. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Embora resultados distintos tenham sido observados entre as ferramentas xCell e CIBERSORTx na análise de subpopulações de linfócitos B, ambas apontaram variação na pontuação das pacientes previamente selecionadas. A fim de melhorar verificar estas diferenças, realizamos a comparação entre as amostras normais e tumorais de forma pareada. A partir desta análise, constatou-se variação na pontuação das diferentes subpopulações de linfócitos B. As pacientes identificadas como A1FC e A1LH apresentaram

elevação de linfócitos B, plasmócitos e linfócitos B memória em análise pelo xCell, e aumentado de plasmócitos em análise por CIBERSORTx, ao passo que alterações menos pronunciadas foram observadas para pacientes A1LS e A2C9 em análise pelo xCell (Figura 12). Interessante notar que, embora haja concordância entre as duas ferramentas utilizadas para determinadas pacientes (A1FC e A1LH), divergências também foram constatadas, como por exemplo para paciente A2C9, em que CIBERSORTx apontou diminuição de plasmócitos entre o tecido normal e tumoral, enquanto em análise pelo xCell foi verificado elevação da pontuação (Figura 12).

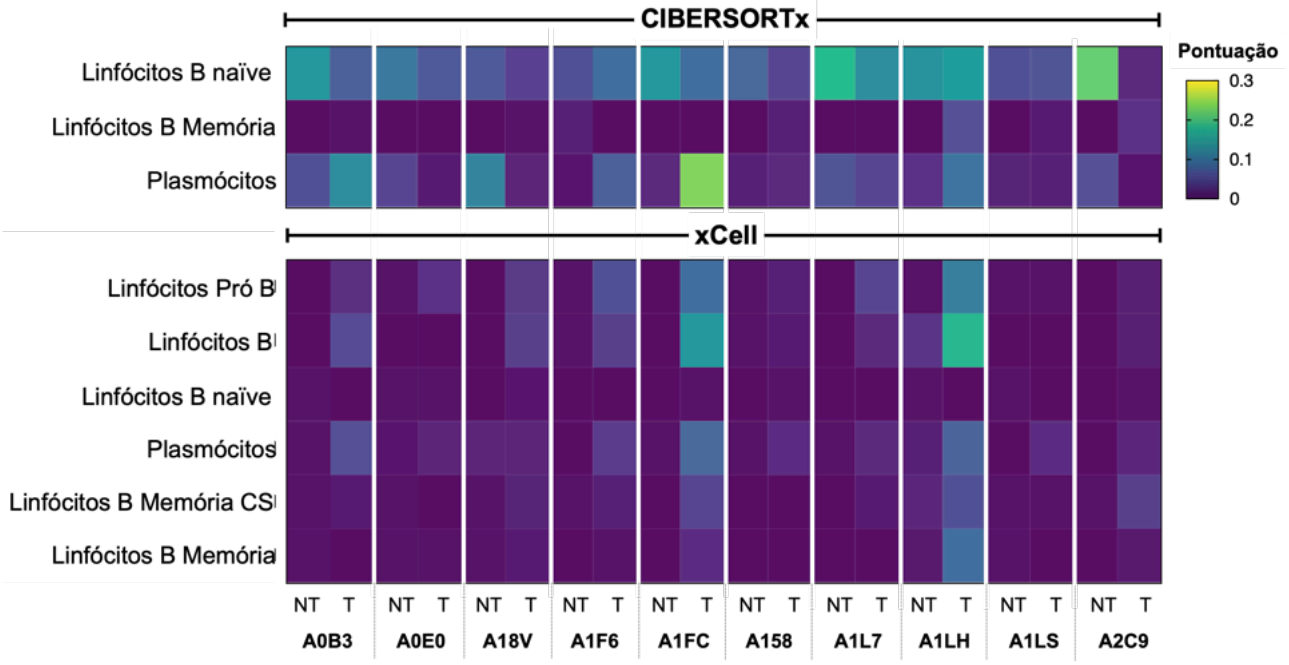


Figura 12. *Heatmap* para pontuações de subpopulações de linfócitos B. Pontuações de subpopulações de linfócitos B gerados em análise de CIBERSORTx e xCell de amostras pareadas não tumorais (NT, primeira subcoluna) e tumorais (T, segunda subcoluna) de pacientes TNBC selecionadas.

5.2. Refinamento na determinação de subpopulações de células B e análise de seu impacto na sobrevida de pacientes TNBC

Embora as ferramentas CIBERSORTx e xCell sejam capazes de discriminar entre as diferentes subpopulações de linfócitos B – ainda que de maneira limitada – nenhuma das ferramentas inclui a análise de células B de centro germinativo e subpopulações de linfócitos B de memória. Ainda, a definição e modo de análise das subpopulações de células B é distinta entre as duas ferramentas, causando discrepância nos resultados observados. Levando isso em consideração e buscando aprimorar as análises realizadas, desenvolvemos uma matriz própria a partir dos dados de *single-cell mRNA-seq*, sendo

também utilizada assinaturas gênicas de populações de memória definidas por Hu e colaboradores (HU et al., 2021a). Essa matriz foi elaborada em colaboração com o grupo da Dra. Mariana Lima Boroni Martins do INCA que incluiu as alunas Gabriela Rapozo Guimarães e Giovanna Resk Maklouf Corrêa. Para a construção da mesma, foi realizado a seleção de linfócitos B totais (21.947 células) entre as células do banco de dados de *single-cell mRNA-seq* (Figura 13A). Sequencialmente, foi realizada a exclusão de *doublets* e células contaminantes (monócitos, linfócitos T), sendo realizado um primeiro nível de anotação levando-se em consideração genes diferencialmente expressos. A partir desta análise foram obtidos quatro agrupamentos celulares: linfócitos B naïve (*CD19, MS4A1, IGHD, IGHM*), linfócitos B memória (*CD19, MS4A1, CD27*), plasmócitos (*IGHG1, IGHG2, MZB1, CD38*), e linfócitos B proliferativos (*CD19, MS4A1, CD14*) (Figura 13B).

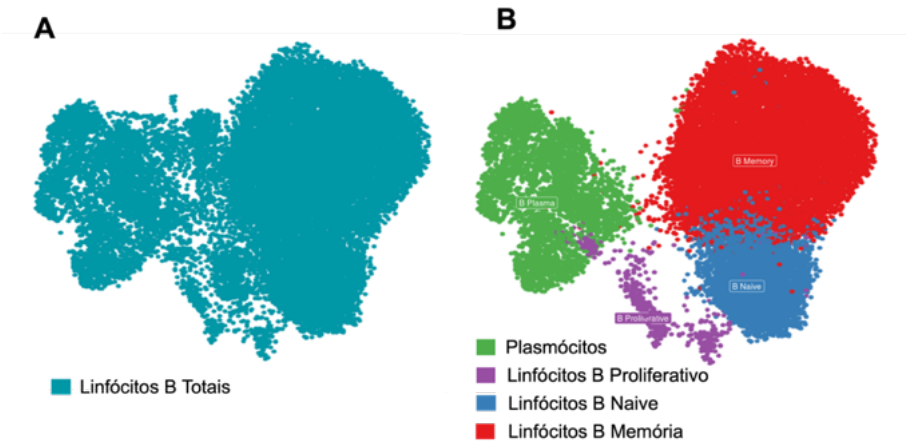


Figura 13. Avaliação e anotação de subpopulações de linfócitos B. (A) A partir de dados de *single-cell mRNA-seq*, 21.947 linfócitos B foram selecionados a partir da expressão de CD79A/B, MS4A1 e MZB1. **(B)** Linfócitos B totais foram agrupados de acordo com genes diferencialmente expressos, sendo agrupados em plasmócitos (verde), linfócitos B naïve (azul), linfócitos B de memória (vermelho) e linfócitos B proliferativos (roxo).

Embora o *cluster* nomeado de 'linfócitos B proliferativos' tenha demonstrado expressão de *CD19* e *MS4A1*, marcadores canônicos para linhagem B, a presença de CD14 – marcador de células mielóides, e expressão concomitante de diferentes isotipos de imunoglobulinas (*IGHM, IGHD, IGHG1, IGHG2*) leva a crer que estas populações sejam de transição, de modo que não seja possível classificar estas células em um único fenótipo, sendo estas excluídas para as próximas análises. Para determinação de células B de centro germinativo, avaliamos a expressão de BCL-6 e Fas (CD95) nas subpopulações de linfócitos B. Embora tenhamos detectado a presença de BCL-6 em ambos linfócitos B naïve e de memória (Figura 14A), e detecção de Fas (CD95) em linfócitos B de memória (Figura 14B), avaliando a expressão destes marcadores de forma conjunta, observamos área de densidade potencialmente associado a populações B de centro germinativo (Figura 14C).

A fim de confirmar estes achados, avaliamos a expressão do receptor de *immune checkpoint* PD-1 (*PDCD1*), este também um regulador importante nesta população celular. Corroborando com os achados anteriores, observamos a expressão de PD-1 na mesma área de BCL-6 + Fas (Figura 14D). Interessantemente, também verificamos a presença do *immune checkpoint* LAG-3 em área correspondente com os demais marcadores avaliados (Figura 14E-F). Adicionalmente, também observamos coexpressão de IgD em células B do centro germinativo (Figura 14G).

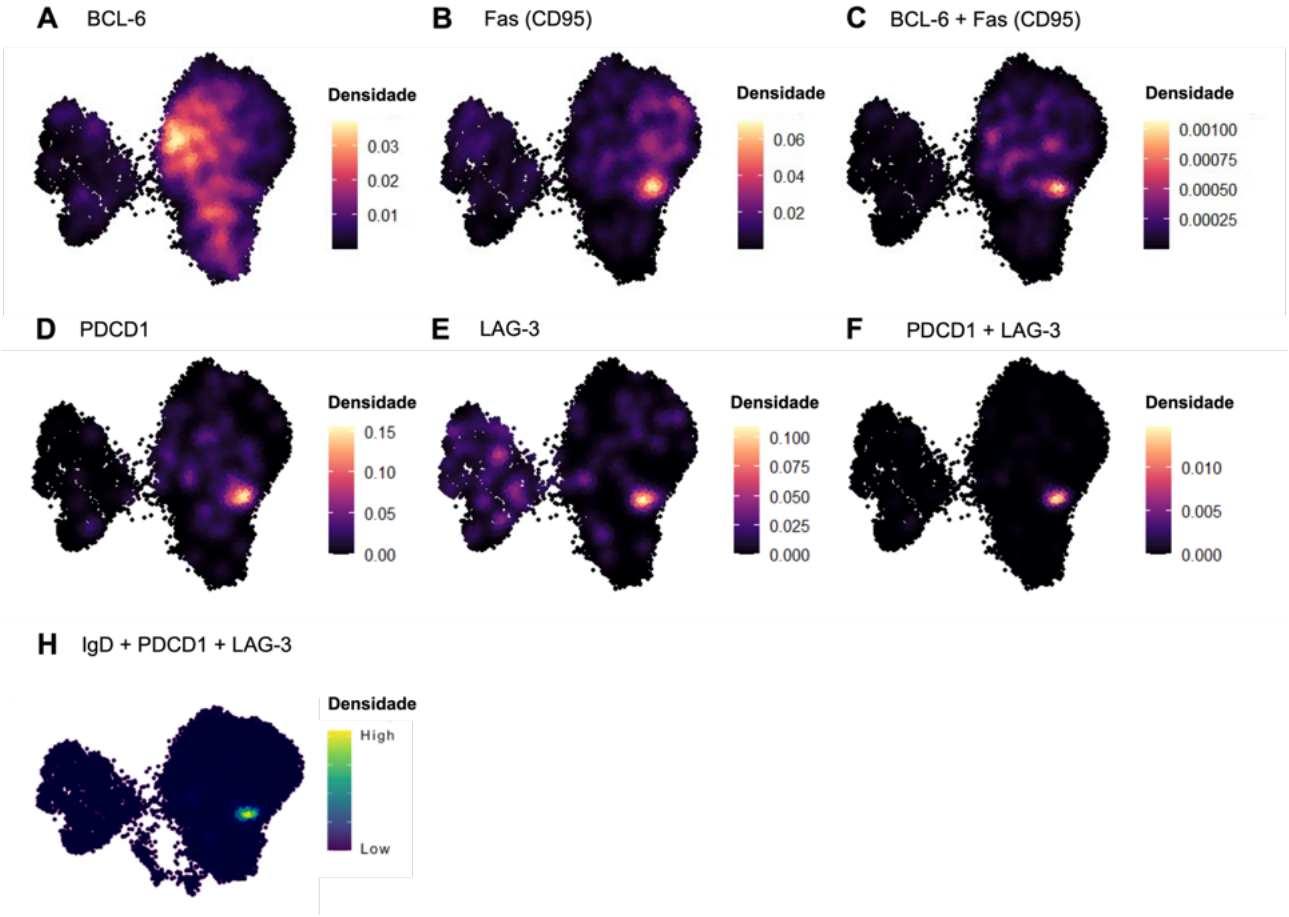


Figura 14. Avaliação de expressão de marcadores de células B de centro germinativo e de *immune checkpoints.* *Uniform Manifold Approximation and Projection* (UMAP) colorido pela densidade de expressão dos genes BCL-6 **(A),** Fas (CD95) **(B)**, BCL-6 + Fas (CD95) **(C)**, PDCD1 **(D)**, LAG-3 **(E)**, PDCD1 + LAG-3 **(F),** e IgD **(G)** entre linfócitos B previamente selecionados.

Em vista a importância de células B de centro germinativo no desenvolvimento da resposta imunológica humoral, assim como as limitações existentes na literatura quanto sua caracterização nos tumores de mama triplo-negativo, sequencialmente realizamos análise de genes diferencialmente expressos, e também vias mais enriquecidas para a população. Dentre os 15 genes diferencialmente expressos, observamos elevação destacada de *FCRL4, HCK, CCR1, ITGAX*, e *IFIT1* (Figura 15A). Avaliando as vias de enriquecimento a utilizando a base de dados *Reactome*, observamos enriquecimento de

via de coestimulação de CD28, além de vias de sinalização de IFN-ɣ, IFN-α/β, e resposta antiviral (Figura 15B).

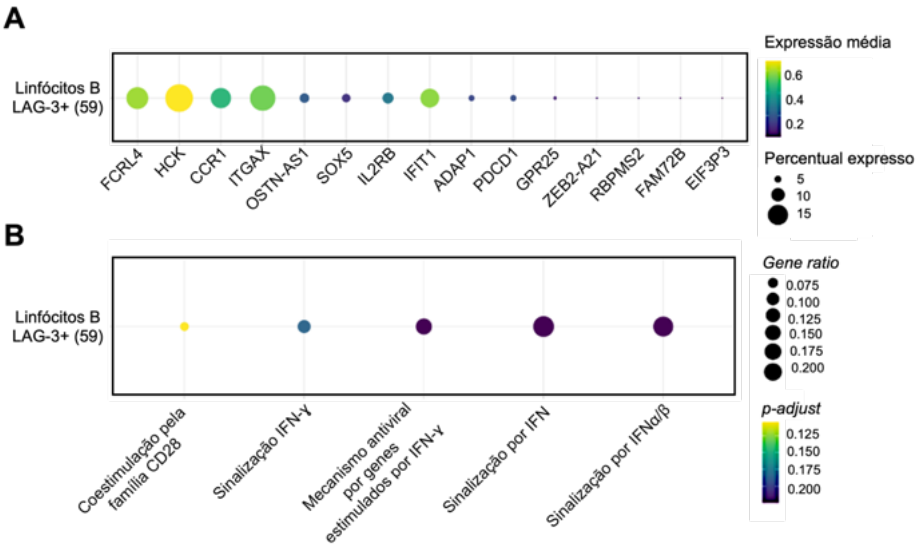


Figura 15. Genes diferencialmente expressos e vias de sinalização em células B LAG-3+. (A) Gráfico *dotplot* demonstrando os 15 genes diferencialmente expressos em linfócitos B LAG-3+. O tamanho do ponto indica o percentual de células que expressam o gene, e a cor representa a expressão normalizada. **(B)** Gráfico *dotplot* demonstrando vias enriquecidas para linfócitos B LAG-3+ utilizando base da dados *Reactome.* O tamanho dos pontos indica a razão de genes pertencendo a um tipo de via celular. A cor representa o *p-adjust.*

Após esta análise, e em consideração as classificações realizadas por Hu e colaboradores (HU et al., 2021b) quanto a linfócitos B infiltrantes tumorais, verificamos dentro do primeiro nível de anotação as potenciais subpopulações de linfócitos B de memória. Para esse fim, avaliamos a expressão de marcadores CD99, IgM/CCR7, NR4A1 (*NUR77*), CD24 e CD1c, entre as populações de linfócitos B expressando CD27 (Figura 16A). Verificamos diferentes áreas de densidades correspondentes à expressão de CD99, IGHM/CCR7 e em menor grau NR4A1 (*NUR77*) (Figura 16B-D). Apesar disso, embora também tenhamos constatado a expressão de CD24 e CD1c entre populações com expressão de CD27, a área de densidade destes marcadores foi verificada de modo mais esparso, de modo que os marcadores não foram utilizados para determinação de populações B de memória (Figura 16E-F).

Levando em consideração a expressão diferencial dos marcadores avaliados, realizamos uma nova anotação, de modo que foram estabelecidas seis subpopulações de linfócitos B: linfócitos B de centro germinativo, naïve, memória CCR7, memória *switched* NUR77, memória *switched* CD99, e plasmócitos, conforme demonstrado na figura 17A-B.

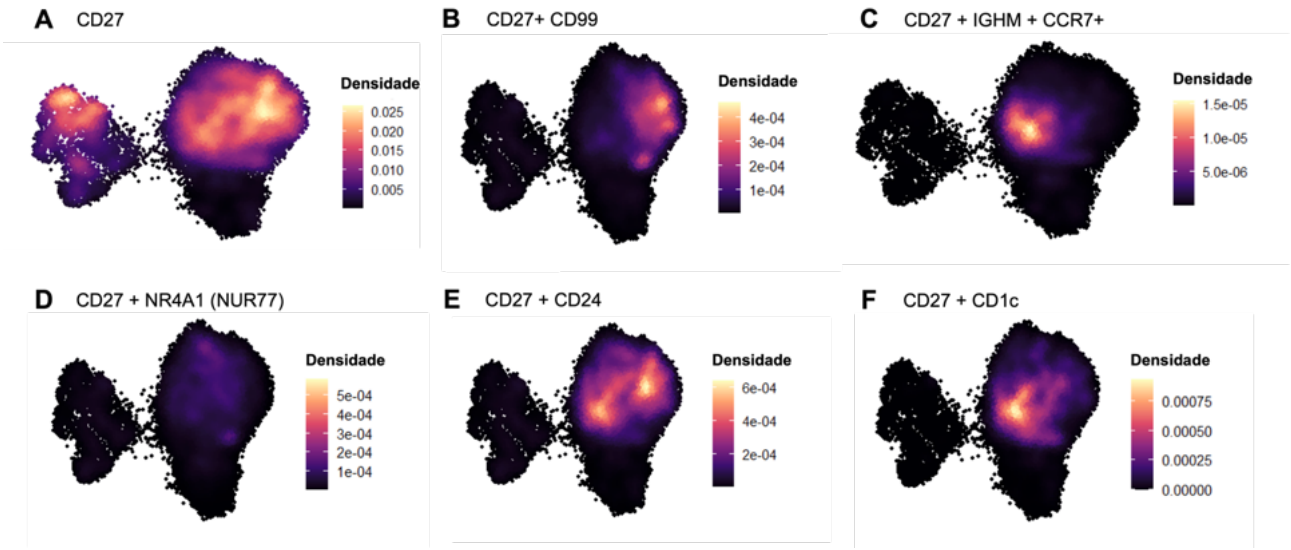


Figura 16. Avaliação de expressão diferencial entre linfócitos B de memória. UMAP colorido pela densidade de expressão dos genes CD27 **(A),** CD27 + CD99 **(B)**, CD27 + IGHM + CCR7 **(C)**, CD27 + NR4A1 (NUR77) **(D)**, CD27 + CD24 **(E)**, e CD27 + CD1c **(F)** entre linfócitos B de memória (CD27).

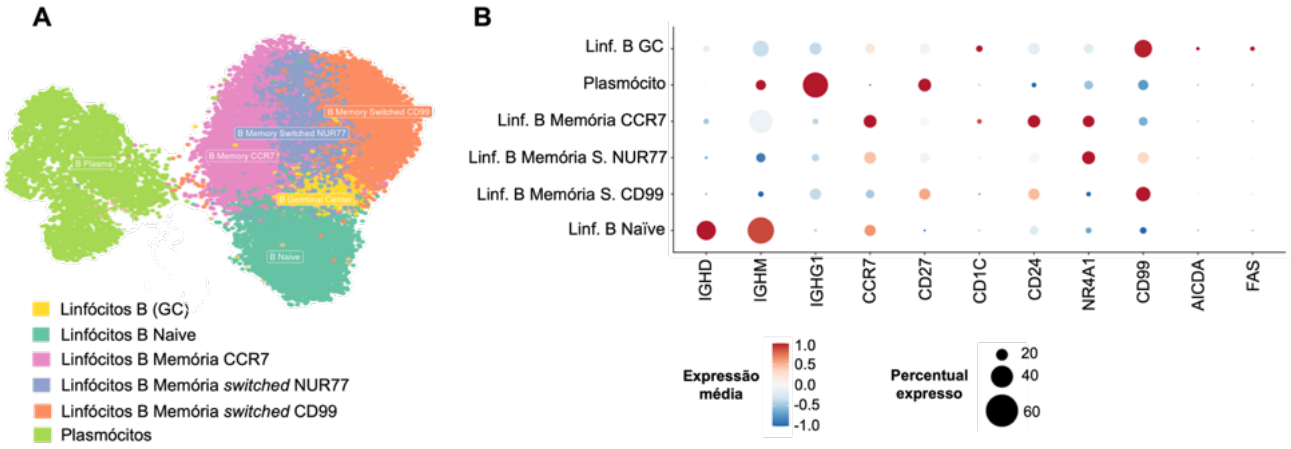


Figura 17. Nova anotação de subpopulações de linfócitos B tumoral infiltrantes. (A) Após a verificação de genes diferencialmente expressos, foram determinadas seis populações: linfócitos B de centro germinativo (GC)(amarelo), linfócitos B naïve (verde escuro), linfócitos B de memória CCR7 (lilás), linfócitos B de memória NUR77 (roxo), linfócitos B de memória CD99 (laranja), e plasmócitos (verde claro). **(B)** Nível de expressão dos principais genes diferencialmente expressos entre as subpopulações de linfócitos B anotadas.

Em sequência realizamos análise de deconvolução através da ferramenta BayesPrism (CHU et al., 2022), utilizando dados de transcritoma de pacientes TNBC do banco de dados TCGA. Embora tenhamos detectado as subpopulações de linfócitos B nas amostras de pacientes TNBC, estas células compreenderam parcela minoritária do total de células nas amostras tumorais. Corroborando com análise previamente realizada pelo xCell e CIBERSORTx, a partir da análise de cluster hierárquico não supervisionado das pacientes TNBC, observamos intensa variação na composição celular, com parcela das pacientes

(*cluster* C2) apresentando maior enriquecimento para subpopulações B, em destaque plasmócitos (Figura 18).

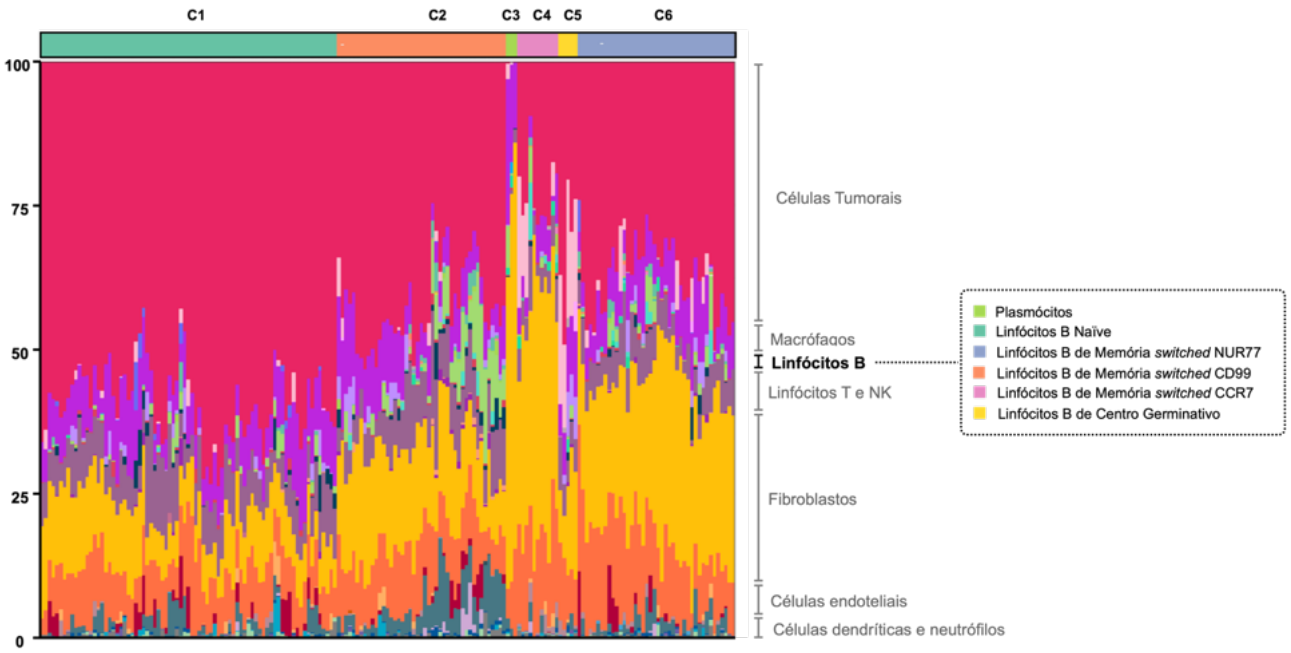


Figura 18. Avaliação de populações celulares totais e subpopulações de linfócitos B em pacientes TNBC. Gráfico de barras empilhadas demonstrando as frações relativas estimadas de cada tipo celular para amostras de pacientes TNBC (n = 112), a partir de análise no CIBERSORTx utilizando a nova matriz elaborada. Em destaque as subpopulações B: plasmócitos, linfócitos B naïve, linfócitos B de memória *switched* NUR77, CD99, CCR7, e linfócitos B de centro germinativo. C1-C6, representando os diferentes *clusters* obtidos a partir da análise de cluster hierárquico não supervisionada.

A fim de verificar as diferenças entre pacientes TNBC e demais subtipos da doença, em sequência verificamos e comparamos a presença das subpopulações de linfócitos B para subtipos Luminal A, Luminal B e HER2/neu, também incluindo a avaliação de amostras não tumorais. Embora todos os subtipos de câncer de mama apresentaram as subpopulações de linfócitos B previamente determinadas, pacientes TNBC apresentaram maior enriquecimento para todas as populações de linfócitos B (Figura 19).

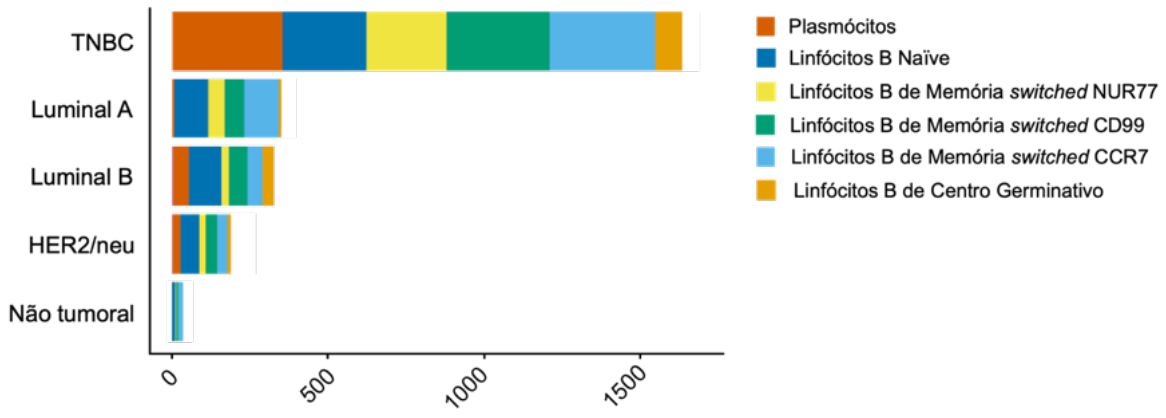


Figura 19. Avaliação de subpopulações de linfócitos B em diferentes subtipos de câncer de mama. Gráfico de barras empilhadas demonstrando as frações quanto ao número de células classificadas como plasmócitos (vermelho), linfócitos B naïve (azul), linfócitos B de memória *switched* NUR77 (amarelo), CD99 (verde), CCR7 (azul claro), e linfócitos b de centro germinativo (laranja) em amostras de pacientes TNBC, Luminal A, Luminal B, HER2/neu não tumoral.

Sequencialmente avaliamos qual seria o impacto de cada subpopulação de linfócitos B na taxa de sobrevivência global (OS) e no tempo livre de progressão da doença (PFI) através do método de Kaplan-Meier. Após segmentar as pacientes entre níveis elevados e baixos para cada uma das populações de linfócitos B, não observamos diferença significativa na taxa OS nas pacientes TNBC para o intervalo de 5 anos avaliado (Figura 20A-F). Apesar disso, demonstramos que pacientes que possuíam maior enriquecimento para células B de centro germinativo, linfócitos B naïve e memória *switched* CD99 tiveram melhor tempo livre de progressão da doença (PFI), sendo observado melhor controle quanto ao desenvolvimento dos tumores de mama triplo-negativo no intervalo de 5 anos (Figura 21A-C). Interessantemente, ainda que não tenhamos constatado diferença significativa, pacientes com maior enriquecimento para linfócitos B memória *switched* NUR77, CD99, e plasmócitos também apresentaram melhor tendência de PFI, sendo observado maior número de pacientes vivos após o período de 5 anos nos estratos com maior enriquecimento para estas populações (Figura 21D-F).

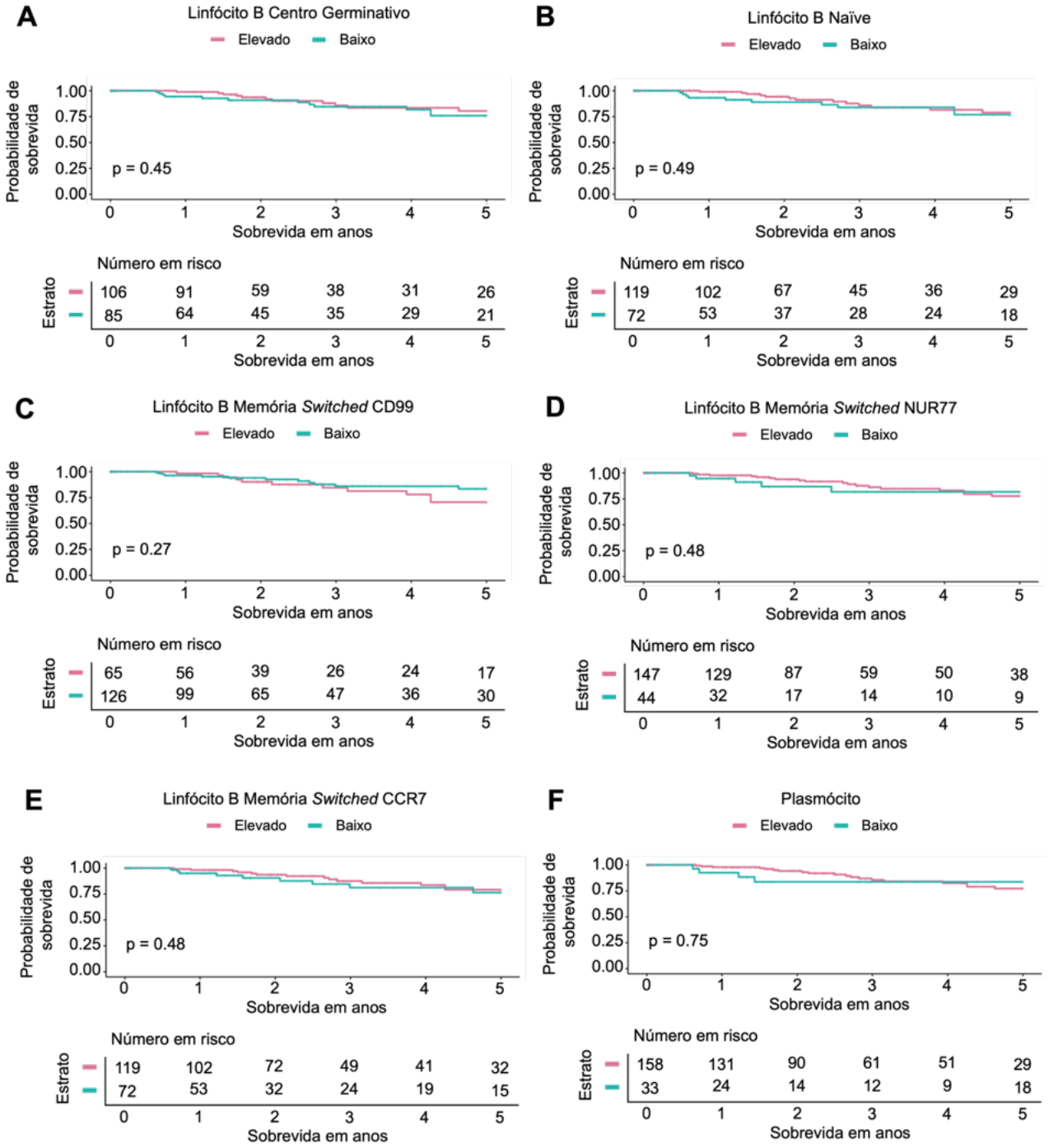


Figura 20. Taxa de sobrevivência global (OS) entre pacientes TNBC. Pacientes TNBC foram estratificadas em enriquecimento elevado (lilás) e baixo (verde), sendo a taxa de sobrevivência global (OS) estimada para as populações de linfócitos B de centro germinativo **(A)**, linfócitos B naïve **(B)**, linfócitos B memória *switched* CD99 **(C)**, NUR77 **(D)**, CCR7 **(E)**, e plasmócitos **(F).** Diferença estatística significativa $p < 0.05$.

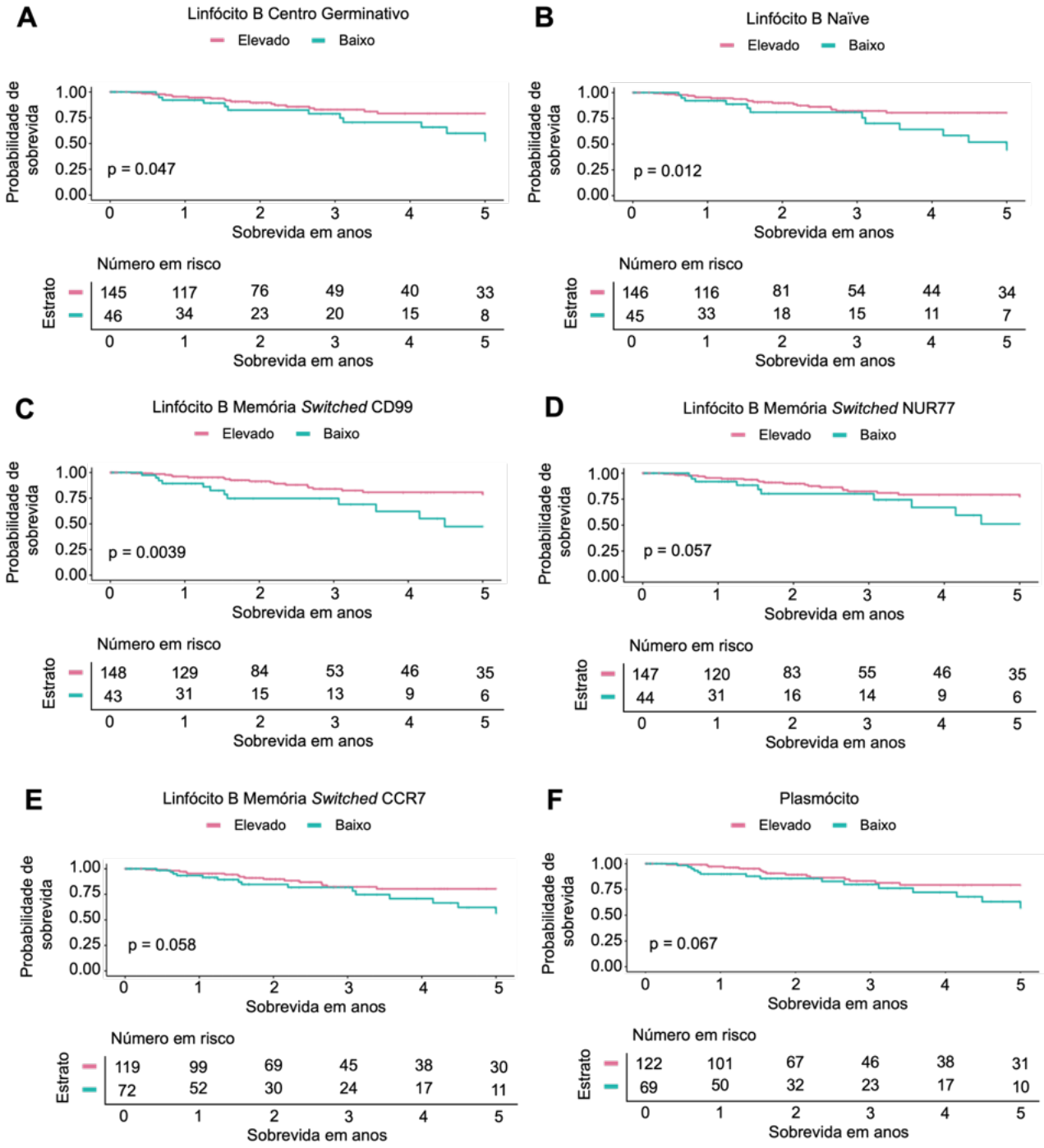


Figura 21. Tempo de sobrevida livre de doença (PFI) entre pacientes TNBC. Pacientes TNBC foram estratificadas em enriquecimento elevado (lilás) e baixo (verde), sendo o tempo de sobrevida livre de doença (PFI) estimado para as populações de linfócitos B de centro germinativo **(A)**, linfócitos B naïve **(B)**, linfócitos B memória *switched* CD99 **(C)**, NUR77 **(D)**, CCR7 **(E)**, e plasmócitos **(F).** Diferença estatística significativa $p < 0.05$.

5.3. Avaliação do impacto do desenvolvimento tumoral na dinâmica de linfócitos B

Ainda que nossos resultados demonstrem a elevada heterogeneidade de linfócitos B no microambiente tumoral de pacientes TNBC, dentre as quais linfócitos B de centro germinativo e linfócitos B de memória CD99 estejam associados a melhor controle da

progressão da doença, a análise utilizou dados de um momento específico da coleta de amostras, usualmente durante diagnóstico da doença. Em consideração a capacidade de células tumorais de modular a resposta imunológica durante a carcinogênese e, principalmente, a escassez de estudos que procurem avaliar os impactos do desenvolvimento do TNBC sob a dinâmica de linfócitos B, realizamos uma análise temporal, observando as consequências do crescimento tumoral desde o estabelecimento inicial da doença. Para tal, utilizamos dois modelos murinos de câncer de mama, cada qual representando um subtipo molecular intrínseco de tumores triplo-negativo (E0771: claudina-baixo, 4T1: basal-símile). Brevemente, camundongos fêmea de 8 semanas de idade BALB/c e C57BL/6 foram distribuídos de maneira aleatória em grupos controle e tumor, estes injetados com solução PBS e células tumorais (4T1 BALB/c, E0771 C57BL/6) na almofada de gordura mamária respectivamente, sendo sacrificados nos dias 7, 14 e 21 dias após o inóculo inicial. O baço, linfonodo inguinal e tumor dos animais foram extraídos e processados para análise por citometria de fluxo (coorte #1) e histopatologia (coorte #2). Os resultados foram segmentados por tecido avaliado para melhor compreensão.

5.4. Caracterização morfológica e histopatológica de tumores 4T1 e E0771

Embora igualmente classificados como tumores de mama triplo-negativo, tumores 4T1 e E0771 apresentaram dinâmica de crescimento distinta, com o primeiro mencionado apresentando maiores dimensões em todos os períodos temporais analisados (Figura 22A). Corroborando com os resultados macroscópicos, após mensurar o volume tumoral, fica destacado a expansão de tumores 4T1 ao longo do tempo, sendo observado mudança significativa no volume tumoral entre os períodos de 7 e 14 dias comparado ao período de 21 dias, sendo atingido um volume médio de 573 mm^3 (Figura 22B). Ainda que mudança no volume de tumores tenha sido verificado para o modelo E0771, esta foi menos pronunciada, somente sendo constatada diferença significativa entre o período de 7 e 21 dias, atingindo um volume médio de 142 mm^2 (Figura 22B). Estas diferenças foram também verificadas quando analisado a área e peso dos tumores, de modo que o modelo 4T1 apresentou elevação significativa - em destaque para o último período de análise (21dias) para área e peso tumoral (Figura 22C-D).

Apesar das diferenças na dinâmica de desenvolvimento, ambos os tumores 4T1 e E0771 apresentaram-se como massas subcutâneas sólidas, nodulares, compostos por células em padrão predominantemente cubóide, com acentuada anisocariose, citoplasma escasso e nucléolos evidentes (Figura 22E, coluna 1). Além disso, ambos os modelos foram

caracterizados pela formação de áreas necróticas ao longo do desenvolvimento tumoral, sendo verificadas a partir do dia 14, e mais frequentes nos tumores 4T1 (Figura 22E).

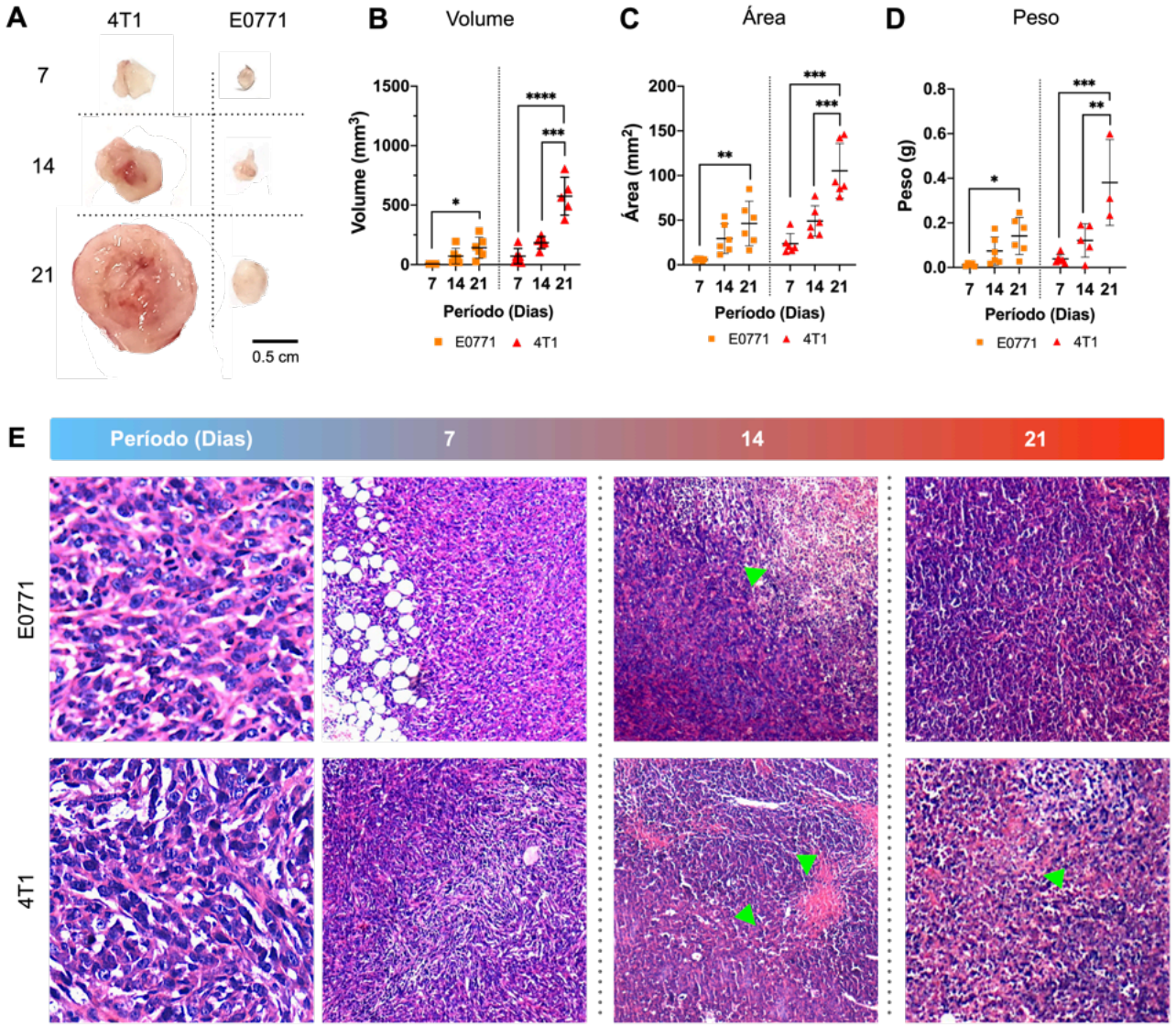


Figura 22. Caracterização morfológica, medidas e histopatologia de tumores. (A) Fotos representativas de tumores 4T1 (direita) e E0771 (esquerda) 7, 14 e 21 dias após inóculo inicial. Escala 0.5 cm. **(B)** Volume (mm^3), **(C)** área (mm^2), **(D)** peso (g) de tumores 4T1 (vermelho) e E0771 (laranja) 7, 14 e 21 dias após inóculo inicial. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. Cada ponto no gráfico representa o tumor de um único animal. E0771 (n=3-6), 4T1 (n=3-6). **(E)** Imagens representativas de lâminas coradas por H&E para tumores 4T1 e E0771 após 7, 14 e 21 dias de crescimento. Imagens obtidas em microscopia de luz. Coluna 1 (maior aumento, 40x) (7 dias), Colunas 2-4 (menor aumento, 4x). Setas indicando áreas necróticas. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Em oposição a infiltrado linfocitário observado em pacientes humanas, em que linfócitos podem ser encontrados em regiões distintas, constatamos que a maioria dos linfócitos existentes se encontravam na região peritumoral em ambos os modelos 4T1 e E0771, sendo estes visualizados de maneira esparsa no tecido conjuntivo adjacente a massa tumoral (Figura 23). Para a melhor caracterização dos infiltrados linfocitários,

realizamos análise imuno-histoquímica marcando linfócitos B (CD19) e plasmócitos (CD138). De maneira interessante, em ambos os tumores 4T1 e E0771 foi observado a presença de linfócitos B em todos os períodos avaliados e, igualmente aos achados anteriores, as células foram observadas majoritariamente na interface peritumoral (Figura 24A). Igualmente relevante, também se foi observado populações de plasmócitos nos tumores 4T1 e E0771 nos períodos avaliados, sendo estas células mais escassas (Figura 24B).

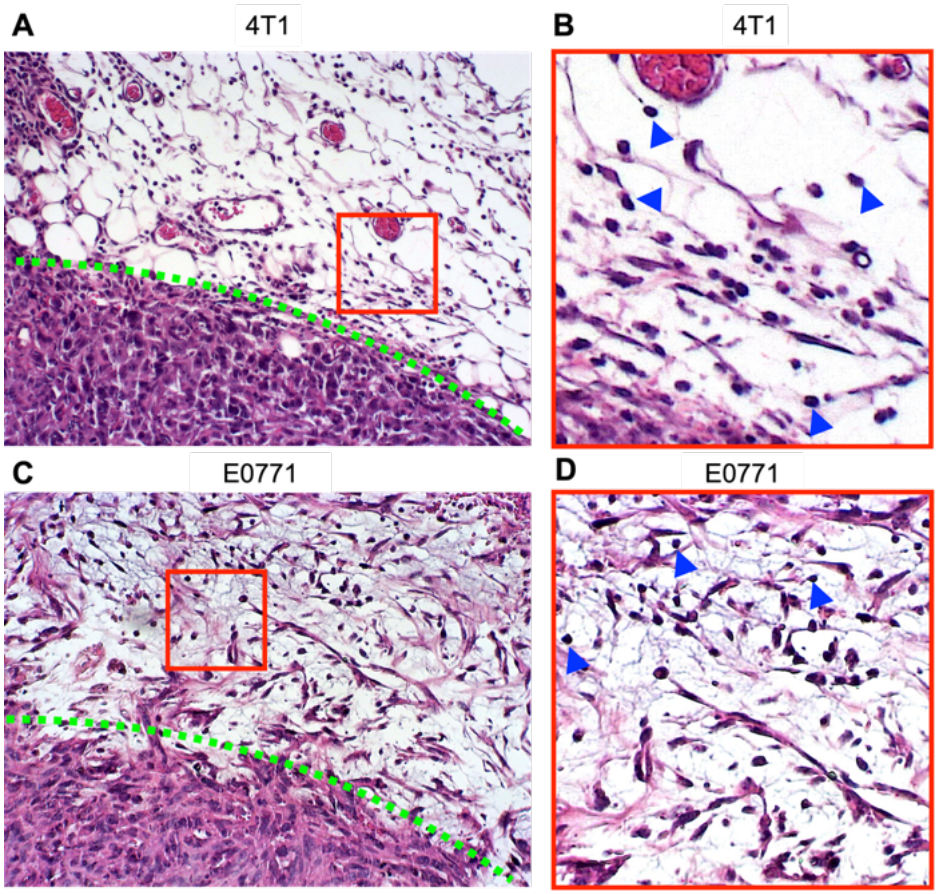


Figura 23. Avaliação de infiltrado linfocitário em tumores murinos. (A,B) Imagens representativas de lâminas coradas por H&E de tumores 4T1 após 14 dias de crescimento analisadas em microscopia de luz, em aumentos de 10x e 100x respectivamente. **(C,D)** Imagens representativas de lâminas coradas por H&E de tumores E0771 após 14 dias de crescimento analisadas em microscopia de luz, em aumentos de 10x e 100x respectivamente. Linha verde pontilhada demarcando interface tumor estroma. Quadrante vermelho referente a área amplificada (100x). Linfócitos (setas azuis).

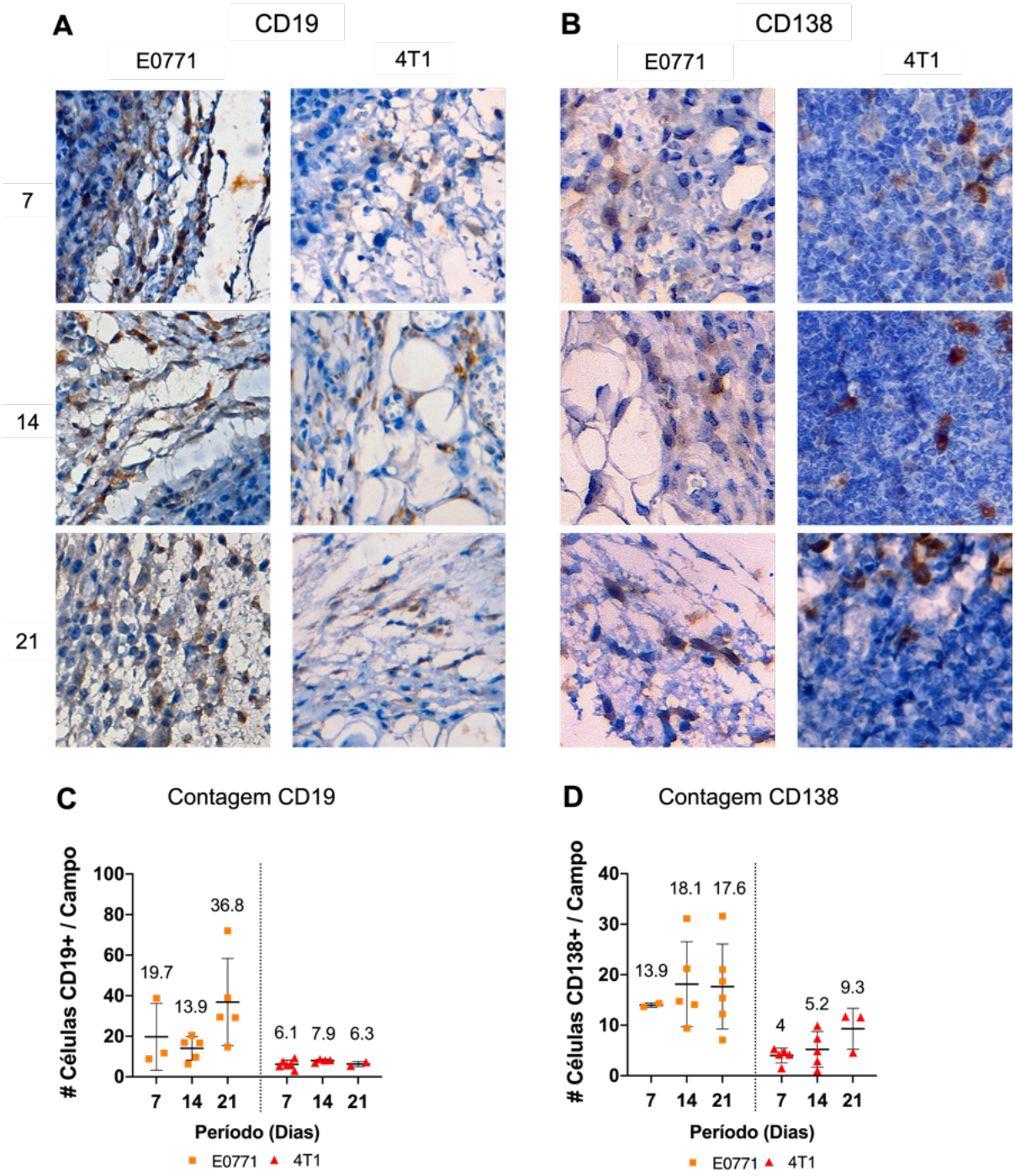


Figura 24. Avaliação e contagem de imuno-histoquímica de linfócitos B e plasmócitos em tumores (A) Imagens representativas de lâminas coradas com anticorpo anti-CD19 de tumores 4T1 (coluna direita) e E0771 (coluna esquerda) após 7, 14 e 21 dias de crescimento analisadas em microscopia de luz, em aumentos de 100x. **(B)** Imagens representativas de lâminas coradas com anticorpo anti-CD138 (plasmócitos) de tumores 4T1 (coluna direita) e E0771 (coluna esquerda) após 7, 14 e 21 dias de crescimento analisadas em microscopia de luz, em aumentos de 100x. As respectivas populações são verificadas pela coloração marrom. Cortes corados por DAB e contra corados em Hematoxilina. Contagem de linfócitos B **(C)** e plasmócitos **(D)** (número de células/campo) em lâminas de tumores E0771 (laranja) e 4T1 (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de desenvolvimento. Números acima de cada período e modelo tumoral representando a contagem média para linfócitos e plasmócitos. Média ± desvio padrão.

Ainda que linfócitos B tenham sido observados nas lâminas de ambos os modelos, constatamos diferença entre os mesmos ao realizar a contagem das células. Curiosamente, a despeito de desenvolvimento menos agressivo comparado aos tumores 4T1, verificamos contagem mais elevada de linfócitos B em tumores E0771. Embora tenhamos observado elevação no período de 21 dias para estes tumores (média = 36.8 células/campo), devido à grande variabilidade entre os animais, não observamos mudanças estatísticas significativas comparado aos períodos de 7 e 14 dias. Interessantemente, as contagens de linfócitos B em todos os períodos nos tumores 4T1 foram relativamente baixas, em média entre 6 a 7 linfócitos B/campo (Figura 24C). Corroborando com estes achados, também observamos maior contagem de plasmócitos nos tumores E0771 em relação ao 4T1, sendo verificado quase o dobro de plasmócitos no período de 21 dias nos tumores E0771 comparado com 4T1 (17.6 vs. 9.3 plasmócitos/campo), respectivamente. Em semelhança aos resultados anteriores, não observamos diferença significativa para contagem de plasmócitos entre os períodos avaliados, ainda que elevação tenha sido constatada para ambos os modelos ao longo dos dias de desenvolvimento tumoral (Figura 24D).

5.5. Avaliação da dinâmica de subpopulações de linfócitos B no infiltrado tumoral

A fim de confirmar os resultados obtidos pela análise imuno-histoquímica realizamos o processamento e avaliação de diferentes populações de linfócitos B por citometria de fluxo utilizando uma segunda coorte experimental. Curiosamente, embora tenhamos constados linfócitos B em amostras tumorais, reportamos diminuição na frequência destas células no modelo E0771 entre 7 e 21 dias de desenvolvimento tumoral. Apesar da divergência para este modelo tumoral, resultados semelhantes foram verificados para o modelo 4T1, não sendo observado alteração significativa na frequência de linfócitos B totais durante o período analisado (Figura 25).

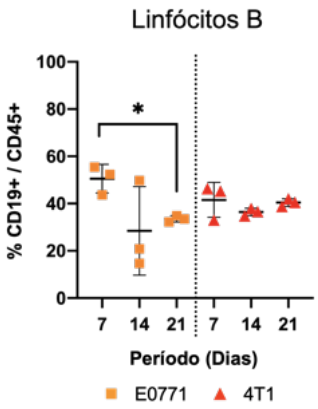


Figura 25. Frequência de linfócitos B totais tumorais. Frequência de células B em tumores E0771 (laranja) e 4T1 (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de crescimento. Pontos individuais representam um *pool* de três tumores/animais (n = 3). Linhas horizontais representando média. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Apesar das diferenças entre os modelos, constatamos que ambos apresentaram perfil fenotípico semelhante, sendo observado predomínio de populações com expressão elevada de IgD (*high)* (>70%), sugerindo que a maior parcela das células B tumoral infiltrantes sejam linfócitos B naïve (Figura 26). Embora não tenhamos constatado alteração na frequência desta população no modelo tumoral 4T1, observamos elevação entre o dia 7 e 21 dias de desenvolvimento tumoral E0771 (Figura 26A). Levando em consideração a diminuição de IgD após reconhecimento antigênico pelo complexo BCR-MHC, também constatamos a presença de populações com expressão intermediária a baixa de IgD. Curiosamente, ambos os modelos tumorais apresentaram diminuição para estas populações celulares - ainda que em períodos distintos, sendo observado diminuição entre 7 e 14 dias para o modelo 4T1, ao passo que decréscimo para o modelo E0771 foi verificado somente entre os 14 e 21 dias (Figura 26B). Apesar de ambas as populações anteriores sugerirem processo de diferenciação celular no TME, não verificamos a presença de plasmócitos (CD138+) em nenhum dos modelos e períodos avaliados (Figura 26C), achados estes que contrastam com os resultados de imuno-histoquímica.

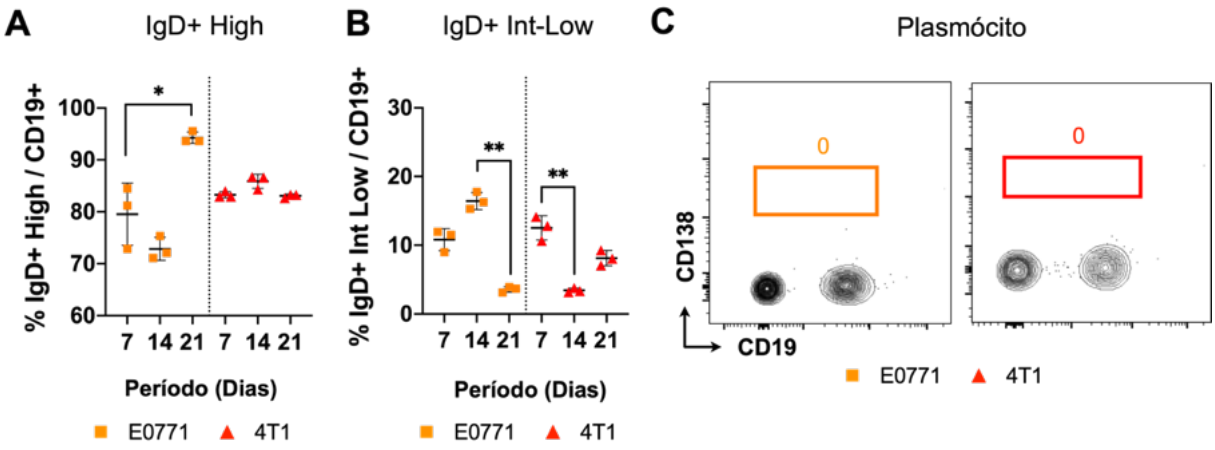


Figura 26. Frequência de subpopulações de linfócitos B em amostras tumorais. Frequência de células B IgD elevado (*high*) **(A)**, linfócitos B IgD intermediário-baixo (*Int-low*) **(B)** em tumores E0771 (laranja) e 4T1 (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de crescimento. Pontos individuais representam um *pool* de três tumores/animais (n = 3). **(C)** *Gating* para demarcação de plasmócitos (CD138+) em tumores E0771 e 4T1 (21 Dias). Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

De maneira interessante, também constatamos linfócitos com expressão de LAG-3, fenótipo este correspondendo a cerca de 1-3% dos linfócitos B totais em ambos os modelos

tumorais (Figure 27A). Apesar da frequência semelhante, somente no modelo 4T1 foi verificado alteração, sendo observado elevação significativa no período de 14 dias, sendo constatado uma elevação de 5 vezes na frequência entre os períodos de 7 e 14 dias (1.55% vs. 8.23%). Apesar disso, a elevação na frequência não se manteve, sendo verificada diminuição em período subsequente e retorno da frequência celular a valor semelhante ao observado no início do desenvolvimento tumoral (1.99%) (Figure 27A). Avaliando diferentes marcadores entre as populações B LAG-3+, observamos que a maioria destas células possui expressão elevada de IgD. Embora maior variação na frequência nas amostras deste perfil celular tenha sido observada para o modelo E0771 em comparação ao modelo 4T1, não foram constatadas alterações significativas (Figure 27B). Curiosamente, embora o número de células/eventos tenha sido baixo em ambos os modelos 4T1 (≤ 120) e E0771 (≤ 50), também verificamos população CD19+ LAG-3+ com baixa ou sem expressão de IgD, em destaque nos períodos de 14 e 21 dias para tumores 4T1 (Figura 27C).

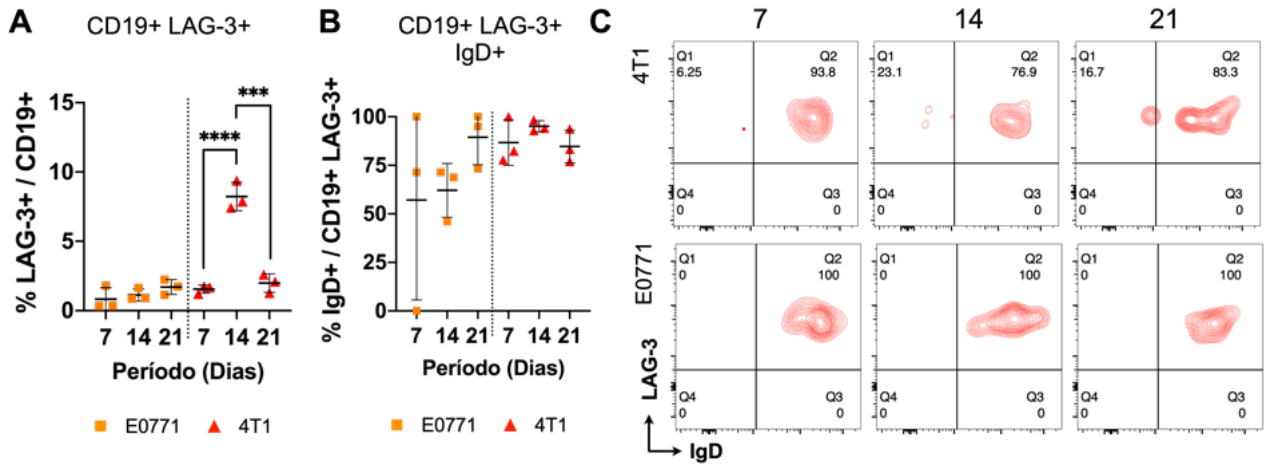


Figura 27. Frequência de subpopulações de linfócitos B LAG-3+ em amostras tumorais. Frequência de linfócitos B LAG-3+ **(A),** linfócitos B LAG-3+ IgD+ **(B)** em tumores E0771 (laranja) e 4T1 (vermelho) após 7, 14 e dias de crescimento. Pontos individuais representam um *pool* de três tumores/animais (n = 3). **(C)** *Gating* para demarcação de linfócitos B LAG-3+ com expressão diferencial de IgD em tumores 4T1 (superior) e E0771 (inferior) durante 7, 14 e 21 dias de crescimento. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

5.6. Caracterização morfológica e histopatológica do baço

Ao analisar o baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral observamos diferença significativa quanto à morfologia entre os modelos utilizados, sendo verificado quadro progressivo de esplenomegalia no modelo 4T1, a partir de 14 dias de desafio tumoral, acentuando-se em 21 dias (Figura 28A). Embora tenha-se observado alteração para o modelo E0771, estas foram mais sutis (Figura 28A). Corroborando com as

mudanças visuais, verificamos elevação significativa na área do órgão para o modelo 4T1 quando comparado aos animais do grupo controle, nos dias 14 e 21 após o desafio tumoral. Foi constatada elevação para o modelo E0771 somente no último período avaliado (Figura 28B). Comparando o baço dos animais do grupo tumor e grupo controle, verificamos que após 14 dias houve quase duplicação da área do baço para o modelo 4T1, sendo esta elevação ainda mais dramática (3x) após 21 dias (Figura 28C). De forma similar também observamos mudanças equivalentes quando ao peso do órgão para o modelo 4T1, pelo qual verificamos mudanças significativas para os períodos de 14 e 21 dias, não sendo observado mudança no modelo E0771 (Figura 28D).

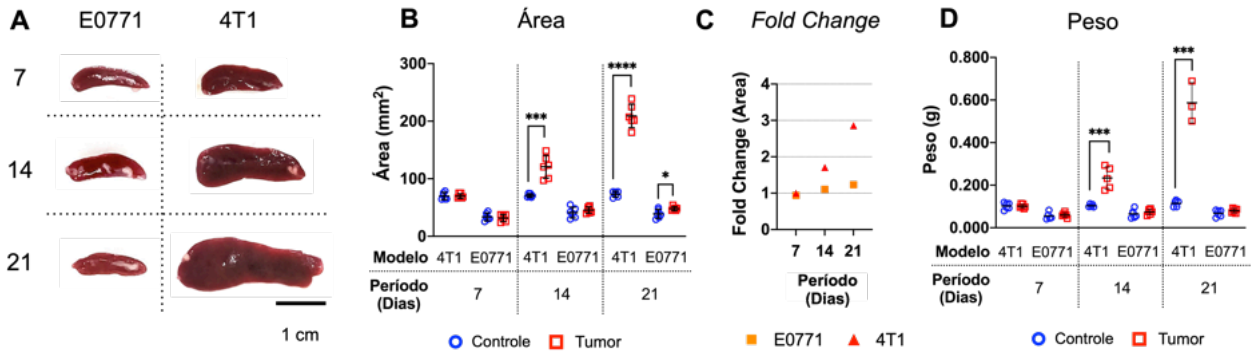


Figura 28. Avaliação morfológica e medidas do baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. (A) Imagens representativas do baço de animais desafiados com células tumorais E0771 (coluna direita) e 4T1 (coluna esquerda), após 7, 14 e 21 dias. **(B)** Área (mm ^{3}) do baço de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) para os modelos 4T1 e E0771 após 7, 14 e 21 dias. Média ± desvio padrão. **(C)** *Fold change* da área do baço entre animais do grupo controle e grupo tumor. Os pontos únicos representam a média de cada grupo, período e tumor correspondente (4T1, vermelho; E0771, laranja). **(D)** Peso (g) do baço de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) para os modelos 4T1 e E0771 após 7, 14 e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Avaliando as lâminas de baço dos animais do grupo tumor, observamos morfologia intacta do órgão para o modelo E0771 durante todo o período de desenvolvimento tumoral, pelos quais foi possível observar a integralidade e bordas bem delimitadas entre as polpas vermelha e branca (Figura 29A). Em oposição, constatamos que o desenvolvimento de tumores 4T1 acarretou em progressiva perda dos limites entre as duas polpas, sendo observado diminuição progressiva da polpa branca (Figura 29B).

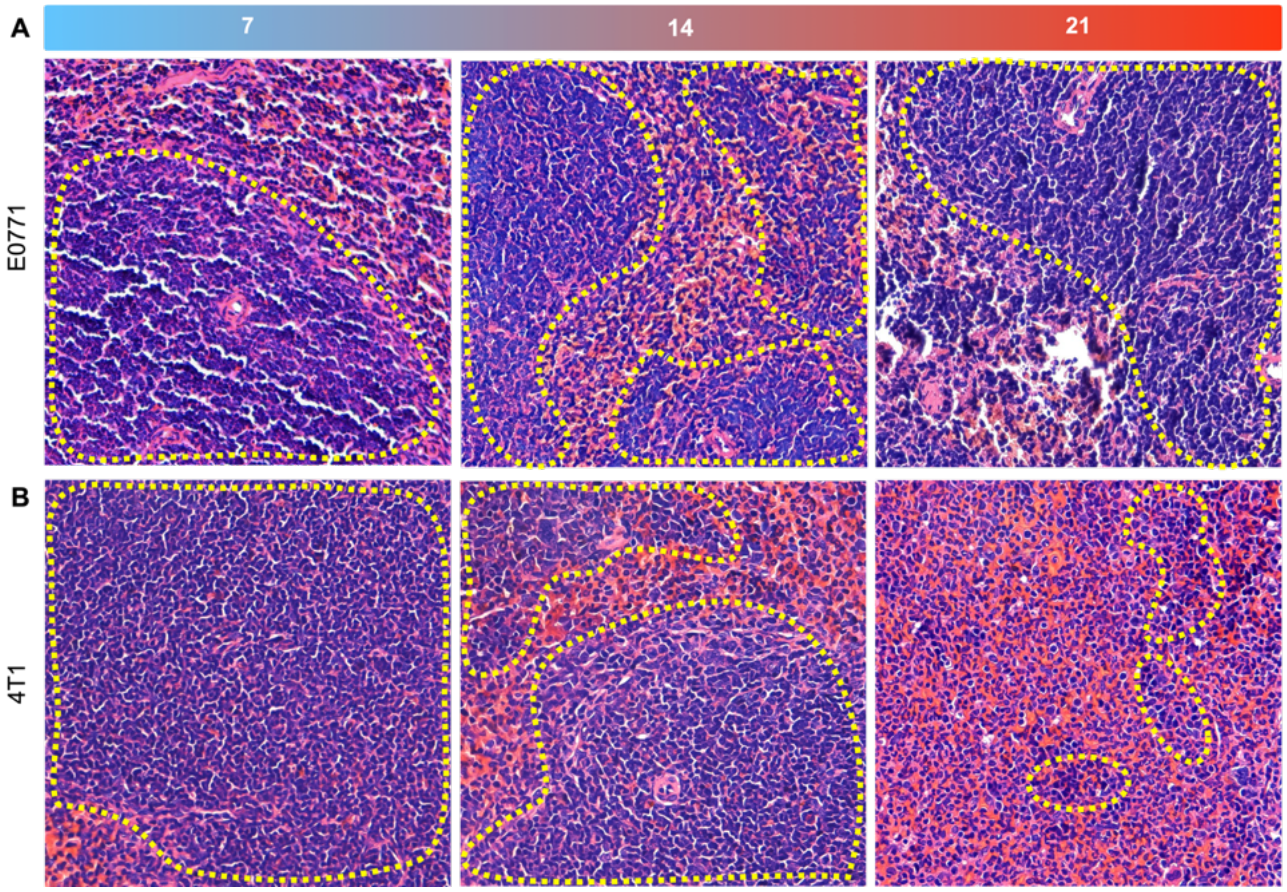


Figura 29. Avaliação histológica do baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. Imagens representativas do baço de animais de desafiados com tumores E0771 **(A)** e 4T1 **(B)** após 7, 14 e 21 dias. Lâmina com coloração H&E. Médio aumento (10x). Linhas pontilhadas delimitam a polpa branca do baço, área externa referente a polpa vermelha.

5.7. Avaliação da dinâmica celular no baço

Levando em considerações as alterações morfológicas e histopatológicas, em momento inicial verificamos as potenciais implicações quanto a dinâmica de células mielóides no órgão. Observamos pequena variação na frequência de células mielóides totais (CD11b+) entre os animais do grupo controle (1.97%) e grupo tumor (3.24%) para o modelo E0771 (Figura 30A). Em oposição, observamos drástica elevação da população celular nos animais desafiados com células tumorais 4T1 (controle 2.3% vs. tumor 51.7%) (Figura 30B).

Segmentando as populações em mielóides polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) a partir da expressão diferencial de Ly-6C e Ly-6G, observamos achados similares, não sendo verificado alterações significativas entre os animais do grupo controle e tumor no modelo E0771 para os períodos avaliados (Figura 30C-D). Em oposição, verificamos mudanças significativas na composição celular no baço dos animais desafiados com células tumorais 4T1, sendo constatado elevação progressiva de células

PMN (CD11b+ Ly-6G+ Ly-6C^{low-}) para todos os períodos, destacando-se no dia 21, onde este perfil celular contribuiu com quase metade (41%, média) de todos os leucócitos do órgão. Curiosamente, embora também tenhamos evidenciado elevação significativa em células MN (CD11b+ Ly-6G- Ly-6C+), o aumento não ocorreu de maneira imediata conforme observado para população PMN, sendo somente verificado diferença significativa nos períodos de 14 e 21 dias. Além disso, apesar da elevação, células MN corresponderam a parcela minoritária, aproximadamente 4% em ambos os períodos de 14 e 21 dias nos animais do grupo tumor para modelo 4T1 (Figura 30C-D).

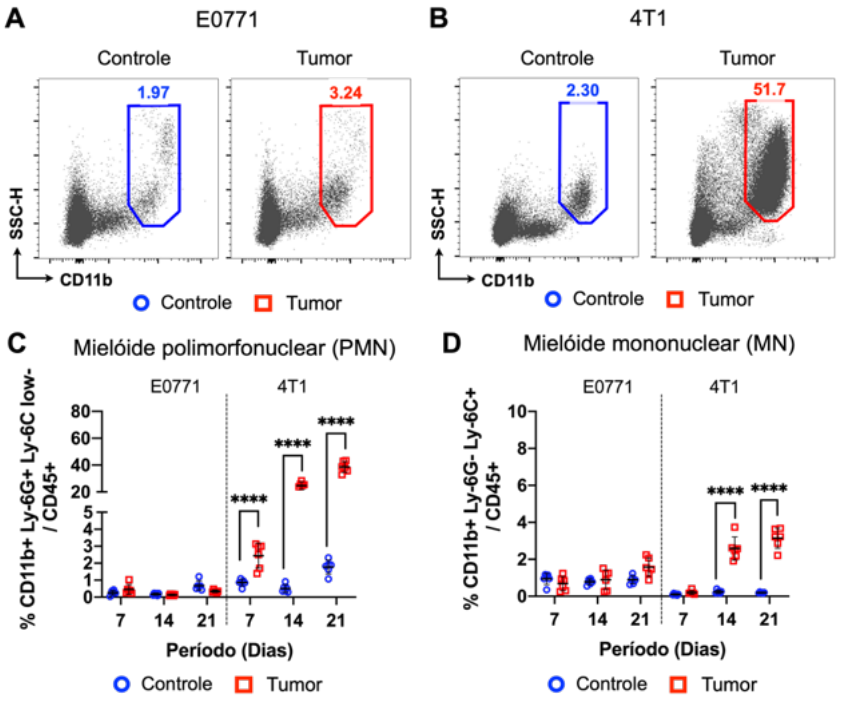


Figura 30. Frequência de populações mielóides no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. (A-B) Frequência de células mielóides totais no baço de animal controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (direita) e 4T1 (esquerda) após 21 dias. Células foram selecionadas (*gated)* baseado em elevada granulosidade (SSC-H) e expressão de CD11b+. **(C)** Frequência de células mielóides polimorfonucleares (PMN) no baço de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral por células 4T1 e E0771. **(D)** Frequência de células mielóides mononucleares (MN) no baço de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral por células 4T1 e E0771. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Avaliando células de origem linfoide, constatamos que não houve mudança significativa nenhum dos períodos avaliados para o modelo E0771, com ambos os animais do grupo controle e tumor apresentando frequência similar para linfócitos B (47-58%), TCD4 (12-20%), e TCD8 (6-15%). De maneira oposta, verificamos diminuição significativa entre os animais do grupo controle e tumor no modelo 4T1 nos períodos de 14 e 21 dias, de modo que a frequência de linfócitos B nos animais do grupo tumor corresponderam a

aproximadamente 40% e 20% de leucócitos totais no baço, respectivamente (Figura 31A). Padrão semelhante também foi observado dentro do compartimento de linfócitos T, sendo verificado para os períodos de 14 e 21 dias queda progressiva na frequência de linfócitos TCD4 (16%, 12%) e TCD8 (7%, 4%), respectivamente (Figura 31B-C). Apesar da queda observada, quando analisamos a contagem absoluta, constatamos que ambos os modelos apresentaram elevação significativa para linfócitos B, TCD4 e TCD8 em período tardio (21 dias), sendo esta elevação mais pronunciada nos animais inoculados com células E0771 (16x) do que células 4T1 (2x) (Figura 31D-F).

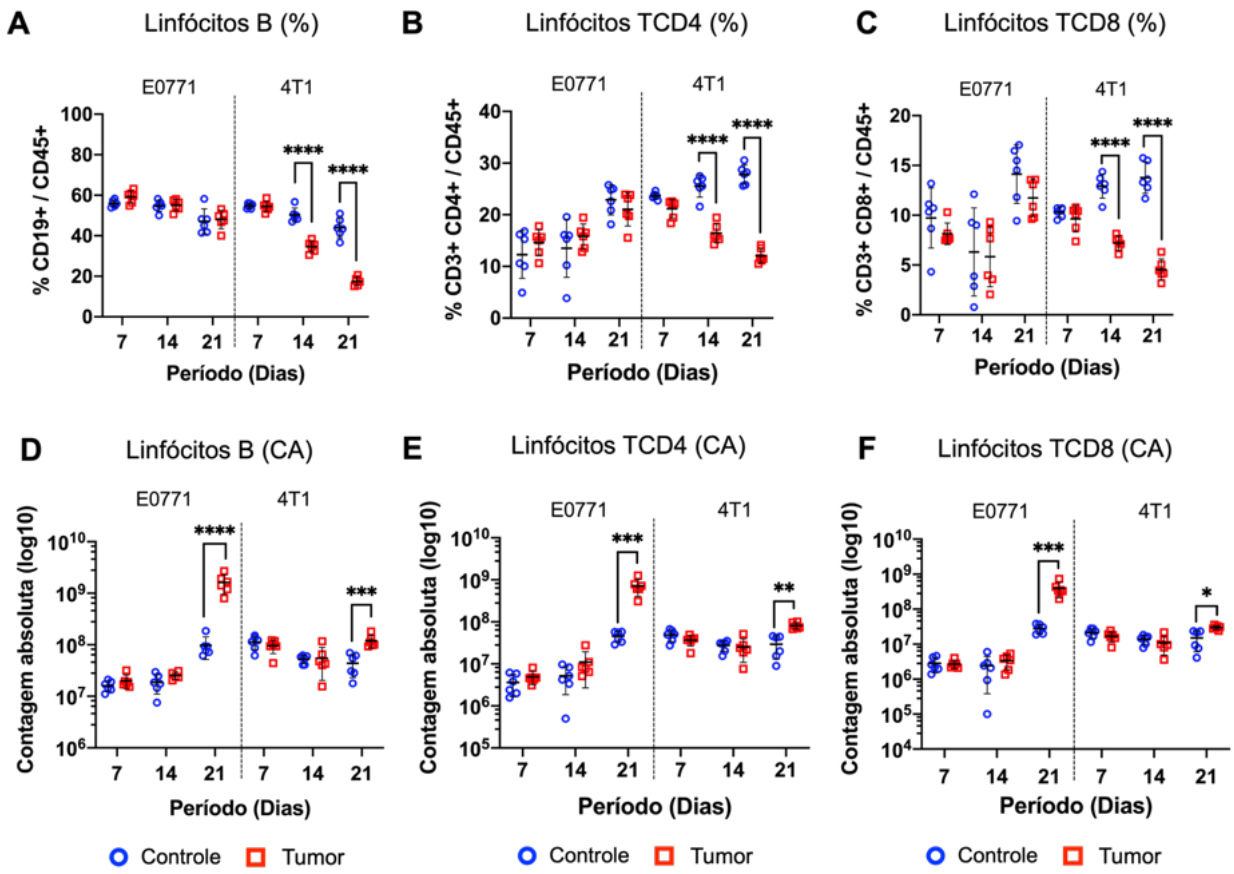


Figura 31. Frequência e contagem absoluta de linfócitos B e T no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. Frequência (%) de **(A)** células B totais, **(B)** linfócitos TCD4, e **(C)** linfócitos TCD8 no baço de animal controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Contagem absoluta (CA) de **(D)** células B totais, **(E)** linfócitos TCD4, e **(F)** linfócitos TCD8 no baço de animal controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Segmentando as populações de linfócitos B de acordo com a expressão de IgD, LAG-3, CD5, CD1d e CD138, verificamos que ambos os modelos apresentaram composição celular semelhante, com predomínio de linfócito B com expressão de IgD – estes subdivididos em populações com expressão elevada (IgD *high)* (70-85%) e

intermediária-baixa (IgD *Int-low*) (9-20%), seguidos por populações LAG-3+ (1-2%), CD5+ CD1d+ (0.3-1%) e CD138+ (0.05-0.2%). Ainda assim, variações quanto a composição celular no compartimento de células B ao longo do período de desenvolvimento tumoral foi observado em ambos os modelos (Figura 32A). Corroborando com os achados anteriores – em que foi demonstrado queda progressiva na frequência de linfócitos B totais, o desenvolvimento de tumores 4T1 foi marcado por queda na frequência de linfócito B IgD *high* no baço período de 21 dias entre animais do grupo controle (77%) e grupo tumor (60%). Interessantemente, queda para população também foi observada no modelo E0771, sendo a diminuição na frequência observada em todos os períodos após o desafio tumoral, ainda que de maneira significativa somente nos dias 7 (controle 83% vs. tumor 75%) e 21 dias (controle 82% vs. tumor 73%). Apesar da queda na frequência, avaliando mudanças na contagem absoluta, somente constatamos mudança em modelo 4T1, sendo verificado elevação de células B IgD *high* para o último período (21 dias), aumento de aproximadamente 2.2x (Figura 32B).

A queda na população IgD *high* foi acompanhada por alteração na frequência de células B IgD *int-low*, sendo observado elevação significativa no modelo E0771 em todos os períodos avaliados, com baço dos animais inoculados com células tumorais apresentando frequência média entre 15-19%, ao passo que animais controle apresentaram frequência média entre 9-15%. Apesar das mudanças neste modelo tumoral, nenhuma alteração foi observada no modelo 4T1, cujas frequências de ambos os grupos experimentais variaram de forma similar (7-18%). Em termos absolutos, em semelhança às alterações na frequência, também observamos elevação na contagem de linfócitos B IgD *int-low* no modelo E0771, ainda que diferença significativa somente tenha sido verificada no período de 7 e 21 dias, com elevações de 1.8x e 2.3x, respectivamente. Apesar da ausência de alteração na frequência da população no modelo 4T1, verificamos elevação significativa de 2.6x na população em período tardio (21 dias) de crescimento tumoral (Figura 32C). De maneira interessante, embora a elevação de células IgD *int-low* leve a crer em processo de diferenciação celular no órgão, não observamos alterações significativas na frequência de plasmócitos (CD138+) entre os animais de grupo controle e tumor em nenhum dos modelos e períodos avaliados, de modo que esta população celular compreendeu menos de 0.2% do total de células B. Ainda assim, verificamos elevação significativa na contagem absoluta para esta população em período tardio (21 dias) no modelo 4T1, sendo observado elevação de 3x entre o grupo controle e grupo tumor (Figura 32D).

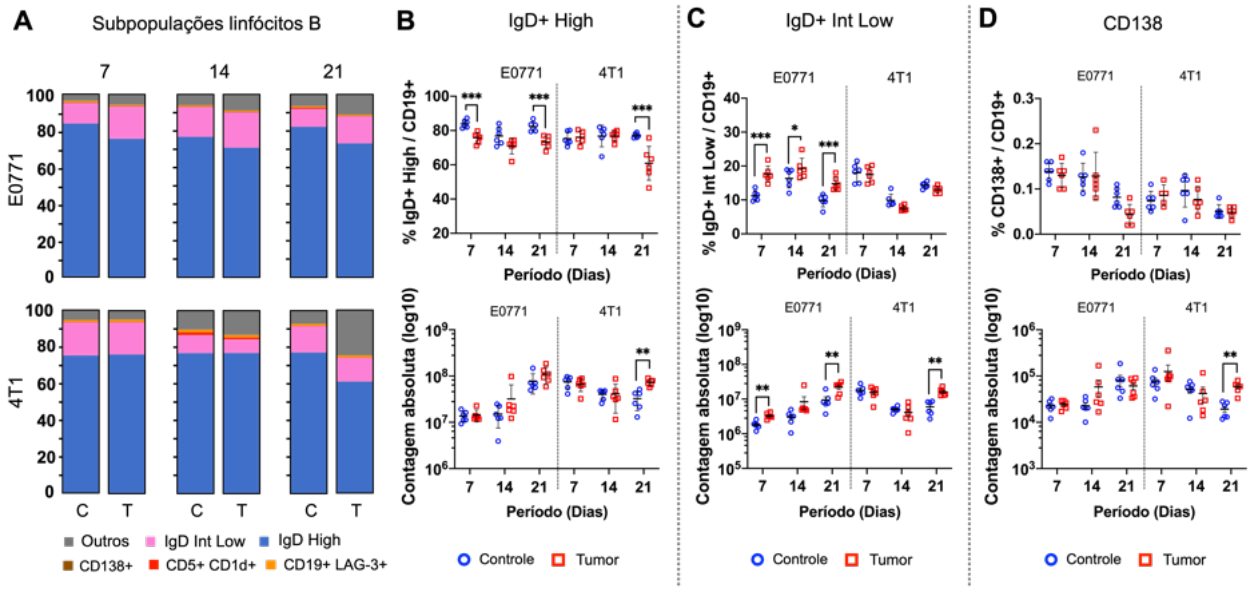


Figura 32. Avaliação de subpopulações de linfócitos B no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. (A) Frequência (%) em relação ao total de linfócitos B (CD19+) de linfócitos B IgD *high* (rosa), IgD *int-low* (azul), plasmócitos (CD138+), CD5+ CD1d+ (vermelho), e LAG-3+ (laranja)em amostras de baço de animais do grupo controle (C) e tumor (T) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral com células E0771 e 4T1. Frequência (%)(superior) e contagem absoluta (inferior) de linfócitos B IgD *high* **(B)**, IgD *int-low* **(C)**, e plasmócitos **(D)** no baço de animais controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (direita) e 4T1 (esquerda) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Analisando a expressão de CD5+ CD1d+ entre linfócitos B totais no baço dos animais do grupo controle e tumor, constatamos que a frequência destas células foi baixa para ambos os modelos 4T1 e E0771 e períodos avaliados, representando menos de 2% do total de células B. Curiosamente, ainda que nenhuma alteração tenha sido observada para o modelo 4T1, observamos queda para este perfil celular no período de 21 dias no modelo E0771. De forma interessante, constatamos elevação significativa no número absoluto de células B CD5+ CD1d+ em 21 dias no modelo 4T1, sendo observado aumento de 2.6x entre o grupo controle e grupo tumor (Figura 33A). De maneira similar, verificamos que linfócitos B LAG-3+ também compreenderam percentual pequeno em razão ao total de linfócitos B no baço, representando menos de 2% em ambas condições e modelos utilizados. Novamente, de maneira curiosa, apontamos para diminuição do fenótipo supracitado no modelo E0771 ainda em período inicial de desenvolvimento tumoral (7 dias), com a população B LAG-3 compreendendo 0.7% no baço dos animais do grupo tumor. Em semelhança a linfócitos B CD5+ CD1d+, também constatamos aumento de 2.8x na contagem absoluta de LAG-3+ no modelo 4T1 em momento tardio da doença (21 dias), não sendo observado alterações significativas para o modelo E0771 (Figura 33B).

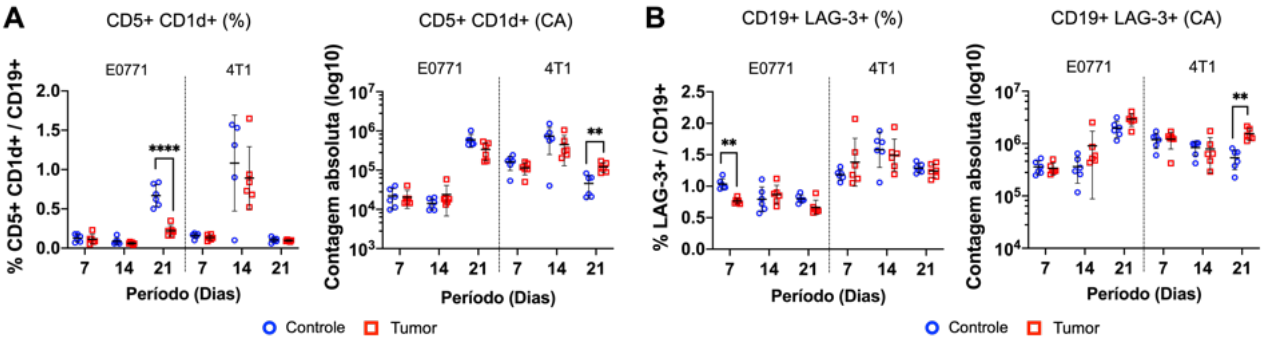


Figura 33. Avaliação de perfis de linfócitos B regulatórios no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. Frequência (%) e contagem absoluta de linfócitos B CD5+ CD1d+ **(A)**, e LAG-3 **(B)** no baço de animais controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

A fim de melhor caracterizar as populações de linfócitos B LAG-3+, analisamos a expressão diferencial dos marcadores utilizados no painel (IgD, CD5, CD1d, CD138). De forma curiosa, observamos que parcela majoritária (>90%) de células B LAG-3+ possuíam expressão de IgD em ambas as condições experimentais (controle, tumor) e também entre os modelos murinos utilizados, não sendo observado expressão de demais marcadores utilizados (Figura 34A). Embora não tenhamos apontado diferença na frequência de linfócitos B LAG-3+ IgD+ para o modelo E0771 entre os animais do grupo controle e tumor nos períodos avaliados, constamos progressiva diminuição deste fenótipo no modelo 4T1, sendo verificado uma queda significativa para 21 dias após o desafio tumoral (Figura 34A). Apesar disso, avaliando a contagem absoluta verificamos elevação de 2.8x deste perfil celular em período tardio (21 dias) para o modelo 4T1, não sendo observado mudanças significativas durante o período de desenvolvimento de tumores E0771 (Figura 34B).

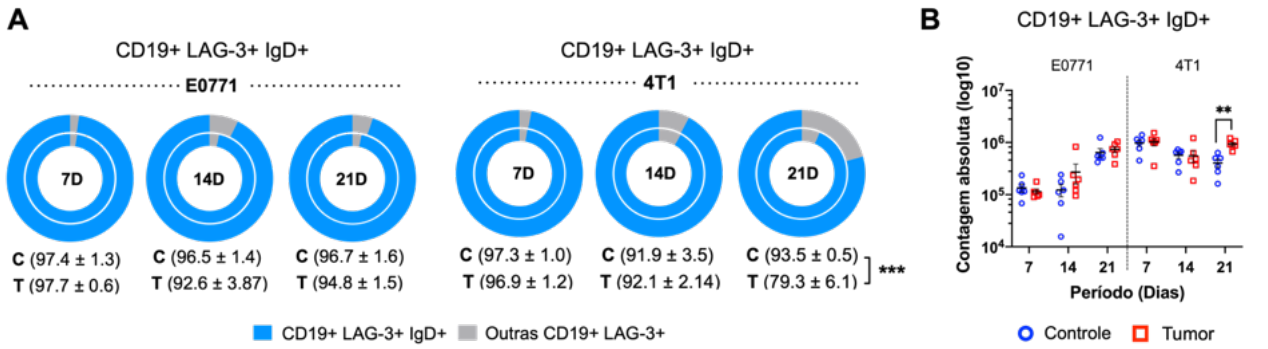


Figura 34. Expressão de IgD em linfócitos B no baço de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. (A) Frequência (%) de linfócitos B LAG-3+ IgD+ em relação a linfócitos B LAG-3+ no baço de animais controle (círculo interno) e tumor (círculo externo) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. **(B)** Contagem absoluta de linfócitos B LAG-3+ IgD+ no baço de animais controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Curiosamente, embora populações IgD+ sejam o principal fenótipo observado dentro do compartimento de células B LAG-3+, também observamos outras populações com baixa e não expressão de IgD, em ambos os modelos e períodos utilizados. Ainda assim, somente o modelo tumoral 4T1 acarretou em aumento destas populações celulares em período de 21 dias após o desafio tumoral (Figura 35A), não sendo observados alterações relevantes no modelo E0771 (Figura 35B).

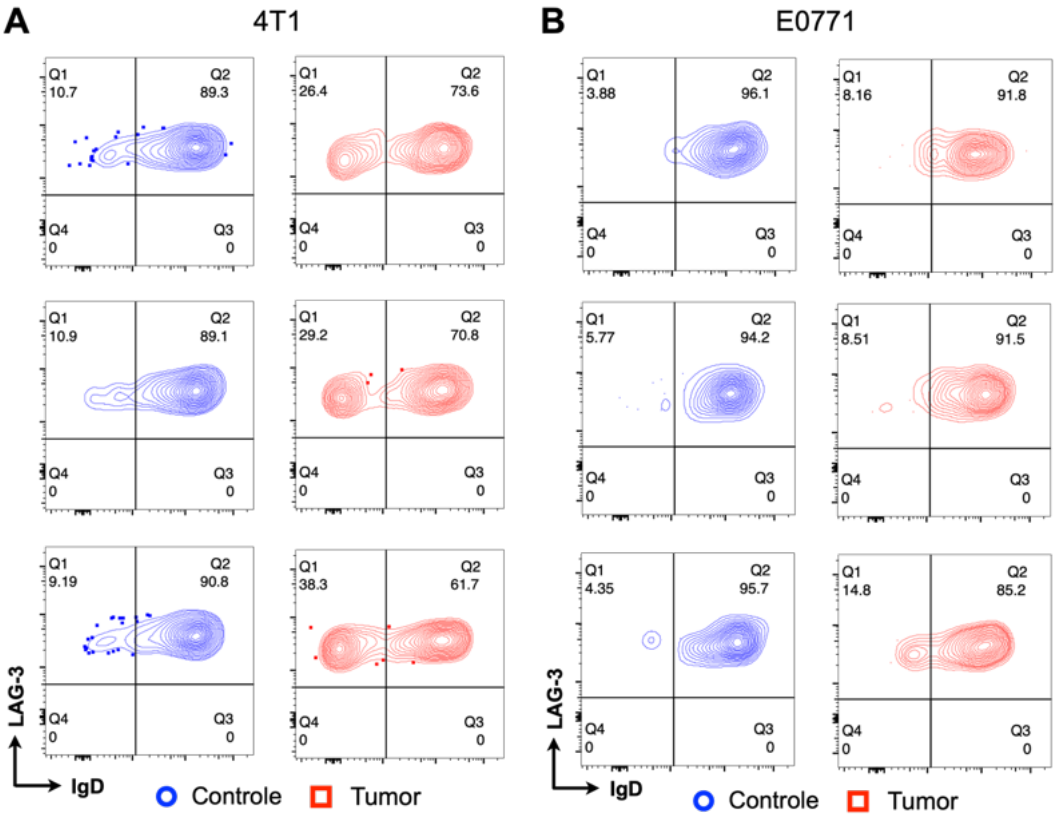


Figura 35. Expressão de IgD em linfócitos B LAG-3+ no baço. *Contour plot* de Linfócitos B LAG-3+ selecionados (*gated)* quanto à expressão de LAG-3 e IgD em animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) em tumores 4T1 **(A)** e E0771 **(B)** após 21 dias de desafio tumoral. Quadrantes: Q1 (LAG-3+ IgDlow-), Q2 (LAG-3+ IgD+), Q3 (LAG-3- IgD+), Q4 (LAG-3- IgDlow-).

5.8. Caracterização morfológica e histopatológica do linfonodo drenante

Em oposição às alterações vistas no baço, ambos os modelos tumorais acarretaram em alterações macroscópicas no linfonodo drenante dos animais, sendo observado progressivo aumento do órgão ao longo dos dias de desenvolvimento tumoral, ainda que estas alterações tenham sido mais acentuadas para o modelo 4T1 - em destaque no período de 21 dias (Figura 36A). Quantificando-se a área do tDLNs, verificamos elevação significativa ainda em período precoce após o desafio tumoral (7 dias), de maneira que os animais do grupo tumor apresentaram órgão 2.5x maior que dos animais do grupo controle

(5.8 mm^2 vs 2.3 mm^2, respectivamente), aumento este que foi relativamente mantido nos demais períodos avaliados. Curiosamente, embora também tenhamos verificado elevação na área de tDLNs em modelo murino E0771, o aumento do órgão somente foi observado de maneira significativa a partir de 14 dias. Além disso, em semelhança ao modelo 4T1, os animais do grupo tumor apresentaram órgão 1.9x maior que dos animais do grupo controle para o período previamente mencionado (4.3 mm^2 vs 2.2 mm^2, respectivamente) (Figura 36B-C). Corroborando com estes dados, também constatamos elevações significativas para o peso do tDLN para todos os períodos avaliados no modelo 4T1, e nos períodos de 7 e 14 dias para o modelo E0771 (Figura 36D).

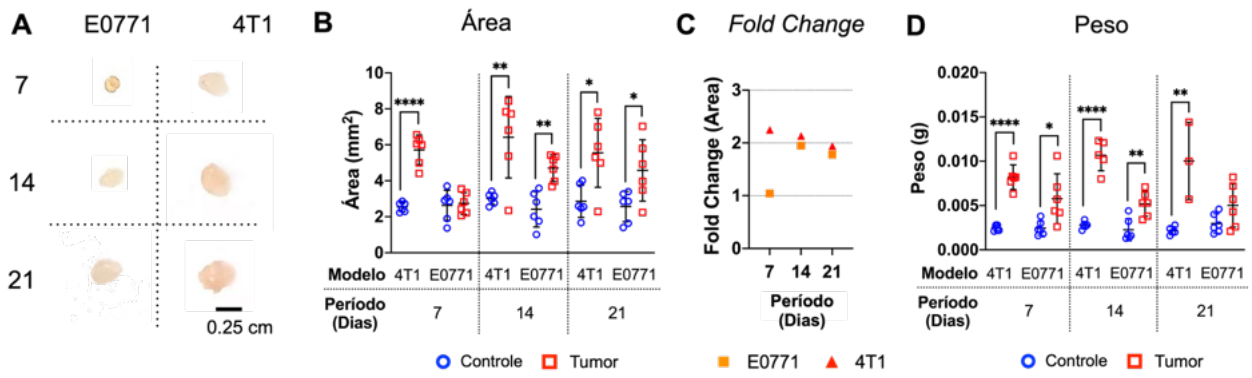


Figura 36. Avaliação morfológica e medidas do linfonodo drenante (tDLN) de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. (A) Imagens representativas do tDLN de animais desafiados com células tumorais E0771 (coluna direita) e 4T1 (coluna esquerda), após 7, 14 e 21 dias. **(B)** Área (mm^3) do tDLN de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) para os modelos 4T1 e E0771 após 7, 14 e 21 dias. Média ± desvio padrão. **(C)** *Fold change* da área do tDLN entre animais do grupo controle e grupo tumor. Os pontos únicos representam a média de cada grupo, período e tumor correspondente (4T1, vermelho; E0771, laranja). **(D)** Peso (g) do tDLN de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) para os modelos 4T1 e E0771 após 7, 14 e 21 dias. Média ± desvio padrão. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

Em consideração as alterações macroscópicas e histopatológicas no baço dos animais desafiados por células 4T1, também realizamos a análise histopatológica das lâminas de tDLN. Interessantemente, e em oposição aos achados do baço, não constatamos nenhuma alteração significativa quanto à morfologia no parênquima do órgão dos animais desafiados com células 4T1, mesmo após 21 dias de desenvolvimento tumoral (Figura 37A). Além disso, também não observamos mudanças nas amostras do modelo E0771 nos períodos avaliados. Em ambos tDLNs dos modelos utilizados foram constatados numerosos linfócitos, sugerindo intensa proliferação (Figura 37A-B).

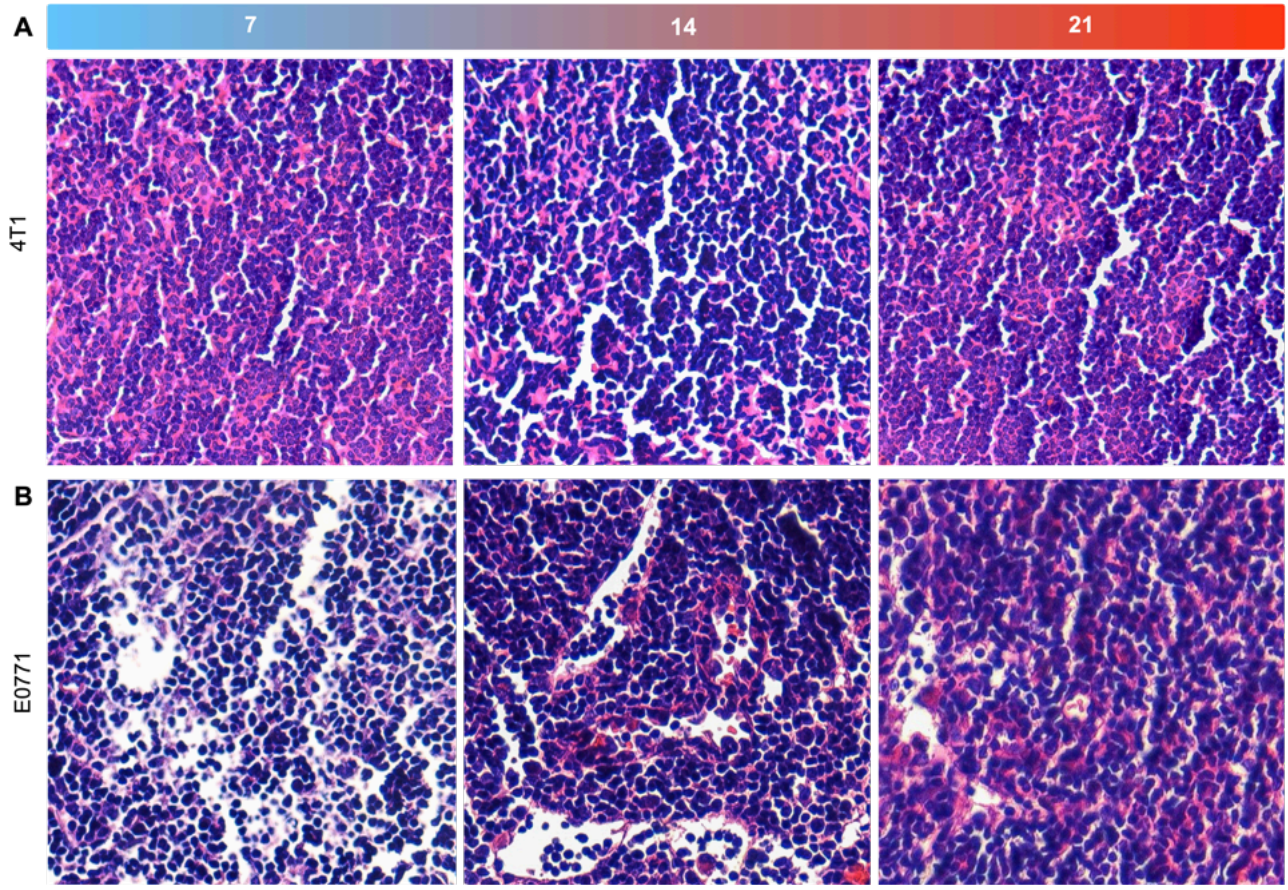


Figura 37. Avaliação histológica do linfonodo drenante de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. Imagens representativas do baço de animais de desafiados com tumores 4T1 **(A)** E0771 **(B)** após 7, 14 e 21 dias. Lâmina com coloração H&E. Médio aumento (10x).

5.9. Avaliação da dinâmica celular no linfonodo drenante

Levando em consideração as alterações morfológicas e os achados para o baço, investigamos o impacto do desenvolvimento tumoral na cinética de diferentes perfis celulares, sendo inicialmente analisado os perfis mielóides. Interessantemente, somente verificamos elevação em células mielóides (CD11b+) em período tardio para o modelo 4T1, não sendo verificado alteração para o modelo E0771, estas correspondendo a menos que 0.5% e 2% no tDLN dos respectivos modelos murinos (Figura 38A). Além disso, em oposição aos achados no baço, a elevação deste fenótipo celular foi menos intensa, contribuindo com <1.5% do total de leucócitos no órgão (Figura 38B). Ainda que tenhamos verificado aumento significativo em células mielóides PMN em modelo 4T1 em período tardio (21 dias), a frequência destas células no tDLN foi baixa (<1%), não sendo observadas alterações no modelo E0771 em nenhum dos períodos avaliados. Em adição a mudanças observadas em células mielóides PMN, também verificamos elevação de células mielóides

MN em ambos os modelos, no dia 21 para o modelo E0771, e 14 e 21 dias no modelo 4T1. Novamente, há que ressaltar que embora significativas, as elevações correspondem à baixa frequência celular, menos de 0,5% em ambos os modelos e períodos avaliados (Figura 38C-D).

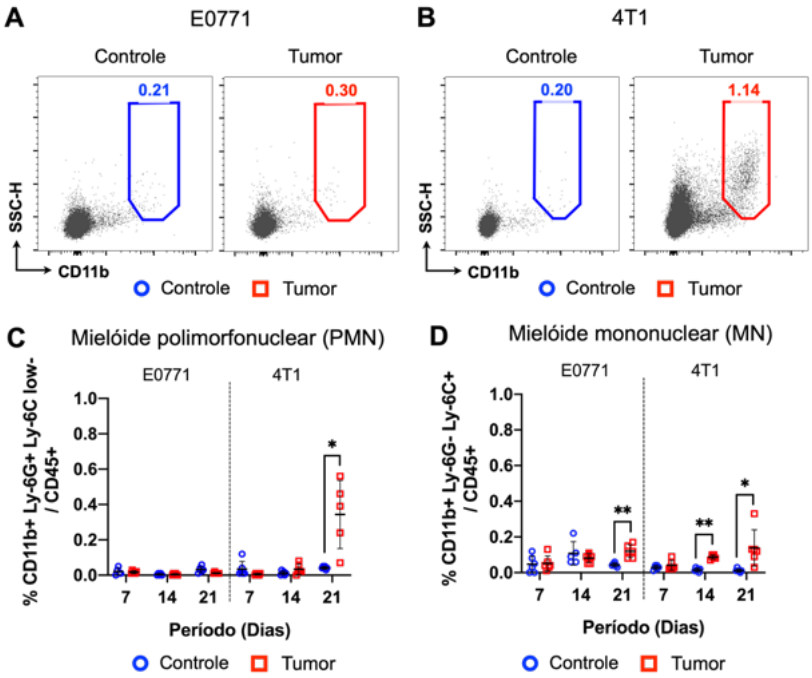


Figura 38. Frequência de populações mielóides no linfonodo drenante de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. **(A-B)** Frequência de células mielóides totais no tDLN de animal controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 21 dias. Células foram selecionadas (*gated)* baseado em elevada granulosidade (SSC-H) e expressão de CD11b+. **(C)** Frequência de células mielóides polimorfonucleares (PMN) no tDLN de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral por células 4T1 e E0771. **(D)** Frequência de células mielóides mononucleares (MN) no tDLN de animais do grupo controle (azul) e tumor (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral por células 4T1 e E0771. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Avaliando o compartimento de células linfoides, observamos intensa elevação ainda em períodos iniciais (7 dias) de desenvolvimento tumoral em ambos os modelos utilizados, sendo constatado elevação significativa na frequência de linfócitos B total entre os animais do grupo controle (27%) e animais do grupo tumor (45%) no modelo murino E0771, e também em modelo 4T1 (grupo controle 21% vs grupo tumor 48%). Embora a elevação tenha sido mantida nos tDLNs de animais desafiados por células E0771, somente foi observado aumento significativo no período de 21 dias. Em oposição, o aumento inicial observado foi mantido ao longo do processo de carcinogênese para tumores 4T1, sendo observado frequência 2.8x maior de células B no tDLN de animais do grupo tumor em relação aos animais do grupo controle para os períodos de 14 e 21 dias (Figura 39A). Similar aos achados de baço, observamos queda nas frequências de linfócitos TCD4 (grupo

controle 58% vs grupo tumor 35%) e TCD8 (grupo controle 23% vs grupo tumor 16%) nos animais desafiados por células 4T1 em todos os períodos utilizados. De forma distinta, para o modelo E0771 somente foi verificado queda significativa na frequência para a população TCD4 em período de 21 dias (grupo controle 35% vs grupo tumor 28%) (Figura 39B-C). Igualmente relevante, verificamos elevação na contagem absoluta, sendo esta significativa para ambos os modelos e em todos os períodos avaliados, ainda assim as diferenças foram mais pronunciadas para o modelo 4T1, em que foi verificado aumento de 16x na contagem de linfócitos B no período de 7 dias, ao passo que elevação de 5x foi observado para o mesmo período para o modelo E0771 (Figura 39D). Embora em menor grau, também observamos elevação numérica de linfócitos TCD4 e TCD8 em ambos os modelos. Apesar disso, mudanças significativas somente foram observadas nos períodos de 7 e 14 dias para o modelo E0771, sendo verificado em média 2 e 6x mais células nos animais do grupo tumor em relação ao grupo controle para linfócitos TCD4, e 3 e 8x para linfócitos TCD8. Para o modelo 4T1, observamos uma elevação de 4 e 6x para linfócitos TCD4, e 5 e 9x para linfócitos TCD8 nos períodos de 7 e 21 dias de desafio tumoral (Figura 39E-F).

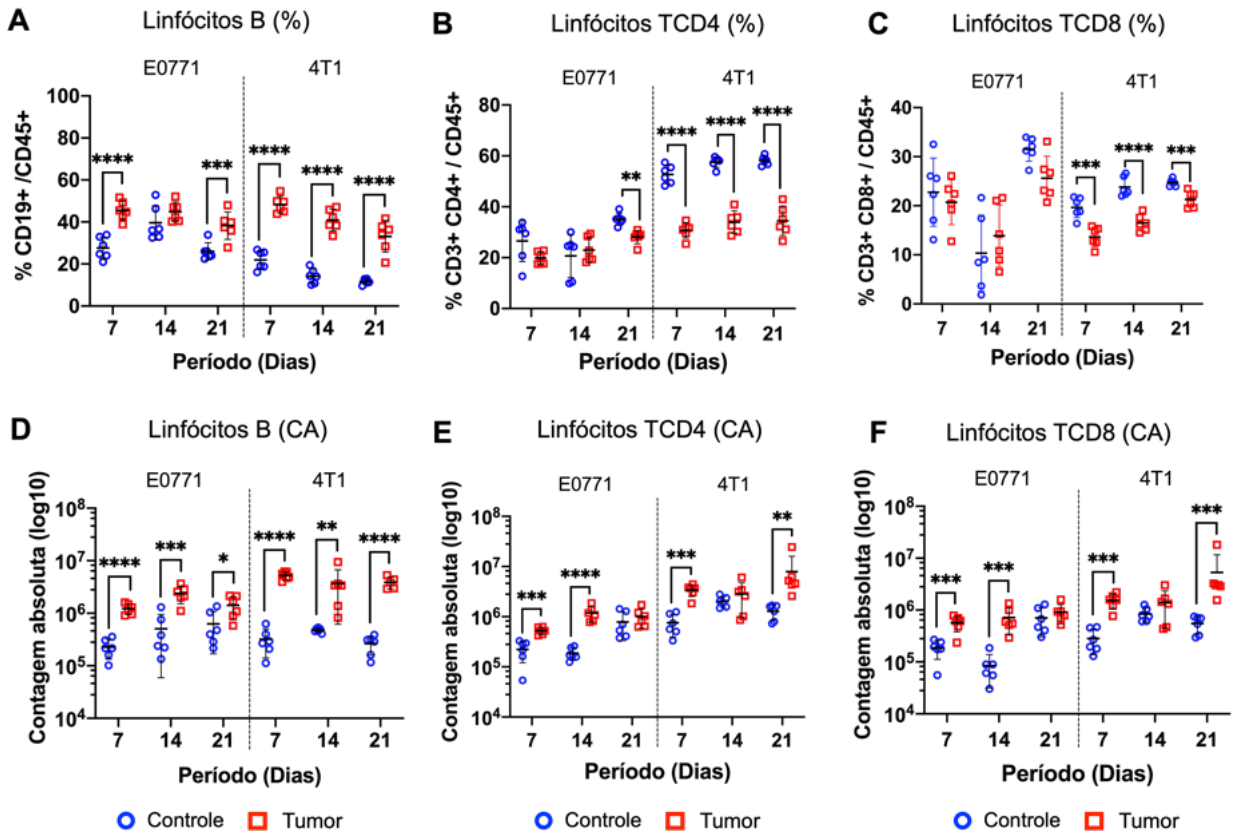


Figura 39. Frequência e contagem absoluta de linfócitos B no linfonodo drenante de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. (A) Frequência (%) de células B totais no tDLN de animal controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (direita) e 4T1 (esquerda) após 7, 14, e 21 dias. (**B)** Contagem absoluta (CA) de células B totais no tDLN de animal controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Avaliando as subpopulações de células B no tDLN, ambos animais do grupo controle e tumor dos modelos 4T1 e E0771 apresentaram composição celular similar ao baço, pelos quais foi observado predomínio de linfócitos B IgD, estes majoritariamente com expressão elevada de IgD (*high*) (85%), seguidos por células B com expressão intermediária e baixa (*int-low*)(5%). Populações LAG-3+, CD138+, e CD5+ CD1d+ também foram observadas, ainda que compreendendo parcela pequena do total de linfócitos B do órgão, correspondendo em média a 1,5%, 0,2% e 0,05%, respectivamente (Figura 40A). Apesar de similaridades quanto a composição geral no compartimento de células B, diferenças foram vistas entre os modelos. Ao avaliar a frequência de linfócitos B IgD *high,* constatamos queda na frequência da população em ambos os modelos tumorais nos períodos avaliados, ainda assim, esta diminuição somente foi significativa para o modelo 4T1 nos dias 14 e 21, sendo observado um decréscimo de 7 e 9% entre os animais do grupo controle e tumor, respectivamente (Figura 40A). Interessantemente, ambos os modelos apresentaram elevação significativa na contagem absoluta da população, com exceção ao período de 21 dias no modelo E0771. Levando em consideração todos os períodos avaliados, constatamos elevação média de 4 e 19x na contagem absoluta de células IgD *high* nos modelos E0771 e 4T1, respectivamente (Figura 40B).

Interessantemente, embora a queda das populações IgD *int-low* tenha sido verificada em ambos os modelos e períodos utilizados, somente constatamos mudança significativa na frequência da população nos dias 14 e 21 no modelo 4T1, em que observamos queda de cerca de 5% comparando os animais do grupo tumor com animais do grupo controle. Ainda assim, verificando-se as diferenças na contagem absoluta, ambos os modelos apresentaram elevação significativa em todos os períodos, exceto pelo dia 21 no modelo E0771. De maneira semelhante as células IgD *high*, tumores 4T1 acarretaram em elevação mais pronunciada na contagem de células IgD *int-low,* sendo observado elevação média de 32x na contagem absoluta, ao passo que aumento de 6x foi constatado no modelo E0771 (Figura 40C).

Curiosamente, e corroborando com os dados observados no baço, não constatamos mudanças significativas na frequência de plasmócitos (CD138+) em ambos os modelos e períodos utilizados, de maneira que estas células compreenderam <0,5% do total de células B. Apesar disso, e em semelhança às populações supracitadas, constatamos aumento na contagem absoluta de plasmócitos em ambos os modelos, ainda que em períodos distintos (E0771: 7, 14 dias; 4T1: 7, 21 dias). Ainda em respeito ao aumento observado, foi verificado

elevação média de 4 e 8x na contagem de plasmócitos nos modelos E0771 e 4T1, respectivamente (Figura 40D).

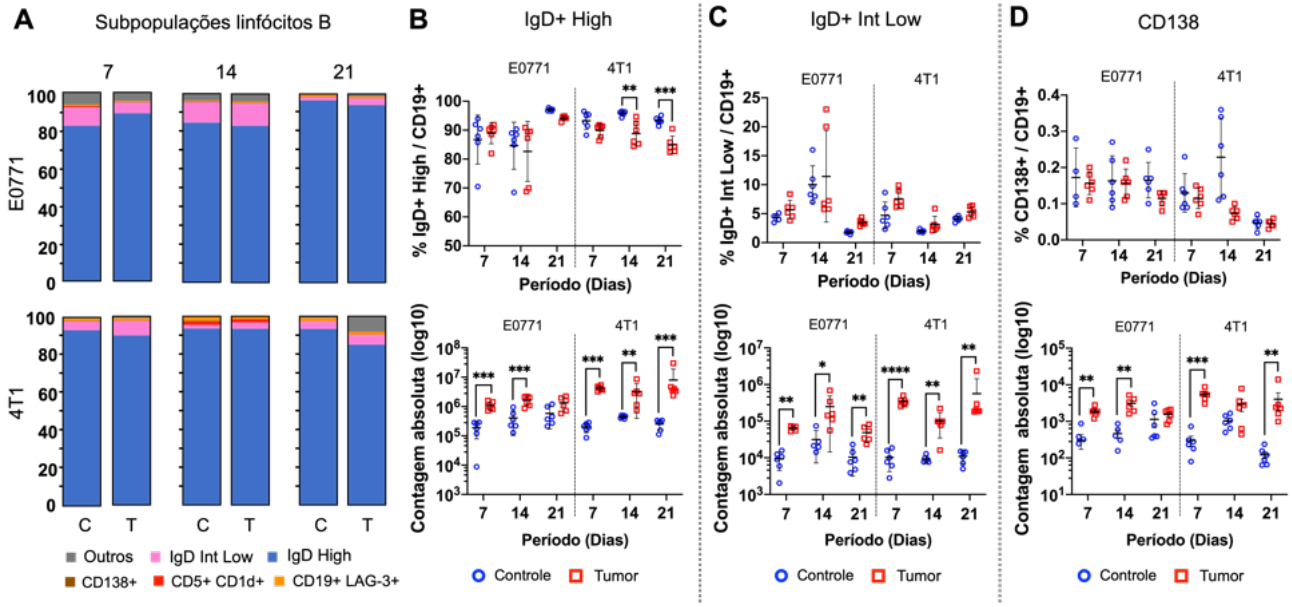


Figura 40. Avaliação de subpopulações de linfócitos B no tDLN de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. **(A)** Frequência (%) em relação ao total de linfócitos B (CD19+) de linfócitos B IgD *high* (rosa), IgD *int-low* (azul), plasmócitos (CD138+), CD5+ CD1d+ (vermelho), e LAG-3+ (laranja) em amostras de tDLN de animais do grupo controle (C) e tumor (T) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral com células E0771 e 4T1. Frequência (%) (superior) e contagem absoluta (inferior) de linfócitos B IgD *high* **(B)**, IgD *int-low* **(C)**, e plasmócitos **(D)** no tDLN de animais controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Curiosamente, avaliando perfis regulatórios e em oposição ao baço, embora tenhamos detectado eventos correspondentes a células B CD5+ CD1d+ em ambos os modelos, a frequência da população foi muita baixa em todos os períodos, abaixo de 0.5%. Além disso, não foi verificado diferença significativa em nenhum dos períodos utilizados (Figura 41A). De forma oposta, observamos a presença de linfócitos B LAG-3+ nos modelos 4T1 e E0771, de maneira que este fenótipo compreendeu entre 1 a 3% do total de linfócito B no órgão. Apesar disso, o desenvolvimento tumoral não acarretou em elevação deste perfil celular em modelo E0771 nos períodos avaliados. De forma inesperada, constatamos elevação significativa na frequência de linfócitos B LAG-3+ em animais do grupo controle para o modelo 4T1 (Figura 41B). Similar às populações anteriormente citadas, também observamos elevação significativa na contagem absoluta de linfócitos B LAG-3+ em ambos os modelos, excetuando-se o período de 21 dias no modelo E0771, sendo constatado um aumento médio de 3 e 17x nos modelos E0771 e 4T1, respectivamente (Figura 41C).

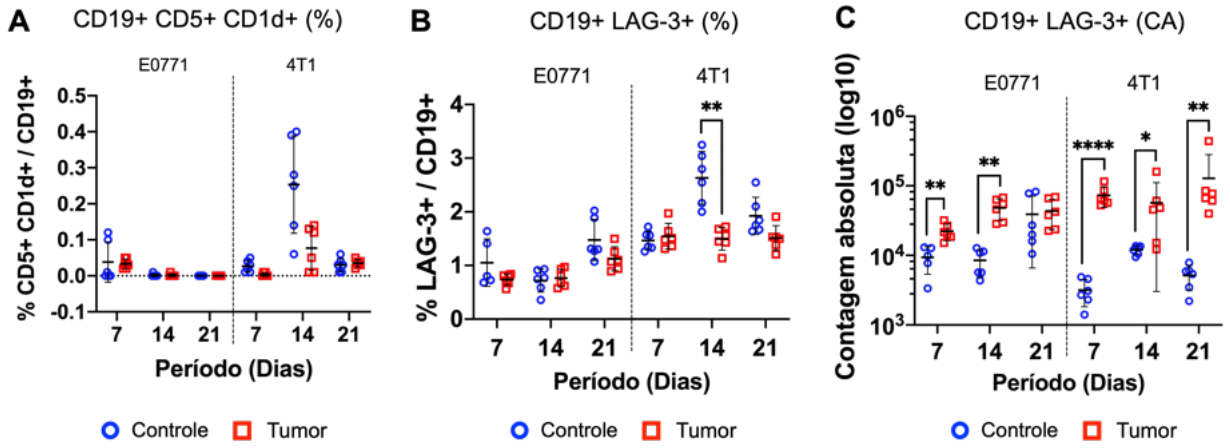


Figura 41. Avaliação de perfis de B regulatórios no tDLN de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. Frequência (%) de linfócitos B CD5+ CD1d+ **(A),** B LAG-3+ **(B)** e contagem absoluta **(C)** (inferior) de linfócitos B LAG-3+ no tDLN de animais controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Avaliando os fenótipos presentes no compartimento de linfócitos B LAG-3+ observamos que parcela majoritária das células apresentavam expressão elevada de IgD, em ambos os períodos e modelos avaliados, contabilizando por mais de 90% das células B LAG-3+ (Figura 42). Em oposição ao baço, não verificamos diferença significativa comparando a população entre os animais do grupo controle e tumor no modelo 4T1, e tampouco no modelo E0771, de modo em ambas as condições e períodos avaliados estas células IgD+ corresponderam por mais de 95% do total do fenótipo CD19+ LAG-3+ (Figura 42A). Apesar disso, novamente observamos o mesmo padrão de elevação na contagem absoluta que as populações anteriores, sendo constatado elevação em todos os períodos, excetuando-se o dia 21 no modelo E0771. Comparando a elevação média entre os dois modelos, foi observado elevação de 3 e 18x na contagem de linfócitos B LAG-3+ nos modelos E0771 e 4T1, respectivamente (Figura 42B).

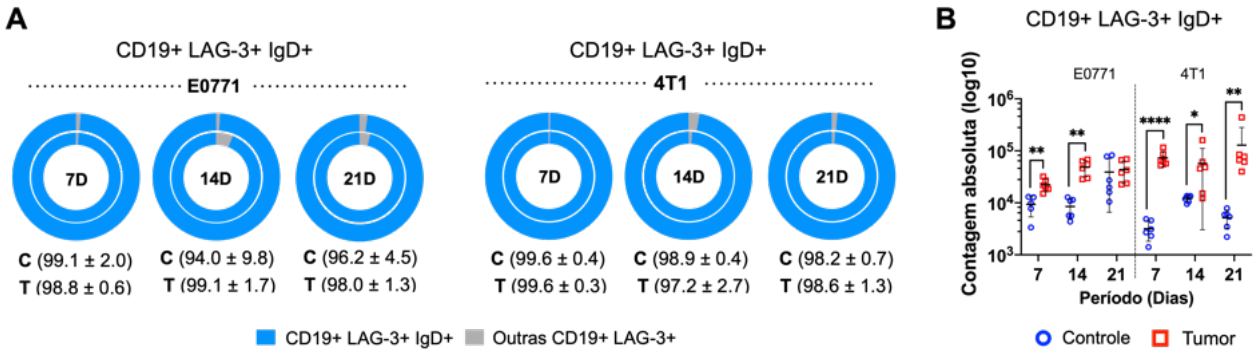


Figura 42. Expressão de IgD em linfócitos B no tDLN de camundongos ao longo do desenvolvimento tumoral. (A) Frequência (%) de linfócitos B LAG-3+ IgD+ em relação a linfócitos B LAG-3+ no tDLN de animais controle (círculo interno) e tumor (círculo externo) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. (B) Contagem absoluta de linfócitos B LAG-3+ IgD+ no tDLN de animais controle (azul) e tumor (vermelho) para tumores E0771 (esquerda) e 4T1 (direita) após 7, 14, e 21 dias. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Curiosamente, em oposição aos achados do baço, constatamos que o desenvolvimento de tumores 4T1 não acarretou em elevação na frequência de outros perfis de linfócitos B LAG-3+, permanecendo estas células com elevada expressão de IgD. Alterações também não foram verificadas para o modelo E0771 (Figura 43A-B).

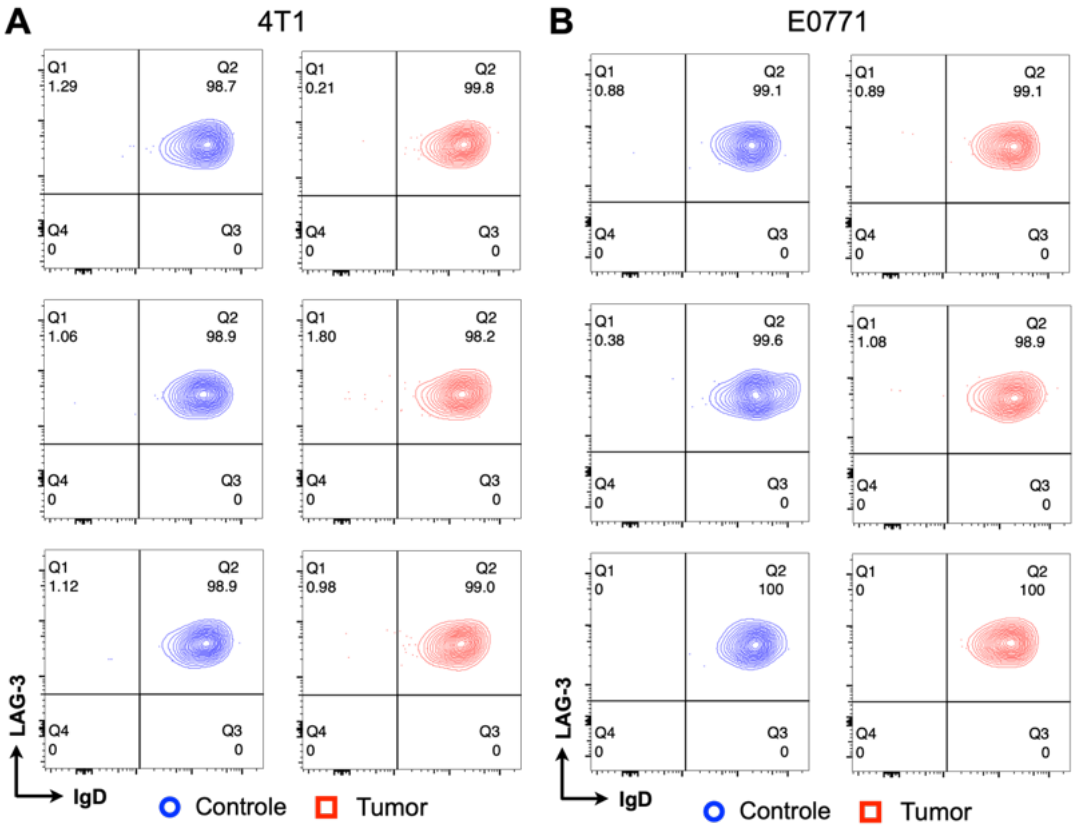


Figura 43. Expressão de IgD em linfócitos B LAG-3+ no tDLN. *Contour plot* de Linfócitos B LAG-3+ selecionados (*gated)* quanto a expressão de CD19 e IgD em animais do grupo control (azul) e tumor (vermelho) em tumores 4T1 **(A)** e E0771 **(B)** após 21 dias de desafio tumoral. Quadrantes: Q1 (LAG-3+ IgDlow-), Q2 (LAG-3+ IgD+), Q3 (LAG-3- IgD+), Q4 (LAG-3- IgDlow-).

Parcela dos dados previamente descritos e expostos foram combinados em forma de artigo e submetidos para publicação no periódico '*Scientific Reports'* em 26 de setembro de 2023. O manuscrito submetido se encontra no anexo do presente trabalho.

5.10. Avaliação de células de centro germinal no TME

Em consideração aos diferentes fenótipos de linfócitos B observados em análise por citometria de fluxo, assim como a detecção de plasmócitos em análise de imuno-histopatologia, levantamos a hipótese da ocorrência de um processo de diferenciação de linfócitos B no microambiente tumoral. A fim de verificar esta possibilidade, realizamos a análise de células de centro germinativo. Brevemente, camundongos fêmea C57BL/6 foram inoculados com $5x10^5$ células E0771 e após 7, 14 e 21 dias os animais foram sacrificados, o tumor e, adicionalmente, os linfonodos não drenante (nDLN) e drenante (tDLN) extraídos, processados e avaliados por citometria de fluxo.

Avaliando a expressão de CD95 e CD38 dentro do compartimento de linfócitos B (CD19+), observamos células B de centro germinativo (GC) em todas as amostras e períodos avaliados, correspondendo até 0,59, 3,84, e 4,40% do total de células B no nDLN, tDLN e tumor, respectivamente. Verificamos elevação deste fenótipo celular (CD95+ CD38low-) logo após 7 dias de desafio tumoral, em destaque no tDLN e tumor. Apesar disso, observamos contínua queda na frequência destas células no TME (Figura 44A). Embora a análise inicial tenha reportado presença de linfócitos B GC no TME nos três períodos temporais (Figura 44B), investigando a localização destas células no *dotplot* observamos maior dispersão de eventos/células em relação as GCs em amostra de tDLN (Figure 44C).

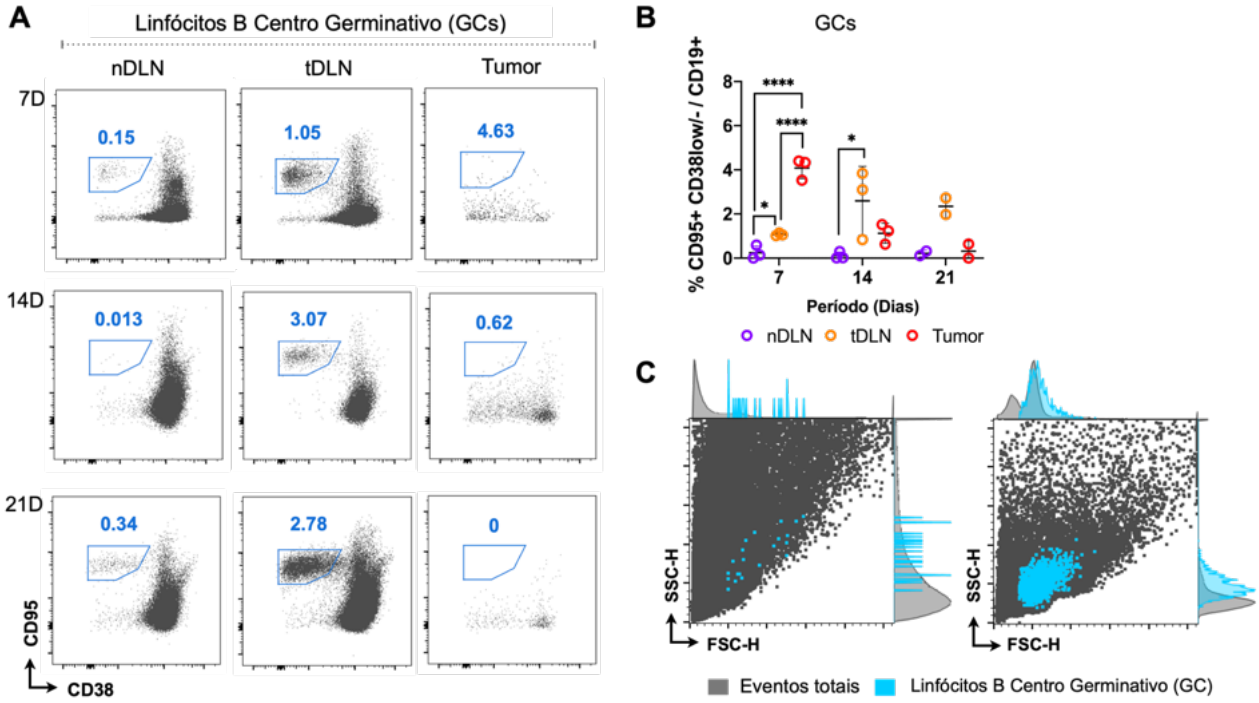


Figura 44. Avaliação de linfócitos B de centro germinativo (GCs) de animais desafiados por células E0771. (A) *Dotplot* representativo de linfócitos B de centro germinativo (CD95+ CD38low-) em amostras de nDLN (coluna #1), tDLN (coluna #2), e tumor (coluna #3) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral por células E0771. Células selecionadas (*gated)* apresentando frequência em relação ao total de linfócitos B (CD19+).

(B) Frequência de linfócitos B de centro germinativo no nDLN (roxo), tDLN (laranja), e tumor (vermelho) após 7, 14 e 21 dias de desafio tumoral por células E0771. **(C)** *Dotplot* demonstrando a posição (tamanho FSC-H vs granulosidade SSC-H) de linfócitos B GCs (azul) em amostras de tumor (esquerda) e tDLN (direita) após 7 dias de desafio tumoral com células E0771. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

A fim de confirmar estes resultados, realizamos experimento com uma nova coorte de animais utilizando *setup* experimental similar. Brevemente, camundongos fêmea S1PR2^{CreERT2} Rosa26$^{Low\text{-}Stop\text{-}Low\text{-}tdTomato}$ foram inoculados com 5x10^5 células E0771, sendo realizada administração de duas doses de tamoxifeno nos dias 7 e 9 após o desafio tumoral. Os animais foram sacrificados no dia 14, e o tumor, nDLN, tDLN extraídos e preparados para aquisição de imagem por imunofluorescência e análise por citometria de fluxo.

Em divergência aos achados por citometria de fluxo, não verificamos a presença de células B centro germinativas nas amostras tumorais, sugerindo sinal falso positivo na análise anteriormente realizada. Apesar disso, a análise de imagem por imunofluorescência confirma os dados previamente expostos, de modo que é visível aumento mais pronunciado de células B GCs no tDLN em comparação ao nDLN após o desafio tumoral com células E0771 (Figura 45A). Quantificando-se os linfócitos B GCs, demonstramos que para um mesmo animal há diferença na contagem celular entre nDLN e tDLN, com este apresentando número entre 2-4x maior de células GCs (Figura 45B).

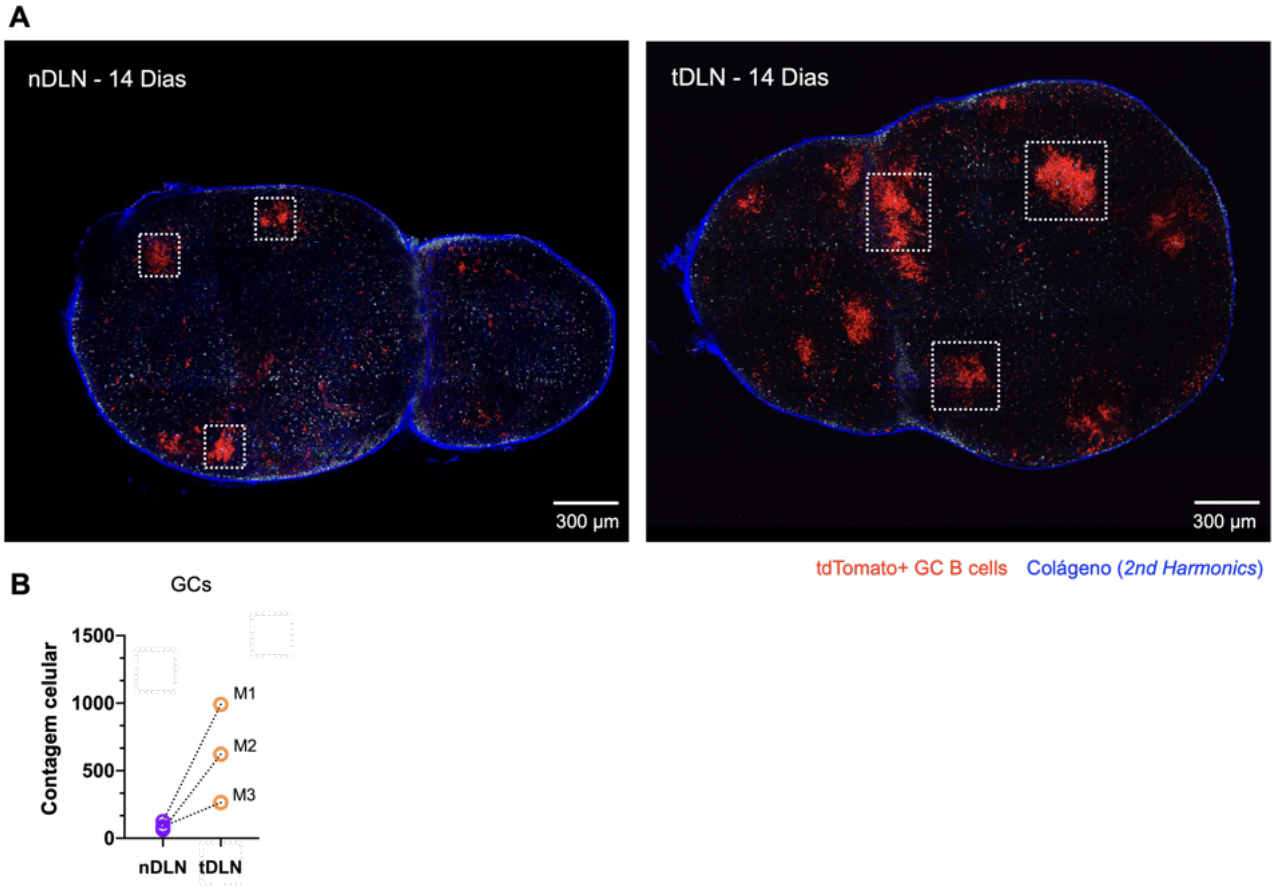


Figura 45. Linfócitos B centro germinativo em nDLN e tDLN após desenvolvimento tumoral. (A) Imagem representativa *(Z-slice)* de linfonodo não drenante (nDLN) e drenante (tDLN) de linfócitos B centro germinativo (GCs) mTomato+ destacados (quadriculado), após 14 dias de desafio tumoral por células E0771. Fibras colágenas destacadas em azul (*2nd harmonics)*. **(B)** Contagem celular de linfócitos GC no nDLN e tDLN após 14 dias de desafio tumoral por células E0771. Camundongos nomeados como M1-M3.

5.11. Impacto de anti-PD-1 e anti-LAG-3 na dinâmica celular

Uma vez determinadas as diferenças no desenvolvimento dos tumores E0771 e 4T1, assim como a cinética de diferentes subpopulações de linfócitos B em condições não tratadas, nos questionamos o impacto do tratamento combinatório com imunoterápicos no desenvolvimento tumoral e na cinética de linfócito B. A fim de verificar se os efeitos eram dose-dependente, em primeiro momento fracionamos a análise em função do número de doses administradas. Brevemente, camundongos fêmea C57BL/6 foram inoculados com $5x10^5$ células E0771 (dia 0) e distribuídos de maneira aleatória em grupos isotipo controle e tratamento. Após o estabelecimento do tumor (10 dias), os animais receberam tratamento correspondente ao grupo a cada 72h, sendo sacrificados em intervalos de 2 doses, até completar 6 doses, tendo o linfonodo drenante e tumor extraídos para avaliação por citometria de fluxo.

Mensurando os tumores ao longo do tempo, observamos diferença significativa no volume tumoral entre as condições experimentais utilizadas. Camundongos que receberam tratamento combinatório por anti-LAG-3 + anti-PD-1 apresentaram melhor controle da doença, apresentando tumores com menor volume. Ainda assim, diferenças significativas só foram constadas a partir de 3 doses, ou 16 dias após o desafio tumoral inicial, com animais do grupo tratamento apresentando tumores de volume equivalente a 57,61 mm^3 (média), ao passo que animais dos grupos não tratado e controle isotipo apresentaram tumores com 106,68 mm^3 e 113,53 mm^3 (média), respectivamente. Interessantemente, não observamos diferença significativa para o último período analisado (26 dias / 6 doses), ainda assim tumores não tratados ou tratados por isotipo apresentaram em média volume 5 e 6x maior comparado aos animais do grupo tratado (Figura 46).

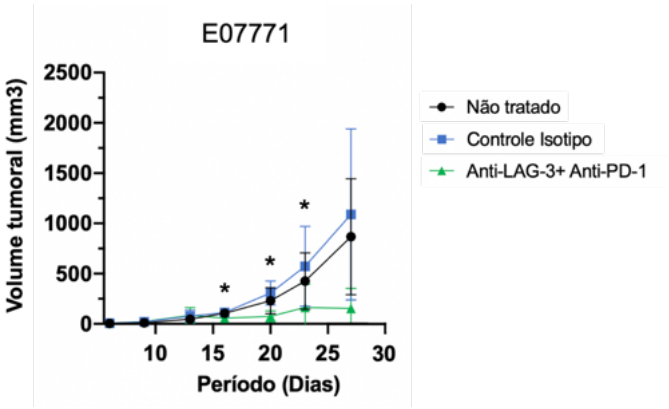


Figura 46. Volume de tumores E0771 em diferentes condições experimentais. Volume tumoral (mm^3) média ao longo do período de desenvolvimento referente a animais do grupo não tratado (preto), controle isotipo (azul), e tratado (verde). Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Avaliando os perfis linfocitários no microambiente tumoral, embora alguns dos animais tenham apresentado elevação na frequência de linfócitos TCD4 e TCD8 após 2, 4 e 6 doses administradas, não houve diferença significativa comparando-se aos animais do grupo controle, de modo que estes perfis celulares compreenderam em ambos os grupos majoritariamente a 3-6% para linfócitos TCD4, e 4-10% para linfócitos TCD8 (Figura 47A-B). De maneira similar, não evidenciamos mudanças significativas na frequência de linfócitos B ao longo do período de tratamento, de modo que este perfil celular colaborou com parcela minoritária, em até 4,5% do total de leucócitos presentes no microambiente tumoral em ambas as condições experimentais utilizadas (Figura 47C).

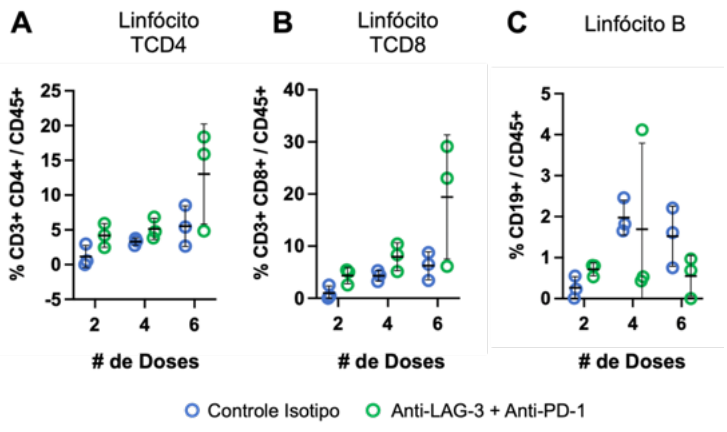


Figura 47. Frequência de linfócitos tumor infiltrantes em condições controle e tratada. Frequência (%) de linfócitos TCD4 (A), TCD8 (B), e linfócitos B (C) no tumor de animais dos grupos controle isotipo (azul) e tratado (verde) após 2, 4 e 6 doses de tratamento. Média ± desvio padrão.

Além disso, o tratamento não contribuiu com o processo de diferenciação de linfócitos B no TME, haja visto que não foram observados nenhum evento celular correspondente a linfócitos B de centro germinativo (GCs) e plasmócitos nas amostras tumorais tratadas (Figura 48).

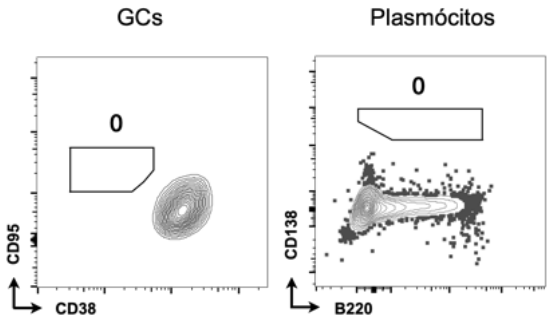


Figura 48. Avaliação de linfócitos B de centro germinativo (GCs) e plasmócitos em tumores de animais tratados. *Contour plot* representativo de linfócitos B de centro germinativo (CD95+ CD38low-) (direita) e plasmócitos (CD138+) (esquerda) em amostras tumor E0771 após 6 doses de tratamento com anti-LAG-3 + anti-PD-1. Células selecionadas (*gated)* apresentando frequência em relação ao total de células selecionados anteriormente.

Ainda que o tratamento combinatório tenha sido caracterizado por redução do volume tumoral, alterações significativas em populações do compartimento linfocitário somente foram observadas em momento tardios do tratamento. Compreendendo entre aproximadamente 10-30% da população leucocitária total no tDLN, ainda que não tenhamos observado mudança após 2 e 4 doses de tratamento, observamos elevação significativa na frequência de linfócitos TCD4 em relação ao grupo isotipo controle (20% vs. 14%) (Figura 49A). Embora comportamento semelhante tenha sido observado para a população de linfócitos TCD8, não observamos alterações significativas em nenhum dos intervalos de doses utilizados (Figura 49B). O mesmo foi observado para o compartimento de linfócitos B, de modo que o tratamento não acarretou em nenhum aumento significativo (Figure 49C).

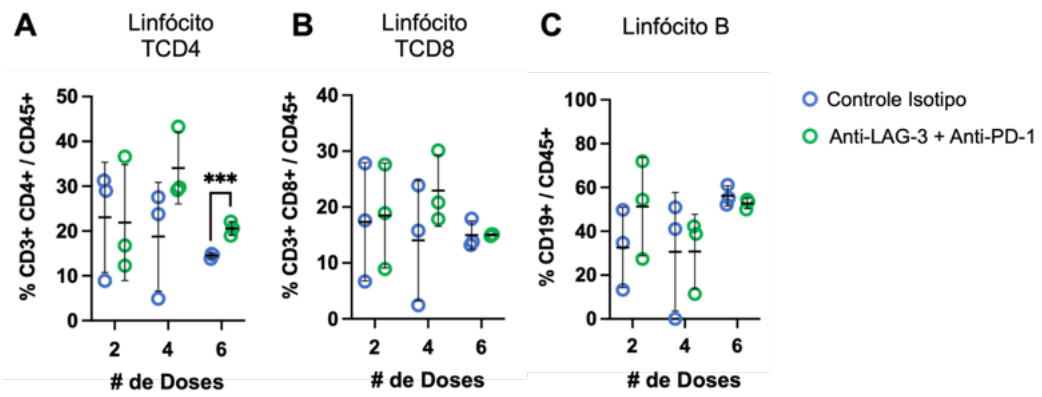


Figura 49. Frequência de linfócitos no tDLN em condições controle e tratada. Frequência (%) de linfócitos TCD4 **(A)**, TCD8 **(B)**, e linfócitos B **(C)** no tDLN de animais dos grupos controle isotipo (azul) e tratado (verde) após 2, 4 e 6 doses de tratamento. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Embora alguns dos animais do grupo tratado tenha apresentado elevação na frequência de linfócitos B de centro germinativo – 13% e 22% após 4 e 6 doses, respectivamente, não constatamos diferença significativa quando comparado aos animais do grupo controle (Figura 50A). Curiosamente, verificamos elevação de plasmócitos no tDLN, sendo este aumento significativo em todos os intervalos de tratamento utilizados. Dentre estes, constatamos elevação destacada após 6 doses de tratamento, cujas frequências médias foram de 0,15% e 0,64% nos grupos controle isotipo e tratado, respectivamente (Figura 50B).

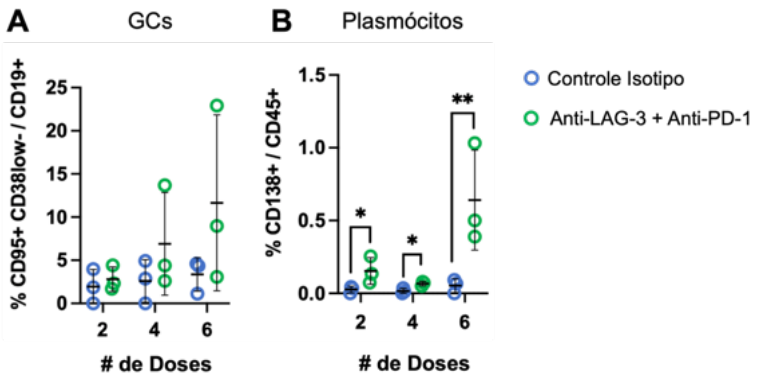


Figura 50. Frequência de GCs e plasmócitos no tDLN em condições controle e tratada. Frequência (%) de linfócitos B de centro germinativo **(A)**, e plasmócitos **(B)** no tDLN de animais dos grupos controle isotipo (azul) e tratado (verde) após 2, 4 e 6 doses de tratamento. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Embora não tenhamos verificado alteração significativa no compartimento de linfócitos B a partir do tratamento, alguns dos animais apresentaram elevação, achado que foi confirmado ao avaliar o tDLN sob microscopia de fluorescência. Em oposição ao animal do grupo controle, o animal do grupo tratado apresentou número maior quantidade de linfócitos B de centro germinal (tdTomato+) (Figura 51).

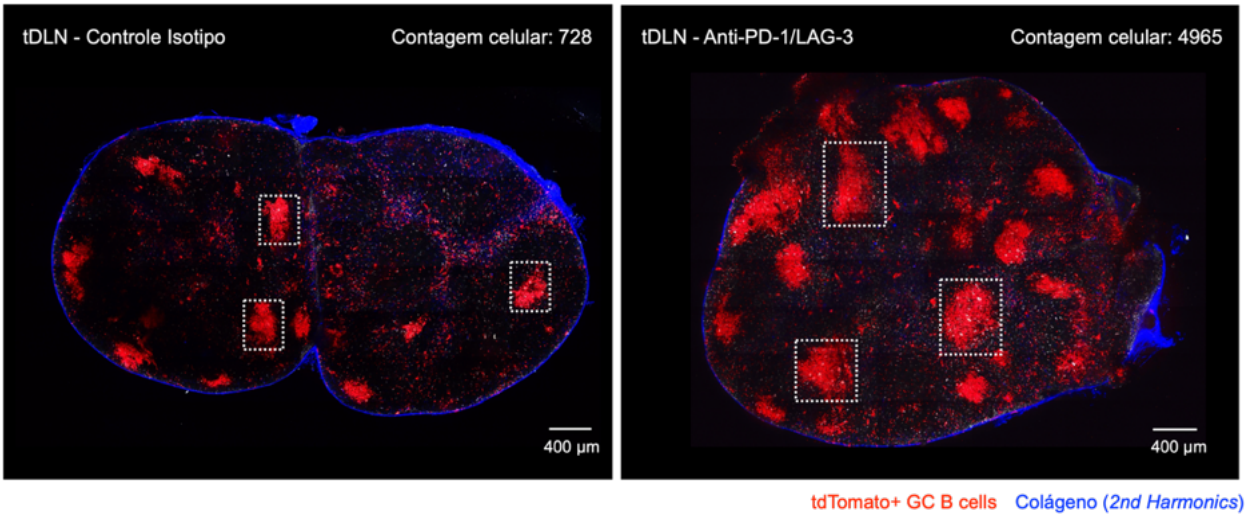


Figura 51. Linfócitos B centro germinativo em tDLN. Imagem representativa *(Z-slice)* de linfonodo drenante (tDLN) de linfócitos B centro germinativo (GCs) mTomato+ destacados (quadriculado), após 6 doses de tratamento correspondente em animal de grupo controle (esquerda) e tratado (direita). Fibras colágenas destacadas em azul (*2nd harmonics)*. Contagem celular (diagonal direita).

Igualmente relevante, o tratamento combinatório também não foi capaz de causar alterações significativas na frequência de linfócitos B GCs no nDLN após seis doses administradas, ainda que alguns dos animais tenham apresentado elevação para este fenótipo celular (Figura 52A). Embora não tenhamos constatado diferenças entre nDLN e tDLN em face ao tratamento combinatório por anti-PD-1 + anti-LAG-3, verificamos diferença para a população de plasmócitos, sendo verificado elevação significativa entre o grupo controle e tradado somente para o tDLN, cuja a frequência de plasmócitos no tecido foi de 0,64% do total de leucócitos (Figura 52B).

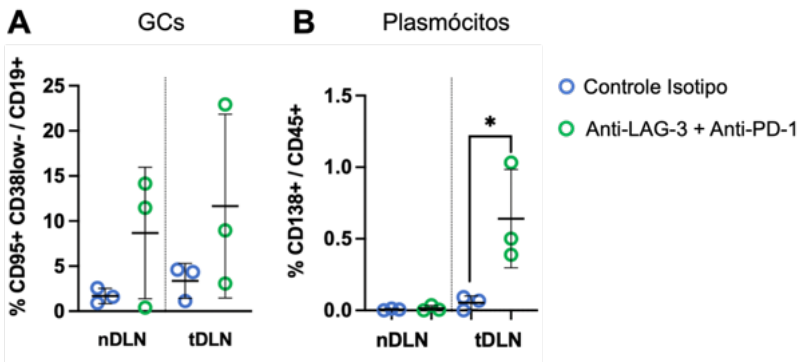


Figura 52. Frequência de GCs e plasmócitos no nDLN e tDLN em condições controle e tratada. Frequência (%) de linfócitos B de centro germinativo **(A)**, e plasmócitos **(B)** no nDLN (esquerda) e tDLN (esquerda) de animais dos grupos controle isotipo (azul) e tratado (verde) após 6 doses de tratamento correspondente. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Em consideração às elevações de plasmócitos no tDLN após 6 doses de tratamento imunoterápico, sequencialmente realizamos a análise do soro dos animais, a fim de verificar potenciais mudanças no perfil de imunoglobulinas. Embora o tratamento não tenha acarretado em elevação nos isotipos IgA, IgM e IgG3 entre as condições experimentais utilizadas, verificamos elevação significativa na absorbância média de IgG1 em ensaio de ELISA para os animais tratados em comparação aos animais não tratados ou em condição controle isotipo (Figura 53).

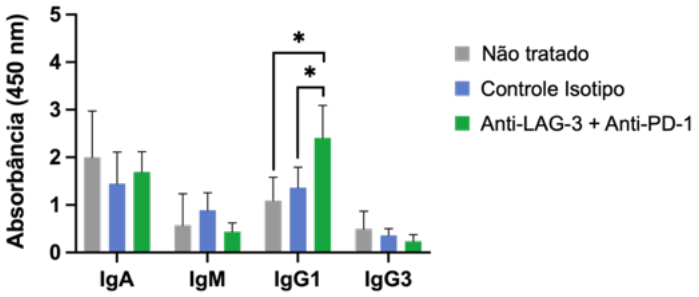


Figura 53. Perfil de imunoglobulinas no soro de animais não tratados, isotipo e imunoterápicos. Quantificação de diferentes isotipos de anticorpos (IgA, IgM, IgG1, IgG3) por ELISA em animais não tratados (cinza)(26 dias de desafio tumoral), e animais controle (azul) e tratados (verde) após administração de 6 doses correspondentes. Média ± desvio padrão. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

5.12. Impacto de anti-PD-1 e anti-LAG-3 no reconhecimento de antígenos tumorais

Em consideração à elevação de plasmócitos no tDLN, assim como a elevação de imunoglobulinas de isotipo IgG1 após 6 doses de tratamento combinatório, em último momento avaliamos qual seria o impacto na capacidade de reconhecimento destes anticorpos a antígenos derivados de tumores. Para isso, anticorpos isolados de culturas de linfócitos B de centro germinativo de animais não tratados (n total = 50), controle isotipo (n total = 37), e tratado (n total = 29) tiveram sua reatividade testada (ELISA) contra antígenos provenientes de linhagem celular E0771 assim como proteínas de tumores correspondentes. Embora alguns dos anticorpos providentes das culturas de GCs dos grupos não tratado e controle isotipo tenham sido capazes de reconhecer proteínas de linhagem celular, não houve diferença significativa comparado ao controle negativo. Igualmente, o tratamento não acarretou em mudanças no reconhecimento de antígenos comparado ao controle negativo, sendo observados valores de absorbância similares no ensaio de ELISA (Figura 54A). Corroborando com estes resultados, também não verificamos mudanças significativas na absorbância entre o controle negativo e grupos não tratados e controle isotipo ao testar a reatividade dos anticorpos contra proteínas derivadas

de tumores. Pelo contrário, os anticorpos derivados de animais tratados resultaram num sinal de absorbância mais elevado em comparação com o controle negativo (Figure 54B).

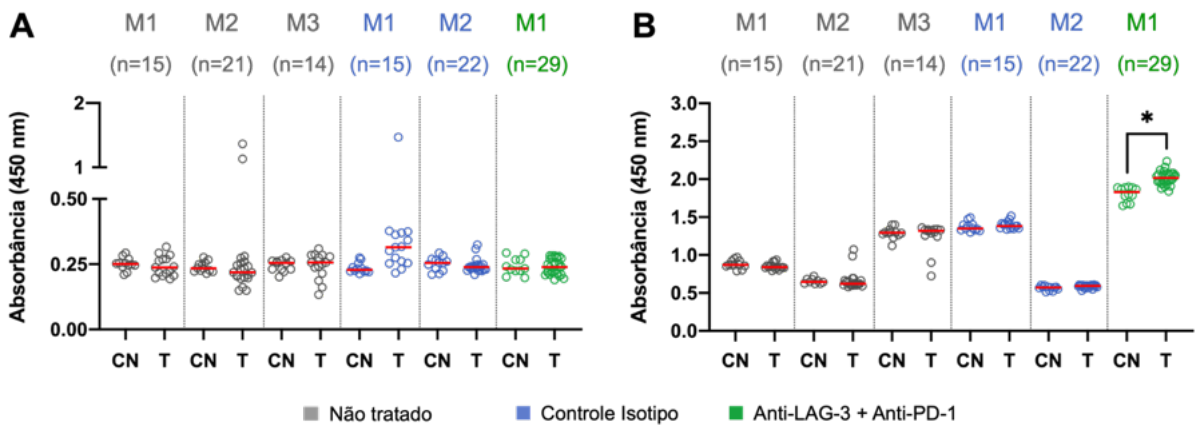


Figura 54. Reatividade de anticorpos derivados de GCs a proteínas de linhagem celular e tumor E0771. Absorbância (450 nm) de anticorpos provenientes de linfócitos B de centro germinativo derivados de animais não tratados (M1-M3, cinza), controle isotipo (M1-M2, azul), e tratado (M1, verde) contra antígenos de linhagem celular **(A),** e extrato proteico tumoral **(B)**. Mediana (linha vermelha) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001. CN= controle negativo; T= tumor.

6. DISCUSSÃO

Diante da elevada agressividade, recidiva precoce e número limitado de terapias disponíveis, a melhor compreensão dos mecanismos celulares nos tumores de mama triplo-negativo (TNBC) torna-se um imperativo visando o melhor gerenciamento e tratamento da doença no futuro. Nas últimas décadas crescente número de evidências demonstram que embora associados a um pior prognóstico, estes tumores possuem maior atividade imunológica, compreendendo uma complexa e dinâmica rede de interações entre células tumorais e linfócitos, macrófagos, células dendríticas, entre outras, no microambiente tumoral, mas, também, em tecidos linfoides. Ainda que em anos recentes avanço notável tenha sido alcançado em respeito à dinâmica de linfócitos TCD4 e TCD8 em face ao desenvolvimento de tumores de mama, o mesmo não pode ser dito em relação à resposta humoral, cuja importância ainda se encontra sob debate.

No presente estudo, a fim de melhor compreender a resposta imunológica humoral em pacientes TNBC e levando em consideração evidências quanto à presença de linfócitos B em tumores triplo-negativo (SOLINAS et al., 2017a; GARAUD et al., 2019), investigamos o impacto deste tipo tumoral na reposta imunológica humoral. Embora utilizando número amostral reduzido, ambas as análises através do CIBERSORTx e xCell apontaram para a presença de diferentes populações de linfócitos B em amostras de pacientes TNBC. Apesar da análise por xCell ter apontado elevação significativa de linfócitos pró B nas amostras tumorais, é provável que este seja um resultado falso positivo, dado a incapacidade de células em estágios imaturos – sem expressão ou verificação do BCR sintetizado deixarem a medula óssea (CLARK et al., 2014). Curiosamente, linfócitos pró B também foram observados em pacientes de tumores de mama não triplo-negativo em análise conduzida por Li e colaboradores (LI et al., 2020).

Ainda que a presença de linfócitos pró B no TME seja improvável e divergências tenham sido constatadas entre CIBERSORTx e xCell, em nossas análises, ambas as ferramentas apontaram para a presença de linfócitos B naïve, assim como estágios de diferenciação avançados como linfócitos B de memória e plasmócitos, sugerindo um contínuo processo de diferenciação celular no TME. Corroborando com estes dados, Harris e colaboradores demonstraram enriquecimento de CD20 em amostras TNBC comparada a amostras de mama não tumoral em análise de expressão gênica com dados do TCGA. Igualmente relevante, estes autores demonstraram maior densidade de células CD20+ nas lâminas de amostras tumorais em comparação ao tecido não tumoral, além de observarem perfis de linfócitos B de memória e plasmócitos em amostras tumorais (HARRIS et al.,

2021). Utilizando dados provenientes do banco METABRIC, Lv e colaboradores fazendo uso da ferramenta ESTIMATE para análise de tumores TNBC, demonstraram enriquecimento de linfócitos B entre as pacientes com maior atividade imunológica. Além disso, os autores reportaram correlação positiva entre linfócitos B e a citocina CXCL13, quimiocina esta fundamental na quimiotaxia de linfócitos B em órgãos linfoides secundários, assim como formação de TLS em tumores sólidos (GROENEVELD et al., 2021; LV et al., 2021). Similarmente, avaliando o perfil de expressão gênica de linfócitos B tumorais infiltrantes, Hu e colaboradores também constaram transcritos associados a diferentes populações de linfócitos B em amostras tumorais, ainda que heterogeneidade significativa tenha sido visto entre as pacientes (HU et al., 2021a).

Ainda que diferentes estudos associem a presença de linfócitos B totais, plasmócitos e linfócitos B de memória a um melhor prognóstico em pacientes TNBC (YEONG et al., 2018; GARAUD et al., 2019; DENG et al., 2019; HARRIS et al., 2021), a origem destes diferentes estágios de maturação no TME ainda é debatida, dado que em últimos anos evidências apontam a existência de TLS em regiões adjacentes ao tumor, e que podem contribuir para diferenciação de linfócitos B no local (PARK et al., 2017; SEOW et al., 2020; ZOU et al., 2022). Ainda que no estudo conduzido por Hu e colaboradores tenha sido observado a presença de transcritos de linfócitos B de centro germinativo em tumores TNBC, o número de amostras utilizados na análise foi limitado (HU et al., 2021a). Levando em consideração esta e outras evidências a cerca de TLS em tumores sólidos (FIGENSCHAU et al., 2015; SAUTÈS-FRIDMAN et al., 2019), assim como a importância de linfócitos B GCs na seleção clonal e diferenciação em plasmócitos e linfócitos B de memória (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2022), inicialmente caracterizamos a expressão gênica de linfócitos B GCs utilizando dados de transcritoma provenientes de sequenciamento de células únicas (sc-RNAseq) derivados de banco de dados do INCA.

Além de observar enriquecimento de marcadores canônicos como AICDA, Fas e PD-1, interessantemente também verificamos enriquecimento do *immune checkpoint* LAG-3 na população, achado este que sugere que outros *immune checkpoints* estão potencialmente envolvidos na dinâmica de células B GCs. Levando em consideração este resultado, consideramos a hipótese que LAG-3 atue de maneira conjunta ao PD-1 para balancear os sinais proliferativos desencadeados na interface BCR-MHC durante o processo de seleção clonal. Ainda que dados na literatura sobre o papel do receptor neste perfil celular sejam escassas, evidências demonstram que PD-1 está intimamente associado à regulação de células B GCs (GOOD-JACOBSON et al., 2010; GARCIA-LACARTE et al., 2021).

Adicionalmente, estudos recentes demonstram que LAG-3 é frequentemente co-expresso com PD-1 (LONG et al., 2018a; SHI et al., 2022).

Embora nossa análise tenha apontado a presença de linfócitos B GCs no infiltrado tumoral de pacientes TNBC, e o resultado seja sugestivo de processo de diferenciação celular no TME, é necessário ponderar que populações emergentes do processo de diferenciação – como linfócitos B de memória e plasmócitos, também podem originar em SLOs. De maneira interessante, analisando o repertório de imunoglobulinas em tecido tumoral, sangue periférico, medula óssea e tDLN, embora Aizik e colaboradores tenham observado segmentos gênicos de imunoglobulina específicos em cada um dos tecidos avaliados, alguns dos segmentos de IGH foram compartilhados, sugerindo que ainda que clones específicos possam surgir no TME, existe uma migração de clones de linfócitos B entre os compartimentos (AIZIK et al., 2021).

Além da detecção de linfócitos B GCs nas amostras tumorais, utilizando assinatura gênica definida por Hu e colaboradores para linfócitos B infiltrante tumorais, também observamos a presença de diferentes subtipos de linfócitos B de memória nas amostras de pacientes TNBC. Apesar dos papeis de linfócitos B de memória CD99+ serem escassos no contexto de tumores de mama, autores apontam que o receptor está envolvido em diferentes funções, incluindo adesão, migração, morte e diferenciação celular (MANARA; PASELLO; SCOTLANDI, 2018). Em estudo anterior, Park e colaboradores, demonstraram elevada expressão do receptor em linfócitos B IgG+ em relação a linfócitos B IgM+, pelos quais os autores sugerem que o receptor esteja relacionado à ativação de linfócitos (PARK et al., 1999). Interessantemente, Gil e colaboradores demonstraram que o receptor também é verificado em células B GCs e plasmócitos, corroborando com achados anteriores e associando o receptor a quimiotaxia de linfócitos B (GIL et al., 2015). Coletivamente, levando em consideração as informações disponíveis na literatura, é possível que as populações CD99+ sejam estágios iniciais de linfócitos B de memória originados no TME. Ainda assim novos estudos são necessários para melhor compreender a natureza e papel destas células.

Curiosamente, outros perfis de linfócitos B de memória com expressão elevada de CCR7 e NUR77 também foram detectadas em nossas análises nas amostras tumorais de pacientes TNBC. Reconhecidamente expressos por linfócitos B após o reconhecimento antigênico, e permitindo a migração até a borda da zona de células T em SLOs (WISHNIE et al., 2021), estudo recente demonstra que o receptor CCR7 também possui papel fundamental no direcionamento de células B de memória. Avaliando o processo de geração de linfócitos B de memória a partir de células B GCs, Zhang e colaboradores, demonstraram

que a expressão de CCR7 é fundamental para a migração e reentrada destas células em linfonodos drenantes e folículos, de maneira que linfócitos B de memória em animais deficientes para o receptor não foram capazes de retornar até o parênquima do linfonodo, contribuindo para elevação do número de células no sangue periférico (ZHANG et al., 2022). Ainda em trabalho de Zhang e colaboradores, foi demonstrado a capacidade de linfócitos B de memória CCR7+ em retornaram ao estágio de linfócitos B GCs, pelo qual os autores sugerem um mecanismo de reciclagem e aprimoramento da afinidade de anticorpos produzidos. Em consideração a estes resultados, é possível que haja reentrada de linfócitos B de memória em TLS presentes em tumores TNBC, contribuindo para o aprimoramento da resposta imunológica humoral no local.

Em semelhança ao CD99, o papel desempenhado pelo receptor NUR77 em populações B de memória é pouco conhecido. Ainda assim, o receptor nuclear tem sido associado a apoptose e migração de células tumorais de mama, inflamação, regulação do ciclo celular e também metabolismo de glicose (WU; CHEN, 2018). Em condições fisiológicas, avaliando o papel de NUR77 em modelo pré-clínico, Ashouri e Weiss demonstraram que a expressão do receptor nuclear esteve associado à sinalização do BCR, de modo que declínio na expressão foi verificada horas após a cessão de estímulo do BCR em linfócitos B. Adicionalmente, os autores demonstraram que a sinalização de NUR77 é dependente das cascatas PI3K, via esta associado ao BCR (ASHOURI; WEISS, 2017). Outros trabalhos também corroboram com estes achados, demonstrando que o receptor é rapidamente expresso em linfócitos B naïve em resposta ao reconhecimento antigênico pelo BCR, de maneira a limitar a sobrevivência e expansão de linfócitos B através de diferentes mecanismos (ZIKHERMAN; PARAMESWARAN; WEISS, 2012; TAN et al., 2019).

Igualmente relevante, Brooks e colaboradores estudando o papel do receptor na dinâmica de expansão clonal, sugeriram que o NUR77 atua de modo a otimizar a proliferação inicial acarretada pela ativação do BCR, contribuindo para a competição entre os diferentes clones de linfócitos B, resultando em última instância na seleção do melhor clone para um determinado antígeno (BROOKS et al., 2021). Em consideração a estes achados, é possível que linfócitos B de memória com expressão elevada de NUR77, sejam células de memórias emergentes logo após o processo de diferenciação celular a partir de linfócitos B GCs, algo que já foi constatado em trabalho por Mesin e colaboradores (MESIN et al., 2020). Em semelhança aos demais perfis de memória observadas no presente trabalho, também é possível que estas células sejam geradas a partir de processo de diferenciação *in situ*, em destaque em TLS presentes em tumores de mama.

Curiosamente, embora a detecção de diferentes subpopulações de linfócitos B na amostra de pacientes TNBC indique a elaboração de resposta imunológica humoral contra antígenos tumorais, em última instância contribuindo para o melhor controle da expansão tumoral, não observamos diferenças significativas para nenhuma das populações para taxa de sobrevivência global (OS). Apesar disso, observamos melhores taxas PFI em pacientes com maior enriquecimento para linfócitos B GCs, naïve e linfócitos B de memória CD99 em comparação a pacientes com baixo enriquecimento para estas populações. Ainda que limitados a uma coorte menor do que a utilizada no presente trabalho, Hu e colaboradores demonstraram melhores taxas de OS e DFS para pacientes TNBC com maior enriquecimento para linfócitos B totais, naïve e memória usando dados do METABRIC (HU et al., 2021b). Embora os autores não tenham avaliado as subpopulações de linfócitos B exploradas no presente estudo, além de utilizarem metodologia distinta, Yeong e colaboradores também não verificaram melhor na taxa OS entre pacientes com maior densidade de plasmócitos (CD38+) (YEONG et al., 2018). Ainda que Kuroda e colaboradores também utilizando número limitado de populações B e abordagem metodológica diferente, os autores demonstraram resultados opostos aos de Yeong e colaboradores. De acordo com os autores, a maior infiltração por linfócitos CD20+ e CD38+ estromal estiveram associado a melhores taxas OS e RFS (KURODA et al., 2021). Embora estudos utilizando novas coortes sejam necessárias, em associação aos estudos mencionados, nossos achados reforçam a importância da elaboração da resposta imunológica humoral em pacientes TNBC, de modo que sua melhor compreensão possui potencial benefício clínico.

Ainda que as análises de tumores de mama por ferramentas de bioinformática sejam úteis para investigação de populações celulares no momento do diagnóstico, muita das vezes os resultados obtidos refletem estágios avançados da doença, em que já há comprometimento da resposta imunológica conforme estabelecido por diferentes autores (BURNET, 1970; THOMAS, 1982; DUNN et al., 2002). Dessa forma não sendo possível verificar os eventos imunológicos desencadeados em momentos iniciais da carcinogênese. Em face a esta limitação e buscando compreender os fenômenos da resposta imunológica humoral no TNBC, utilizamos dois modelos de câncer de mama murino (4T1 e E0771). Interessantemente, embora na literatura ambos sejam amplamente utilizados para o estudo de tumores triplo-negativo (CROSBY et al., 2018; KNAB et al., 2021; VITO et al., 2021), e em nossas avaliações histopatológicas ambos apresentaram morfologia similar, tumores 4T1 tiveram desenvolvimento mais acentuado, apresentando volume final aproximadamente 5x maior que tumores E0771. Além disso, ainda que áreas necróticas

tenham sido observadas em ambos os modelos, tumores 4T1 apresentaram áreas mais extensas e frequentes, reforçando sua elevada proliferação. Embora utilizando número distinto para o estabelecimento de tumores e período de análise, Ager e colaboradores demonstraram em condição controle que tumores 4T1 apresentaram maior volume tumoral que tumores E0771 (AGER et al., 2015). De maneira oposta, em estudo conduzido por Muhammad e colaboradores foi verificado que tumores E0771 apresentaram volume média mais elevado (600 mm^3) que tumores 4T1 (400 mm^3). Apesar da diferença com nossos resultados, os autores não informaram o número de células utilizadas para o estabelecimento dos tumores, aspecto importante e que Gregório e colaboradores demonstraram influenciar no volume tumoral ao longo do desenvolvimento (GREGÓRIO et al., 2016; MUHAMMAD et al., 2017).

As diferenças observadas no crescimento de tumores 4T1 e E0771 podem refletir diferenças moleculares importantes e têm sido alvo de investigação em anos recentes. Embora a classificação histopatológica de linhagens celulares murinas e sua semelhança com tumores em humanos seja alvo de debate, em estudo recente avaliando genoma e o transcritoma de células 4T1, Schrörs e colaboradores demonstram que a linhagem possui enriquecimento de vias celulares compatíveis com tumores humanos basal-símile. Os autores também constataram expressão de citoqueratina-14, proteína frequentemente observada neste subtipo intrínseco. Além disso, foi observado elevação considerável de receptores de tirosina quinase (ex.: Fgfr2), estes associados a transdução de sinais que culminam em última instância em angiogênese, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência no microambiente tumoral (SCHRÖRS et al., 2020). De maneira oposta, avaliando a expressão gênica de células 4T1 por microarranjo, Johnstone e colaboradores revelaram que a linhagem possui expressão elevada de genes associados a ambos os subtipos luminal e basal. Apesar disso, os autores demonstraram em análise por imuno-histoquímica que a linhagem em questão possui expressão de citoqueratinas 5/6 e EGFR, marcações características de células basais (JOHNSTONE et al., 2015), sugerindo em última instância que a linhagem possui caráter misto de células luminais e basais.

Curiosamente, ainda no trabalho de Johnstone e colaboradores foi demonstrado que células da linhagem E0771 possuem perfil imuno-histoquímico semelhante a células 4T1, também expressando citoqueratinas 5/6 e EGFR, e, portanto, tendo fenótipo basal-símile. Ainda assim, em análise de expressão gênica foi observado enriquecimento em vias de ambos subtipos luminal e basal, sugerindo que a linhagem também possui caráter misto. Interessantemente, apesar de ter sido demonstrado alterações relevantes em vias associadas a proliferação, genes de resposta a hipóxia e invasão em ambas as linhagens

celulares, o perfil de expressão é distinto. Embora o estudo tenha evidenciado compartilhamento em genes hiper- (205) e hipo-regulados (220) entre células 4T1 e E0771, o número de genes diferencialmente expressos superou 4000 e 1000 em linhagens 4T1 e E0771, respectivamente (JOHNSTONE et al., 2015). Igualmente relevante, analisando o transcritoma de diferentes linhagens de câncer de mama, Yang e colaboradores demonstraram que células 4T1 e E0771 se agruparam de maneira distinta. Ainda que ambas as linhagens não tenham apresentado expressão de ER, o agrupamento de células 4T1 foi caracterizado por enriquecimento em vias de proliferação, angiogênese e curiosamente vias de ativação de estrogênio. Por outro lado, células E0771 foram caracterizadas por baixos níveis de expressão genes claudina, baixo nível de diferenciação celular e proliferação, além de assinatura gênica frequentemente observada em tumores com transição epitelial-mesenquimal (EMT)(YANG et al., 2017).

De maneira intrigante, embora o maior volume em tumores induzidos por células 4T1 indique maior taxa proliferativa, achados divergentes são observados na literatura quanto a expressão de Ki67 - marcador comumente utilizado para determinação da proliferação celular. Embora avaliação por microarranjo conduzido por Johnstone e colaboradores tenha verificado maior nível na expressão de Mki67 em células E0771 em comparação a células 4T1 e em avaliação imuno-histoquímica Yang e colaboradores demonstraram maior percentual de marcação de Ki67 em amostras tumorais E0771, pesquisa recente reporta achados divergentes. Napier e colaboradores observaram maior expressão do marcador em tumores induzidos por células 4T1 comparado a tumores induzidos por células E0771 após 12 dias de desafio tumoral. Curiosamente, os resultados foram inversos para o período de 6 dias, sugerindo variabilidade na proliferação celular ao longo da carcinogênese (JOHNSTONE et al., 2015; YANG et al., 2017; NAPIER et al., 2023).

Interessantemente, as diferenças entre os tumores induzidos por células 4T1 e E0771 não se resumiram ao crescimento tumoral distinto, mas, também, na capacidade de influenciar a resposta imunológica nos órgãos linfoides secundários e no microambiente tumoral. Embora expansão de tecido linfoide esteja frequentemente associado à proliferação de células B e T cognatas após o reconhecimento antigênico, avaliando perfis celulares no baço observamos uma expansão contínua de células mieloides nos animais desafiados por células 4T1, pelos quais células mielóides polimorfonucleares (CD11b+ Ly-6G+ Ly -6Clow-) foram a subpopulação predominante. Corroborando com estes achados, autores também demonstraram a elevação deste perfil celular no baço de animais inoculados com células 4T1(DUPRE'; HUNTER, 2007; SEVMIS et al., 2017). Os autores sugerem que a esplenomegalia é causada pela intensa produção de G-CSF e GM-CSF por

células 4T1, o que, por sua vez, leva à hiperplasia de células mieloides na medula óssea e promove a eritropoiese esplênica (LIU et al., 2015). Embora o impacto do 4T1 no baço tenha sido bem caracterizado, o efeito do desenvolvimento de tumores de mama induzidos por células E0771 no baço ainda é desconhecido. Curiosamente, não detectamos alterações morfológicas importantes no baço de camundongos desafiados com células E0771. Além disso, apesar de detectar perfis de células mieloides equivalentes (CD11b+) no tecido, não houveram alterações importantes ao longo do desenvolvimento tumoral, o que poderia sugerir que estas células não produzem quantidades significativas de G- e GM-CSF. Embora os antígenos associados a tumores (TAAs) e tumor-específicos (TSAs) possam se dispersar na corrente sanguínea e causar a ativação das células B esplênicas, a elevação deste perfil celular só foi verificado em período tardio. Além disso, o aumento foi mais pronunciado no modelo murino E0771, sugerindo que a elevação de células mieloides no baço de camundongos 4T1 podem comprometer a proliferação de células B. Corroborando essa hipótese, diferentes autores demonstraram que células MDSCs implementam diferentes mecanismos moleculares que dificultam a expansão e diferenciação das células B, como a supressão de células Tfh e produção de ROS, arginase-1 e óxido nítrico (NO) (LELIS et al., 2017; KNIER et al., 2018).

Curiosamente, apesar do aumento de células mieloides também ter sido detectado em tDLNs em ambos os modelos murinos, estas populações compreenderam apenas uma fração do percentual total de leucócitos (<1%), pelos quais linfócitos B representaram a maioria de leucócitos totais após o desafio tumoral. Em oposição ao baço, que possui acesso aos antígenos majoritariamente transportados através do sangue, linfonodos drenantes e vasos linfáticos estão muito das vezes localizados adjacentes ao local do tumor e fornecem acesso imediato aos TAAs eliminados pelas células tumorais necróticas e eliminadas (GARNIER; GKOUNTIDI; HUGUES, 2019). Estas diferenças podem explicar a elevação imediata na frequência e contagem absoluta de linfócitos B em tDLNs em ambos os modelos murinos em comparação com o baço. Além disso, a baixa presença de células mielóides (CD11b+) no linfonodo de ambos os modelos utilizados, implica que as ações imunossupressoras desencadeadas por estas células não esteve presente de maneira significativa no tecido, contribuindo potencialmente para a melhor ativação e expansão de linfócitos B locais. Interessantemente, em estudo recente autores demonstraram que os tDLNs de camundongos desafiados com células E0771 sofrem uma intensa alteração morfológica. De acordo com Louie *et al.,* o crescimento do tumor leva à expansão dos seios capsulares na zona de proliferação de células B e, também, uma ruptura da camada de macrófagos do seio subcapsular (SCS), favorecendo em última instância o transporte de

TAAs para zonas de linfócitos B de centro germinativo e células dendríticas foliculares associadas (LOUIE et al., 2022). Apesar de não avaliar a cinética das diferentes subpopulações de células B ao longo das semanas de desenvolvimento do tumor, Louie et al. relataram o aparecimento de células B de centro germinativo nos tDLNs do modelo E0771 7 dias após a implantação do tumor, indicando ativação e proliferação de células B neste local. Corroborando esses achados, Gu, Y. et al., analisando o papel das células B na formação de metástases linfonodais, relataram um aumento na contagem de células e na frequência de células CD19+ B220+ no tDLN de camundongos desafiados por células 4T1 (GU et al., 2019). Similar a estes achados, reportamos uma elevação significativa em ambos frequência e contagem absolutas de linfócitos B totais, bem como nas células B LAG-3+ e nas células plasmáticas nos tDLNs, não apenas em período inicial após a injeção inicial do tumor, mas, também, uma proliferação sustentada ao longo das semanas, indicando um fluxo contínuo de TAAs para tDLNs, levando à ativação, proliferação e diferenciação de células B, que podem ou não migrar para o TME. A relevância dos tDLNs no estímulo da resposta imunológica humoral contra antígenos tumorais foi observada em outro estudo, no qual a transferência de células B tDLN ativadas resultou em maior inibição no estabelecimento de metástase pulmonar. Além disso, os autores constaram que a transferência combinada de linfócitos B e T melhorou a resposta das células T contra tumores 4T1 (LI et al., 2011).

Embora grande parte da reposta imunológica em face ao desenvolvimento tumoral seja iniciada em órgãos linfoides, ao longo das últimas décadas tem sido evidenciado a presença de linfócitos B no microambiente tumoral, sugerindo que a elaboração de resposta antitumoral também pode ocorrer neste local (LAUMONT et al., 2022). Interessantemente, ainda que em menor quantidade quando comparado ao linfonodo e baço, observamos a presença de diferentes fenótipos de linfócitos B em ambos tumores para todos os períodos temporais avaliados, pelos quais linfócitos B IgD+ foi a principal população de células B. Embora os tumores de ambos os modelos apresentaram composição fenotípica semelhante para o compartimento de linfócitos B, a análise por IHC demonstrou contagem mais elevada de linfócitos B e plasmócitos nos animais desafiados por células E0771, sugerindo que mesmo tumores similares podem apresentar estimulo distinto na elaboração da resposta imunológica humoral. Corroborando com estes achados, embora Yang e colaboradores não tenham avaliado linfócitos B, o estudo demonstrou em análise de IHC que tumores induzidos por E0771 possuíam mais relação de linfócitos TCD3+ em relação a tumores induzidos por células 4T1 (YANG et al., 2017).

Levando em consideração a elaboração da resposta imunológica humoral, é possível que níveis mais elevados de linfócitos B e plasmócitos em tumores induzidos por E0771 em nossos achados se deva ao fato deste modelo apresentar maior imunogenicidade quando comparado a tumores induzidos por células 4T1. Corroborando com esta hipótese, autores demonstraram que células E0771 apresentaram número significativamente mais elevado de mutações de nucleotídeo única (SNV), potencialmente afetando a geração de neoantígenos na linhagem celular e a resposta imunológica desencadeada em modelo *in vivo* (YANG et al., 2017). De maneira complementar, Schörs e colaboradores demonstraram que embora 4T1 secretem diferentes mediadores inflamatórios, a linhagem apresenta baixo nível mutacional e SNVs em comparação a outras linhagens avaliadas, achado este que também foi constatado por estudo conduzido por Zhong e colaboradores (SCHRÖRS et al., 2020; ZHONG et al., 2020). Em oposição, embora os autores não tenham avaliado mutações presentes na linhagem celular 4T1, Lechner e colaboradores demonstraram enriquecimento de diferentes vias da resposta imunológica (CD11b, CD11c, CD4, CD8, CD40) em análise por qRT-PCR de amostras tumorais (LECHNER et al., 2013).

Ainda que os resultados indiquem o desenvolvimento de resposta imunológica no microambiente tumoral - em destaque nos tumores induzidos por células E0771, não foram observadas alterações significativas na frequência (citometria de fluxo) e contagem de células (IHC) ao longo do tempo, sugerindo que embora linfócitos B sejam capazes de migrar até o local, a proliferação e a diferenciação podem ser dificultadas. A incapacidade de maior proliferação no TME é sugestiva da ação imunossupressora de outras populações celulares presentes no local (Tregs, MDSCs) - conforme demonstrado por autores (KNIER et al., 2018; LELIS et al., 2017) e, também, possivelmente devido a ausência de componentes celulares essenciais para a ativação e seleção de linfócitos B, vide processo ocorrido em órgãos linfoides (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2012). Corroborando esta hipótese, O'Melia e colaboradores demonstraram que o desenvolvimento de tumores induzidos por células E0771 foi acompanhado de diminuição de linfócitos B infiltrantes juntamente a elevação de MDSCs e linfócitos Tregs (O'MELIA; MANSPEAKER; THOMAS, 2021). Igualmente importante, Ouzounova e colaboradores demonstram progressivo aumento na frequência de células mielóides CD11b nos tumores em animais desafiados com células 4T1, sendo a subpopulação granulocítica (Ly-6G+) o fenótipo predominante e cujas ações comprometem a proliferação de linfócitos B (OUZOUNOVA et al., 2017).

Embora a elevação de células B no tDLN e baço, assim como a detecção no TME sugiram uma resposta antitumoral contínua, é reconhecido que células tumorais implementam estratégias distintas para evitar a resposta imune, promovendo a secreção

de citocinas imunossupressoras (IL-10, TGF-β), induzindo estado tolerogênico em DCs, diminuindo a expressão de MHC-I associado ao antígeno, bem como promovendo polarização M2 em macrófagos. Além disso, o desenvolvimento do câncer está frequentemente associado à presença de células T esgotadas, com citotoxicidade prejudicada e maior expressão de moléculas de *immune checkpoint* (PD-1, LAG-3, TIM-3, TIGIT, CTLA-4) (JIANG; LI; ZHU, 2015; TIE et al., 2022). Tão importante quanto, diferentes estudos demonstram que tumores contribuem para o surgimento de linfócitos Breg, incluindo a produção de anticorpos que aprimoram a capacidade metastática de tumores (OLKHANUD et al., 2011; BIRAGYN; BODOGAI; LEE-CHANG, 2014; GU et al., 2019). Nesse sentido, levantamos a hipótese de que o progressivo estabelecimento de imunossupressão poderia acarretar em elevação na frequência de linfócitos B regulatório B10, assim como causar alteração na expressão de LAG-3 em B-TILs, especialmente em comparação com locais imunopreservados como os tDLNs e baço.

Curiosamente, embora tenhamos observado populações de linfócitos B B10 (CD5+ CD1d+) no baço dos animais desafiados com células 4T1 e E0771, a frequência deste fenótipo celular permaneceu baixo durante todo o período avaliado, somente sendo detectado aumento na contagem absoluta após 21 dias para animais desafiados por células 4T1. Além disso, não reportamos a presença deste perfil celular nas amostras tumorais em nenhum dos períodos avaliados, o que sugere que estas células são restritas ao baço e, em menor frequência, aos linfonodos. Apesar de estudos limitados acerca deste fenótipo celular em neoplasias malignas de mama, evidências recentes demonstraram que este perfil celular através da produção de IL-10, IL-35 e TGF-β possui ações pró-tumorais, potencialmente contribuindo para a proliferação de células tumorais no adenocarcinoma pancreático (DAS; BAR-SAGI, 2019) e no linfoma (HORIKAWA et al., 2011).

Interessantemente, embora a frequência e número absoluto de linfócitos B B10 tenham permanecidas praticamente inalteradas no baço dos animais desafiados por células 4T1 e ausentes no TME, observamos a presença de células B LAG-3+ em todos os tecidos de ambos os modelos murinos e períodos utilizados. Embora este receptor de *immune checkpoint* tenha sido inicialmente caracterizado em células T (TRIEBEL; JITSUKAWA; BAIXERAS, 1990), ele também foi descrito em células B. Ainda assim, o papel e a relevância deste receptor em linfócitos B durante o processo de desenvolvimento de tumores triplo-negativo ainda é pouco conhecido. Capaz de interagir com diferentes moléculas (MHC-II, galactina-3, FLG-1), as primeiras descobertas de experimentos *in vitro* demonstraram que a expressão de LAG-3 pode ser um marcador de ativação dependente de T em células B (KISIELOW et al., 2005; LONG et al., 2018b). Apesar da existência de

LAG-3 solúvel sugerir transferência passiva, foi demonstrado que os linfócitos B podem produzir ativamente o receptor (KISIELOW et al., 2005). Corroborando com estes dados, observamos que a maioria das células B LAG-3+ estavam compreendidas no compartimento IgD+, isotipo majoritariamente restrito a linfócitos B naïve e recém ativados. Embora não tenhamos detectado nenhuma mudança importante na frequência dessas populações em tDLNs ao longo do tempo, ambos animais desafiados por células 4T1 e E0771 apresentaram contagem elevada de células B LAG-3+ em comparação aos camundongos do grupo controle - incluindo em período inicial, reforçando a ideia da expressão de LAG-3 após o reconhecimento antigênico. Considerando a expressão restrita, é possível que a presença de LAG-3 forneça os sinais inibitórios para equilibrar a ativação do BCR após o reconhecimento do antígeno, em mecanismo similar ao observado em linfócitos T, cuja interação acarreta na inibição do TCR e, em última instância, impedindo a ativação do fator nuclear NFAT (MING et al., 2022). Apesar de trabalho por Lino e colaboradores ter sido demonstrado a capacidade de plasmócitos LAG-3+ emergirem a partir da diferenciação de células B1b e outros fenótipos de maneira dependente de ativação pelo BCR, nosso estudo não identificou este fenótipo (CD138+ LAG-3+) em órgãos linfoides secundários e no TME ao longo do tempo dos modelos utilizados, o que poderia sugerir que estas células podem aparecer sob condições patológicas específicas (LINO et al., 2018).

Apesar de a detecção de populações de linfócitos B IgD+ e LAG-3+ sugerir ativação e diferenciação no local, não observamos linfócitos B de centro germinativo no TME após o desafio tumoral por células E0771, sugerindo que linfócitos B infiltrantes provavelmente são derivados de órgãos linfoides secundários. Apesar de estruturas linfoides terciárias (TLS) terem sido relatadas em tumores de mama e alguns estudos apontarem sua detecção como um prognóstico favorável (LEE et al., 2016; QIN et al., 2021; ZHANG et al., 2021), é digno de nota que a formação de TLS depende de uma intrincada rede de interações celulares, exigindo fatores-chave, como produção local de linfotoxina (LT) por células indutoras de tecido linfoide (LTi), secreção de quimiocinas de células B e T locais (CCL19, CCL21, CXCL13), além do surgimento de HEVs e vasos linfáticos para permitir a migração e agrupamento local de linfócitos. Além disso, as evidências demonstram que o surgimento de TLS está associado à estimulação antigênica crônica (SAUTÈS-FRIDMAN et al., 2019; JOHANSSON-PERCIVAL; GANSS, 2021). Adicionalmente, embora a resposta imune desenvolvida em modelos murinos possua semelhanças à doença em humanos, o curto intervalo de tempo entre o estabelecimento do tumor e o período de análise pode não ser longo o suficiente para o surgimento de centros germinativos, de maneira que novas

alternativas e modelos sejam necessários para melhor compressão da dinâmica destas células no TME.

Embora os mecanismos implementados por células tumorais contribuam para a evasão imunológica e impeçam a proliferação adequada de linfócitos B no TME, nas últimas décadas novas modalidades terapêuticas objetivando resgatar os mecanismos da resposta imunológica antitumoral tem surgido. Ainda que terapias isoladas e combinadas como anti-CTLA-4 e anti-PD-1/PD-L1 tenham demostrado resultados favoráveis para neoplasias malignas de mama e outras tumores sólidos, as taxas de resposta entre os pacientes ainda são baixas, incentivando a busca por novos alvos e regimes (LI et al., 2022; WESOLOWSKI; TANKIEWICZ-KWEDLO; PAWLAK, 2022). Evidências recentes demonstram que outros receptores inibitórios, como LAG-3, TIM-3, TIGIT, VISTA também contribuem para a manutenção do ambiente imunossuprimido (ANDERSON; JOLLER; KUCHROO, 2016). Interessantemente, em comparação a outros tipos de neoplasias malignas de mama, pesquisas demonstram níveis mais elevados destes receptores no TNBC comparado aos demais tipos da doença, de modo que novas modalidades terapêuticas direcionada a estes alvos têm sido investigadas (SOLINAS et al., 2017b; LIU et al., 2021c; TAHTACI et al., 2023). Além disso, autores demonstram que LAG-3 e PD-1 são altamente coexpressos em tumores triplo-negativos, reforçando o uso de tratamento combinatório para pacientes com câncer de mama (G et al., 2016; BURUGU et al., 2017).

Objetivando compreender o impacto da imunoterapia na dinâmica de desenvolvimento tumoral e potenciais implicações na elaboração da resposta imunológica no tDLN e TME, realizamos o tratamento combinatório com anti-PD-1 + anti-LAG-3 em animais desafiados por células E0771. Ficou demonstrado que o tratamento acarretou na elevação na frequência de infiltração de linfócitos TCD4 e TCD8 nos tumores de maneira dose-dependente. Embora estudos avaliando os efeitos do bloqueio combinado de PD-1 e LAG3 ainda sejam escassos na literatura, achados semelhantes foram observados em modelos murinos de adenocarcinoma colorretal, fibroma, próstata e ovário, nos quais foram observadas maior frequência de infiltração de TCD8 após o tratamento combinado (WOO et al., 2012; HUANG et al., 2015; ZAHM et al., 2021). Interessantemente, embora em estudo conduzido por Woo e colaboradores tenha sido demonstrado que o tratamento de tumores de fibrosarcoma por terapia monoclonal por anti-PD-1 foi capaz de reduzir a progressão tumoral, o efeito foi mais robusto quando usadas em combinação com anti-LAG-3, reforçando as ações sinérgicas de LAG-3 e PD-1. Achados semelhantes foram observados para tumores induzidos por células de câncer de mama murino EMT-6, em que Du e

colaboradores demonstram diminuição significativa no volume tumoral após 8 doses de regime combinatório (WOO et al., 2012; DU et al., 2020).

Em consideração a diminuição do volume tumoral seguido o tratamento combinatório, assim como elevação na frequência de células TCD4 e TCD8 no TME, consideramos a hipótese que o reestabelecimento da reposta imunológica celular poderia contribuir com o aprimoramento da resposta imunológica humoral, de maneira que a maior eliminação de células tumorais poderia acarretar na liberação de TAAs e, portanto, elevando a probabilidade de reconhecimento por alguns clones infiltrando células B e linfócitos T cognatos. Apesar disso, em nossos experimentos não conseguimos detectar alterações na frequência de linfócitos B infiltrantes ao longo do período de tratamento, e tampouco observamos células B de centro germinativo e plasmócitos no TME de animais tratados, sugerindo que embora eficientes na reversão do estado de exaustão celular e impedir a conversão de Tregs, a ação combinatória de anti-PD-1 e anti-LAG-3 não é eficiente ao modificar a dinâmica de linfócitos B no microambiente tumoral.

Embora a terapia com inibidores de *immune checkpoints* tem se mostrado eficiente para aprimorar a resposta imunológica humoral em tumores sólidos humanos (COTTRELL et al., 2018; HELMINK et al., 2020; PETITPREZ et al., 2020; JOHANSSON-PERCIVAL; GANSS, 2021), a maior atividade de linfócitos B em função do tratamento imunoterápico parece estar relacionado à presença de TLS em amostras tumorais. Embora incomum em camundongos, trabalhos recentes utilizando modelos de melanoma e câncer de pulmão, demonstraram que a terapia com inibidor de PD-1 contribuiu para elevar o número de TLSs e, concomitantemente, melhor controle do desenvolvimento tumoral (SÁNCHEZ-ALONSO et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2021). Corroborando com estes resultados, Laumont e colaboradores observaram que a taxa de resposta a imunoterapia foi melhor em pacientes cujas amostras apresentavam TLS maduro, ao passo que pacientes em que possuiam somente linfócitos B no estroma tumoral e/ou TLS imaturas, não obtiveram resposta substancial (LAUMONT et al., 2022). Além disso, em estudo conduzido por Hollern e colaboradores, foi observado que a maior ativação de linfócitos B após o tratamento com inibidores de *immune checkpoint*, foi comprometida quando células Tfh foram neutralizadas, demonstrando que o aprimoramento da resposta imunológica humoral é dependente da atividade de linfócitos T (HOLLERN et al., 2019). Conjuntamente, estes resultados reforçam a ideia que o aprimoramento da resposta imunológica humoral em função do tratamento imunoterápico depende de um ambiente e estímulos adequados, estes proporcionados por TLS maduros.

Notavelmente, embora o tratamento combinatório anti-PD-1/LAG-3 não tenha alterado de maneira significativa a dinâmica de linfócitos B no TME, algum dos animais tratados apresentaram expansão de células B de centro germinativo e plasmócitos no tDLNs, enquanto nenhuma alteração foi observada em camundongos pertencentes ao grupo controle isotipo. Embora estes resultados possam indicar que o bloqueio combinatório por anti-PD-1 e anti-LAG-3 potencializou a resposta imunológica humoral em tDLNs, os anticorpos derivados de linfócitos B de centro germinativo não resultaram em maior reconhecimento do extrato proteico da linhagem celular E0771. Opostamente, foi observado um sinal mais elevado quando testado contra o extrato de proteína tumoral, sugerindo que estes anticorpos podem ter como alvo antígenos normais excessivamente expressos e proteínas teciduais. Embora em contexto patológico distinto, em trabalhos conduzidos por Butler, Furtado e colaboradores foi demonstrado que o bloqueio combinatório de PD-1 e LAG-3 acarretou em maior atividade de linfócitos Tfh, junto a maior proliferação de linfócitos B de centro germinativo e plasmócitos em camundongos infectados por *Plasmodium sp* (BUTLER et al., 2011; FURTADO et al., 2021). Curiosamente, em estudo anterior, autores demonstraram que os camundongos *knockout* LAG-3 possuíam número elevado de células B de centro germinativo, plasmócitos e linfócitos Tfh, sugerindo que a expansão de linfócitos B pode ocorrer mesmo na ausência de estimulo antigênico específico (NICOSIA et al., 2020). Considerando nossos resultados e dados emergentes, é possível que a expansão excessiva de GCs e plasmócitos em parcela dos camundongos tratados esteja relacionada à disrupção de sinais inibitórios na interface de células B:Tfh durante o processo de seleção clonal nos linfonodos. O bloqueio concomitante de PD-1 e LAG-3 na interface destas células, acarretaria então em um sinal estimulatório excessivo, de modo a potencializar a proliferação e diferenciação de clones de linfócitos B. Embora não tenhamos analisado a expressão de IgG1 em plasmócitos, a elevação deste isotipo no soro dos animais tratados sugere que os efeitos do tratamento afetam de clones específicos de linfócitos B no centro germinativo.

Apesar da elevação nos anticorpos poder ser justificada por um maior influxo de antígenos do TME para o tDLN, o que por sua vez poderia aumentar a expansão de clones de células B com expressão de IgG, esses anticorpos não foram capazes de reconhecer os antígenos das células tumorais E0771, levando-nos a acreditar que o tratamento combinatório por anti-PD-1 + anti-LAG-3 não causa expansão de clones que produzam anticorpos especificamente contra antígenos tumorais.

7. CONCLUSÃO

Coletivamente nosso estudo amplia a literatura acerca da resposta imunológica humoral elaborada em pacientes TNBC, demonstrando que além de linfócitos B naïve e plasmócitos, tumores triplo-negativo apresentam células B de centro germinativo e diferentes subtipos de linfócitos B de memória, dos quais parcela está associada a melhor prognóstico. Além disso, utilizando dados de transcritoma humanos e modelo murino demonstramos não somente a presença de linfócitos LAG-3 em órgãos linfoides secundários e no microambiente tumoral, mas, também, verificamos expressão do *immune checkpoint* em células de germinativo. Levando isto em consideração, nossos dados sugerem que novas modalidades terapêuticas podem afetar em última instância a produção de anticorpos nas pacientes.

REFERÊNCIAS

ABDOU, Y. et al. Immunotherapy in triple negative breast cancer: beyond checkpoint inhibitors. **npj Breast Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 9 nov. 2022.

AGER, E. et al. Blockade of MMP14 Activity in Murine Breast Carcinomas: Implications for Macrophages, Vessels, and Radiotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, 1 abr. 2015.

AIZIK, L. et al. Antibody Repertoire Analysis of Tumor-Infiltrating B Cells Reveals Distinct Signatures and Distributions Across Tissues. **Frontiers in Immunology**, v. 0, 2021.

ANDERSON, A. C.; JOLLER, N.; KUCHROO, V. K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 989–1004, 17 maio 2016.

ARAN, D.; HU, Z.; BUTTE, A. J. xCell: digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, 2017.

ASHOURI, J. F.; WEISS, A. Endogenous Nur77 is a specific indicator of antigen receptor signaling in human T and B cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 198, n. 2, p. 657–668, 15 jan. 2017.

BADVE, S. et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Modern Pathology**, v. 24, n. 2, p. 157–167, fev. 2011.

BALKENHOL, M. C. A. et al. Histological subtypes in triple negative breast cancer are associated with specific information on survival. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 46, p. 151490, 1 jun. 2020.

BAR, I. et al. MiR-210 Is Overexpressed in Tumor-infiltrating Plasma Cells in Triple-negative Breast Cancer: **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 1 dez. 2019.

BARROSO-SOUSA, R. et al. Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 31, n. 3, p. 387–394, 2020.

BASHO, R. K. et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway for the Treatment of Mesenchymal Triple-Negative Breast Cancer: Evidence From a Phase 1 Trial of mTOR Inhibition in Combination With Liposomal Doxorubicin and Bevacizumab. **JAMA oncology**, v. 3, n. 4, p. 509–515, 1 abr. 2017.

BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 11, p. 674–690, nov. 2016.

BIRAGYN, A.; BODOGAI, M.; LEE-CHANG, C. The central role of tumor-evoked Bregs in breast cancer metastasis as inducers of metastasis-promoting Tregs and myeloid-derived suppressive cells. (TUM4P.903). **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 1 Supplement, p. 138.4-138.4, 1 maio 2014.

BLACKLEY, E. F.; LOI, S. Targeting immune pathways in breast cancer: review of the prognostic utility of TILs in early stage triple negative breast cancer (TNBC). **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 48 Suppl 1, p. S44–S48, nov. 2019.

BRONTE, V. et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. **Nature Communications**, v. 7, p. 12150, 6 jul. 2016.

BROOKS, J. F. et al. Negative feedback by NUR77/Nr4a1 restrains B cell clonal dominance during early T-dependent immune responses. **Cell reports**, v. 36, n. 9, p. 109645, 31 ago. 2021.

BURNET, F. M. The Concept of Immunological Surveillance. **Immunological Aspects of Neoplasia**, v. 13, p. 1–27, 1970.

BURSTEIN, M. D. et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 7, p. 1688–1698, 1 abr. 2015.

BURUGU, S. et al. LAG-3+ tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer: clinical correlates and association with PD-1/PD-L1+ tumors. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 12, p. 2977–2984, 1 dez. 2017.

BUTLER, N. S. et al. Therapeutic PD-L1 and LAG-3 blockade rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. **Nature immunology**, v. 13, n. 2, p. 188–195, 11 dez. 2011.

CHU, T. et al. Cell type and gene expression deconvolution with BayesPrism enables Bayesian integrative analysis across bulk and single-cell RNA sequencing in oncology. **Nature Cancer**, v. 3, n. 4, p. 505–517, abr. 2022.

CLARK, M. R. et al. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 2, p. 69–80, fev. 2014.

COLAPRICO, A. et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 8, p. e71–e71, 5 maio 2016.

CONDAMINE, T.; MASTIO, J.; GABRILOVICH, D. I. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 6, p. 913–922, dez. 2015.

CORTES, J. et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. **Lancet (London, England)**, v. 396, n. 10265, p. 1817–1828, 5 dez. 2020.

CORTES, J. et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 3, p. 217–226, 21 jul. 2022.

COTTRELL, T. R. et al. Pathologic features of response to neoadjuvant anti-PD-1 in resected non-small-cell lung carcinoma: a proposal for quantitative immune-related pathologic response criteria (irPRC). **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 29, n. 8, p. 1853–1860, 1 ago. 2018.

CREIGHTON, C. J. et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13820–13825, 18 ago. 2009.

CRISCITIELLO, C. et al. A gene signature to predict high tumor-infiltrating lymphocytes after neoadjuvant chemotherapy and outcome in patients with triple-negative breast cancer. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 162–169, 01 2018.

CROSBY, E. J. et al. Complimentary mechanisms of dual checkpoint blockade expand unique T-cell repertoires and activate adaptive anti-tumor immunity in triple-negative breast tumors. **Oncolmmunology**, v. 7, n. 5, p. e1421891, 4 maio 2018.

DAS, S.; BAR-SAGI, D. BTK signaling drives CD1dhiCD5+ regulatory B-cell differentiation to promote pancreatic carcinogenesis. **Oncogene**, v. 38, n. 17, p. 3316–3324, abr. 2019.

DENG, L. et al. Immune Profiles of Tumor Microenvironment and Clinical Prognosis among Women with Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 28, n. 12, p. 1977–1985, 2019.

DIGHE, A. S. et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. **Immunity**, v. 1, n. 6, p. 447–456, set. 1994.

DING, G. et al. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 29877–29888, 14 ago. 2015.

DING, Q. et al. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 9, p. 3645–3656, set. 2011.

DINOME, M. L. et al. Clinicopathological Features of Triple-Negative Breast Cancer Epigenetic Subtypes. **Annals of Surgical Oncology**, v. 26, n. 10, p. 3344–3353, out. 2019.

DISIS, M. L.; STANTON, S. E. Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm. **American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting**, p. e25-30, 2015.

DU, H. et al. The co-expression characteristics of LAG3 and PD-1 on the T cells of patients with breast cancer reveal a new therapeutic strategy. **International Immunopharmacology**, v. 78, p. 106113, jan. 2020.

DUFAUD, C. R. et al. **PD-1 checkpoint blockade disrupts CD4 T cell regulated adaptive B cell tolerance to foreign antigens**. bioRxiv, , 10 jun. 2021. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.06.10.447979v1>. Acesso em: 19 jul. 2023

DUNGAN, L. S. et al. Innate IFN-γ promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for NK cells and M1 macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 10, p. 2903–2917, out. 2014.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 991–998, nov. 2002.

DUPRE', S. A.; HUNTER, K. W. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: Association with tumor-derived growth factors. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 82, n. 1, p. 12–24, 1 fev. 2007.

EMENS, L. A. et al. Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. **JAMA oncology**, v. 5, n. 1, p. 74–82, 1 jan. 2019.

ENSENYAT-MENDEZ, M. et al. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

FENG, B. et al. Cancer-associated fibroblasts and resistance to anticancer therapies: status, mechanisms, and countermeasures. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, p. 166, 29 abr. 2022.

FIGENSCHAU, S. L. et al. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 101, 6 mar. 2015.

FINAK, G. et al. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 278, 10 dez. 2015.

FLORES-BORJA, F.; BLAIR, P. Mechanisms of induction of regulatory B cells in the tumour microenvironment and their contribution to immunosuppression and pro-tumour responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 209, n. 1, p. 33–45, 1 jul. 2022.

FORERO, A. et al. Expression of the MHC Class II Pathway in Triple-Negative Breast Cancer Tumor Cells Is Associated with a Good Prognosis and Infiltrating Lymphocytes. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 5, p. 390–399, 2016.

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 116, p. 135–170, 2019.

FURTADO, R. et al. Blockade of LAG-3 in PD-L1-Deficient Mice Enhances Clearance of Blood Stage Malaria Independent of Humoral Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2021.

G, B. et al. An immune stratification reveals a subset of PD-1/LAG-3 double-positive triple-negative breast cancers. **Breast cancer research : BCR**, v. 18, n. 1, 3 dez. 2016.

GALLUZZI, L. et al. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. **Cancer Cell**, v. 28, n. 6, p. 690–714, 14 dez. 2015.

GARAUD, S. et al. Tumor infiltrating B-cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. **JCI insight**, v. 5, 13 2019.

GARCIA-LACARTE, M. et al. The PD-1/PD-L1 Checkpoint in Normal Germinal Centers and Diffuse Large B-Cell Lymphomas. **Cancers**, v. 13, n. 18, p. 4683, jan. 2021.

GARNIER, L.; GKOUNTIDI, A.-O.; HUGUES, S. Tumor-Associated Lymphatic Vessel Features and Immunomodulatory Functions. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

GAYOSO, A. et al. A Python library for probabilistic analysis of single-cell omics data. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 163–166, fev. 2022.

GEYER, F. C. et al. The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2139–2151, out. 2017.

GIL DEL ALCAZAR, C. R.; ALEČKOVIĆ, M.; POLYAK, K. Immune escape during breast tumor progression. **Cancer immunology research**, v. 8, n. 4, p. 422–427, abr. 2020.

GIL, M. et al. CD99 regulates CXCL12-induced chemotaxis of human plasma cells. **Immunology Letters**, v. 168, n. 2, p. 329–336, dez. 2015.

GIRARDI, E.; ZAJONC, D. M. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. **Immunological reviews**, v. 250, n. 1, p. 167–179, nov. 2012.

GODET, I.; GILKES, D. M. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. **Integrative cancer science and therapeutics**, v. 4, n. 1, fev. 2017.

GONG, Y. et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 1, p. 51- 64.e9, 5 jan. 2021.

GOOD-JACOBSON, K. L. et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **Nature immunology**, v. 11, n. 6, p. 535–542, jun. 2010.

GREGÓRIO, A. C. et al. Inoculated Cell Density as a Determinant Factor of the Growth Dynamics and Metastatic Efficiency of a Breast Cancer Murine Model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0165817, 7 nov. 2016.

GROENEVELD, C. S. et al. Tertiary lymphoid structures marker CXCL13 is associated with better survival for patients with advanced-stage bladder cancer treated with immunotherapy. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 148, p. 181–189, maio 2021.

GU, Y. et al. Tumor-educated B cells selectively promote breast cancer lymph node metastasis by HSPA4-targeting IgG. **Nature Medicine**, v. 25, n. 2, p. 312–322, fev. 2019.

GUNEY ESKILER, G.; OZTURK, M. Therapeutic potential of the PI3K inhibitor LY294002 and PARP inhibitor Talazoparib combination in BRCA-deficient triple negative breast cancer cells. **Cellular Signalling**, v. 91, p. 110229, mar. 2022.

GUO, S. et al. Tumour-associated macrophages heterogeneity drives resistance to clinical therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 24, p. e17, 11 abr. 2022.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022.

HAO, Y. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. **Cell**, v. 184, n. 13, p. 3573-3587.e29, 24 jun. 2021.

HARBECK, N. et al. Breast cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1–31, 23 set. 2019.

HARDEN, J. L.; EGILMEZ, N. K. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Dendritic Cell Tolerogenicity. **Immunological investigations**, v. 41, n. 0, p. 738–764, 2012.

HARRIS, R. J. et al. Tumor-Infiltrating B Lymphocyte Profiling Identifies IgG-Biased, Clonally Expanded Prognostic Phenotypes in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 81, n. 16, p. 4290–4304, 15 ago. 2021.

HELMINK, B. A. et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. **Nature**, v. 577, n. 7791, p. 549–555, jan. 2020.

HERBERMAN, R. B.; HOLDEN, H. T. Natural Cell-Mediated Immunity. Em: KLEIN, G.; WEINHOUSE, S. (Eds.). **Advances in Cancer Research**. [s.l.] Academic Press, 1978. v. 27p. 305–377.

HIGA, G. M.; FELL, R. G. Sex Hormone Receptor Repertoire in Breast Cancer. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2013, 2013.

HOLLERN, D. P. et al. B Cells and T Follicular Helper Cells Mediate Response to Checkpoint Inhibitors in High Mutation Burden Mouse Models of Breast Cancer. **Cell**, v. 179, n. 5, p. 1191- 1206.e21, 14 2019.

HORIKAWA, M. et al. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4268–4280, 1 nov. 2011.

HOURANI, T. et al. Tumor Associated Macrophages: Origin, Recruitment, Phenotypic Diversity, and Targeting. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

HSU, H.-M. et al. Six novel immunoglobulin genes as biomarkers for better prognosis in triple-negative breast cancer by gene co-expression network analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4484, 14 2019.

HU, Q. et al. Atlas of breast cancer infiltrated B-lymphocytes revealed by paired single-cell RNA-sequencing and antigen receptor profiling. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2186, 12 abr. 2021a.

HU, Q. et al. Atlas of breast cancer infiltrated B-lymphocytes revealed by paired single-cell RNA-sequencing and antigen receptor profiling. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2186, 12 abr. 2021b.

HUANG, R.-Y. et al. LAG3 and PD1 co-inhibitory molecules collaborate to limit CD8+ T cell signaling and dampen antitumor immunity in a murine ovarian cancer model. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 27359–27377, 23 jul. 2015.

HUBALEK, M.; CZECH, T.; MÜLLER, H. Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. **Breast Care**, v. 12, n. 1, p. 8–14, 2017.

HUO, J.-L. et al. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 6, p. e1792–e1792, jun. 2015.

JOHANSSON-PERCIVAL, A.; GANSS, R. Therapeutic Induction of Tertiary Lymphoid Structures in Cancer Through Stromal Remodeling. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

JOHNSTONE, C. N. et al. Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 237–251, mar. 2015.

KARN, T. et al. Tumor mutational burden and immune infiltration as independent predictors of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibition in early TNBC in GeparNuevo. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 9, p. 1216–1222, 1 set. 2020.

KASSAM, F. et al. Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. **Clinical Breast Cancer**, v. 9, n. 1, p. 29–33, fev. 2009.

KATZ, S. I.; PARKER, D.; TURK, J. L. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. **Nature**, v. 251, n. 5475, p. 550–551, out. 1974.

KISIELOW, M. et al. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 7, p. 2081–2088, jul. 2005.

KNAB, V. M. et al. Triple-negative breast cancer cells rely on kinase-independent functions of CDK8 to evade NK-cell-mediated tumor surveillance. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 11, p. 1–12, 23 out. 2021.

KNIER, B. et al. Myeloid-derived suppressor cells control B cell accumulation in the central nervous system during autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1341–1351, dez. 2018.

KOYAMA, S. et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. **Nature Communications**, v. 7, p. 10501, 17 fev. 2016.

KURODA, H. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating B lymphocytes and plasma cells in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer**, v. 28, n. 4, p. 904–914, 1 jul. 2021.

LA CAVA, A.; VAN KAER, L.; FU-DONG-SHI, NULL. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 7, p. 322–327, jul. 2006.

LAM, W. Y.; BHATTACHARYA, D. Metabolic Links between Plasma Cell Survival, Secretion, and Stress. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 19–27, 2018.

LAUMONT, C. M. et al. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. **Nature reviews. Cancer**, v. 22, n. 7, p. 414–430, jul. 2022.

LECHNER, M. G. et al. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, v. 36, n. 9, p. 477–489, 2013.

LEE, H. J. et al. Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 5, p. 422–430, maio 2016.

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**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 1 jul. 2011.

LEHMANN, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PloS One**, v. 11, n. 6, p. e0157368, 2016.

LELIS, F. J. N. et al. Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses. **Immunology Letters**, v. 188, p. 108–115, ago. 2017.

LI, F. et al. Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 19, n. 8, p. 695–705, 3 ago. 2018.

LI, L. et al. Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer: Combination Strategies to Improve Outcome. **Cancers**, v. 15, n. 1, p. 321, 3 jan. 2023.

LI, Q. et al. Adoptive transfer of tumor reactive B cells confers host T-cell immunity and tumor regression. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 15, p. 4987–4995, 1 ago. 2011.

LI, Y. et al. Cellular heterogeneity map of diverse immune and stromal phenotypes within breast tumor microenvironment. **PeerJ**, v. 8, p. e9478, 10 jul. 2020.

LI, Y. et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 121, 29 ago. 2022.

LIAO, H.-Y. et al. The Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Different Histological Subtypes in Triple-negative Breast Cancer. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 2, p. 296–303, 1 jan. 2018.

LINO, A. C. et al. LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. **Immunity**, v. 49, n. 1, p. 120- 133.e9, 17 jul. 2018.

LIU, C. et al. ALDH1A1 Activity in Tumor-Initiating Cells Remodels Myeloid-Derived Suppressor Cells to Promote Breast Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 81, n. 23, p. 5919–5934, 1 dez. 2021a.

LIU, H. et al. MDSCs in breast cancer: an important enabler of tumor progression and an emerging therapeutic target. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023.

LIU, J. et al. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 389, 21 jul. 2021b.

LIU, M. et al. Macrophages Support Splenic Erythropoiesis in 4T1 Tumor-Bearing Mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121921, 30 mar. 2015.

LIU, Q. et al. Molecular and Clinical Characterization of LAG3 in Breast Cancer Through 2994 Samples. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021c.

LIU, R. et al. MicroRNAs 15A and 16-1 Activate Signaling Pathways That Mediate Chemotaxis of Immune Regulatory B cells to Colorectal Tumors. **Gastroenterology**, v. 154, n. 3, p. 637- 651.e7, fev. 2018.

LIU, Y.-R. et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. **Breast cancer research: BCR**, v. 18, n. 1, p. 33, 15 mar. 2016.

LONG, L. et al. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. **Genes & Cancer**, v. 9, n. 5–6, p. 176–189, maio 2018a.

LONG, L. et al. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. **Genes & Cancer**, v. 9, n. 5–6, p. 176–189, maio 2018b.

LOUIE, D. A. P. et al. Tumor-Draining Lymph Node Reconstruction Promotes B Cell Activation During E0771 Mouse Breast Cancer Growth. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 825287, 2022.

LU, T. et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 10, p. 4015–4029, out. 2011.

ŁUKASIEWICZ, S. et al. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4287, 25 ago. 2021.

LV, Y. et al. Immune Cell Infiltration-Based Characterization of Triple-Negative Breast Cancer Predicts Prognosis and Chemotherapy Response Markers. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 2021.

MALLA, R. R. et al. Regulatory T cells: Their role in triple-negative breast cancer progression and metastasis. **Cancer**, v. 128, n. 6, p. 1171–1183, 15 mar. 2022.

MANARA, M. C.; PASELLO, M.; SCOTLANDI, K. CD99: A Cell Surface Protein with an Oncojanus Role in Tumors. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 159, mar. 2018.

MAO, H. et al. Colorectal tumors are enriched with regulatory plasmablasts with capacity in suppressing T cell inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 49, p. 95–101, 1 ago. 2017.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; LISANTI, M. P.; SOTGIA, F. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. **Seminars in Cancer Biology**, v. 25, p. 47–60, abr. 2014.

MASUDA, H. et al. Reverse phase protein array identification of triple-negative breast cancer subtypes and comparison with mRNA molecular subtypes. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 70481–70495, 31 jul. 2017.

MATSUZAKI, J. et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 17, p. 7875–7880, 27 abr. 2010.

MESIN, L. et al. Restricted Clonality and Limited Germinal Center Reentry Characterize Memory B Cell Reactivation by Boosting. **Cell**, v. 180, n. 1, p. 92- 106.e11, 9 jan. 2020.

MEYERS, J. H. et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1–TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. **Nature Immunology**, v. 6, n. 5, p. 455–464, maio 2005.

MILLRUD, C. R.; BERGENFELZ, C.; LEANDERSSON, K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 3649–3665, 27 set. 2016.

MING, Q. et al. LAG3 ectodomain structure reveals functional interfaces for ligand and antibody recognition. **Nature Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1031–1041, jul. 2022.

MIRLEKAR, B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF-β, IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. **SAGE Open Medicine**, v. 10, p. 20503121211069012, 1 jan. 2022.

MITTENDORF, E. A. et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. **Lancet (London, England)**, v. 396, n. 10257, p. 1090–1100, 10 out. 2020.

MIZOGUCHI, A. et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 219–230, fev. 2002.

MOHAN, N. et al. Atezolizumab potentiates Tcell-mediated cytotoxicity and coordinates with FAK to suppress cell invasion and motility in PD-L1+ triple negative breast cancer cells. **Oncoimmunology**, v. 8, n. 9, p. e1624128, 6 jun. 2019.

MOHIB, K. et al. Antigen-dependent interactions between regulatory B cells and T cells at the T:B border inhibit subsequent T cell interactions with DCs. **American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 20, n. 1, p. 52–63, jan. 2020.

MUHAMMAD, N. et al. Bitter melon extract inhibits breast cancer growth in preclinical model by inducing autophagic cell death. **Oncotarget**, v. 8, n. 39, p. 66226–66236, 3 ago. 2017.

NAM, S. et al. Analysis of the Expression and Regulation of PD-1 Protein on the Surface of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs). **Biomolecules & Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 63–70, 1 jan. 2019.

NANDA, R. et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 34, n. 21, p. 2460–2467, 20 jul. 2016.

NAPIER, T. S. et al. Molecular Imaging of Oxygenation Changes during Immunotherapy in Combination with Paclitaxel in Triple Negative Breast Cancer. **Biomedicines**, v. 11, n. 1, p. 125, 4 jan. 2023.

NEDELJKOVIĆ, M.; DAMJANOVIĆ, A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. **Cells**, v. 8, n. 9, 22 2019.

NEWMAN, A. M. et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 773–782, jul. 2019.

NICOSIA, M. et al. Recipient LAG3 deficiency results in antibody-mediated rejection of mouse renal allografts. **The Journal of Immunology**, v. 204, n. 1_Supplement, p. 161.2-161.2, 1 maio 2020.

NOVINGER, L. J.; ASHIKAGA, T.; KRAG, D. N. Identification of tumor-binding scFv derived from clonally related B cells in tumor and lymph node of a patient with breast cancer. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 64, n. 1, p. 29–39, jan. 2015.

OLKHANUD, P. B. et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting $CD4^+$ T cells to T-regulatory cells. **Cancer Research**, v. 71, n. 10, p. 3505–3515, 15 maio 2011.

O'MELIA, M. J.; MANSPEAKER, M. P.; THOMAS, S. N. Tumor-draining lymph nodes are survival niches that support T cell priming against lymphatic transported tumor antigen and effects of immune checkpoint blockade in TNBC. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 70, n. 8, p. 2179–2195, ago. 2021.

OUZOUNOVA, M. et al. Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. **Nature Communications**, v. 8, p. 14979, 6 abr. 2017.

PARK, C. K. et al. High CD99 expression in memory T and B cells in reactive lymph nodes. **Journal of Korean Medical Science**, v. 14, n. 6, p. 600–606, dez. 1999.

PARK, I. A. et al. Expression of the MHC class II in triple-negative breast cancer is associated with tumor-infiltrating lymphocytes and interferon signaling. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0182786, 2017.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 17 ago. 2000.

PETITPREZ, F. et al. The Tumor Microenvironment in the Response to Immune Checkpoint Blockade Therapies. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 784, 7 maio 2020.

PILLAI, A. B. et al. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. **Blood**, v. 113, n. 18, p. 4458–4467, 30 abr. 2009.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5–23, fev. 2011.

QIAN, B.-Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2 abr. 2010.

QIN, Y. et al. Tumor-infiltrating B cells as a favorable prognostic biomarker in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 310, 12 jun. 2021.

QIU, S.-Q. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? **Cancer Treatment Reviews**, v. 70, p. 178–189, nov. 2018.

QUATROMONI, J. G.; ERUSLANOV, E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. **American Journal of Translational Research**, v. 4, n. 4, p. 376–389, 10 out. 2012.

REN, Y. et al. Rationale and Clinical Research Progress on PD-1/PD-L1-Based Immunotherapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 8878, 10 ago. 2022.

RENNERT, P. D. Novel roles for TIM-1 in immunity and infection. **Immunology Letters**, v. 141, n. 1, p. 28–35, 30 dez. 2011.

ROARK, J. H. et al. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 160, n. 7, p. 3121–3127, 1 abr. 1998.

ROBSON, M. E. et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 30, n. 4, p. 558–566, 1 abr. 2019.

RODRIGUEZ, A. B. et al. Immune mechanisms orchestrate tertiary lymphoid structures in tumors via cancer-associated fibroblasts. **Cell reports**, v. 36, n. 3, p. 109422, 20 jul. 2021.

ROSSER, E. C.; MAURI, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 607–612, 21 abr. 2015.

ROTTE, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 38, p. 255, 13 jun. 2019.

SÁNCHEZ-ALONSO, S. et al. A new role for circulating T follicular helper cells in humoral response to anti-PD-1 therapy. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 8, n. 2, p. e001187, 7 set. 2020.

SANTA-MARIA, C. A. et al. Durvalumab and tremelimumab in metastatic breast cancer (MBC): Immunotherapy and immunopharmacogenomic dynamics. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 15_suppl, p. 3052–3052, 20 maio 2017.

SANTOS, M. DE O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023.

SAUTÈS-FRIDMAN, C. et al. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. **Nature Reviews. Cancer**, v. 19, n. 6, p. 307–325, 2019.

SCHMID, P. et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet. Oncology**, v. 21, n. 1, p. 44–59, jan. 2020a.

SCHMID, P. et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 9, p. 810–821, 27 fev. 2020b.

SCHMIDT, M. et al. Prognostic impact of CD4-positive T cell subsets in early breast cancer: a study based on the FinHer trial patient population. **Breast cancer research: BCR**, v. 20, n. 1, p. 15, 26 2018.

SCHRÖRS, B. et al. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020.

SEOW, D. Y. B. et al. Tertiary lymphoid structures and associated plasma cells play an important role in the biology of triple-negative breast cancers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 180, n. 2, p. 369–377, abr. 2020.

SEVMIS, M. et al. Splenectomy-Induced Leukocytosis Promotes Intratumoral Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells, Angiogenesis and Metastasis. **Immunological Investigations**, v. 46, n. 7, p. 663–676, 3 out. 2017.

SHAH, S. P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 395–399, 4 abr. 2012.

SHALEV, I. et al. Making Sense of Regulatory T Cell Suppressive Function. **Seminars in immunology**, v. 23, n. 4, p. 282–292, ago. 2011.

SHANKAR, S. et al. Ex vivo-expanded human CD19+TIM-1+ regulatory B cells suppress immune responses in vivo and are dependent upon the TIM-1/STAT3 axis. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3121, 3 jun. 2022.

SHEN, M. et al. A novel MDSC-induced PD-1 $^{-}$ PD-L1 $^{+}$ B-cell subset in breast tumor microenvironment possesses immuno-suppressive properties. **OncoImmunology**, v. 7, n. 4, p. e1413520, 3 abr. 2018.

SHEN, M.; WANG, J.; REN, X. New Insights into Tumor-Infiltrating B Lymphocytes in Breast Cancer: Clinical Impacts and Regulatory Mechanisms. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 8 mar. 2018.

SHI, N. et al. PD-1/LAG-3 bispecific antibody potentiates T cell activation and increases antitumor efficacy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

SIEGEL, R. M. et al. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 1, n. 6, p. 469–474, dez. 2000.

SOLINAS, C. et al. Immune Checkpoint Molecules on Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Association with Tertiary Lymphoid Structures in Human Breast Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1412, 2017a.

SOLINAS, C. et al. Targeting immune checkpoints in breast cancer: an update of early results. **ESMO Open**, v. 2, n. 5, p. e000255, 14 nov. 2017b.

SOLINAS, C. et al. BRCA gene mutations do not shape the extent and organization of tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancer. **Cancer Letters**, v. 450, p. 88–97, 28 2019.

SONG, I. H. et al. Predictive Value of Tertiary Lymphoid Structures Assessed by High Endothelial Venule Counts in the Neoadjuvant Setting of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 49, n. 2, p. 399–407, abr. 2017.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**, v. 82, n. 3–4, p. 142–152, 2015.

SRIVASTAVA, M. K. et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. **Cancer Research**, v. 70, n. 1, p. 68–77, 1 jan. 2010.

STEWART, R. L. et al. Spatially-resolved quantification of proteins in triple negative breast cancers reveals differences in the immune microenvironment associated with prognosis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 6598, 20 abr. 2020.

TAHTACI, G. et al. LAG-3 expression in tumor microenvironment of triple-negative breast cancer. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 53, n. 1, p. 142–148, fev. 2023.

TAKAI, K. et al. Targeting the cancer-associated fibroblasts as a treatment in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 82889–82901, 14 out. 2016.

TAN, C. et al. Self-reactivity on a spectrum: A sliding scale of peripheral B cell tolerance. **Immunological Reviews**, v. 292, n. 1, p. 37–60, nov. 2019.

TANG, A. et al. B cells promote tumor progression in a mouse model of HPV-mediated cervical cancer. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 6, p. 1358–1371, 15 set. 2016.

TAO, H. et al. Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. **European journal of immunology**, v. 45, n. 4, p. 999–1009, abr. 2015.

TELLIER, J.; NUTT, S. L. Standing out from the crowd: How to identify plasma cells. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 8, p. 1276–1279, 2017.

THOMAS, L. On immunosurveillance in human cancer. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 55, n. 3–4, p. 329–333, 1982.

TIE, Y. et al. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 61, 18 maio 2022.

TRAAG, V. A.; WALTMAN, L.; VAN ECK, N. J. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5233, 26 mar. 2019.

TRAVIS, R. C.; KEY, T. J. Oestrogen exposure and breast cancer risk. **Breast Cancer Research : BCR**, v. 5, n. 5, p. 239–247, 2003.

TRIEBEL; JITSUKAWA; BAIXERAS. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 5, p. 1393–1405, 1 maio 1990.

VALENCIA, G. A. et al. Immunotherapy in triple-negative breast cancer: A literature review and new advances. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 3, p. 219–236, 24 mar. 2022.

VICTORA, G. D.; NUSSENZWEIG, M. C. Germinal Centers. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 429–457, 23 abr. 2012.

VICTORA, G. D.; NUSSENZWEIG, M. C. Germinal Centers. **Annual Review of Immunology**, v. 40, n. 1, p. 413–442, 26 abr. 2022.

VITO, A. et al. Combined Radionuclide Therapy and Immunotherapy for Treatment of Triple Negative Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4843, 3 maio 2021.

WANG, D.-Y. et al. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19107, 13 dez. 2019.

WANG, M. et al. Identification of Cancer-Associated Fibroblast Subtype of Triple-Negative Breast Cancer. **Journal of Oncology**, v. 2022, p. 6452636, 23 abr. 2022.

WEI, Y.; LI, Z. LAG3-PD-1 Combo Overcome the Disadvantage of Drug Resistance. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022.

WESOLOWSKI, J.; TANKIEWICZ-KWEDLO, A.; PAWLAK, D. Modern Immunotherapy in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancers**, v. 14, n. 16, p. 3860, 10 ago. 2022.

WISHNIE, A. J. et al. BCR Affinity Influences T-B Interactions and B Cell Development in Secondary Lymphoid Organs. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

WOO, S.-R. et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. **Cancer Research**, v. 72, n. 4, p. 917–927, 15 fev. 2012.

WU, L.; CHEN, L. Characteristics of Nur77 and its ligands as potential anticancer compounds. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 6, p. 4793–4801, dez. 2018.

WU, S. Z. et al. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. **Nature Genetics**, v. 53, n. 9, p. 1334–1347, set. 2021.

XIAO, X. et al. PD-1hi Identifies a Novel Regulatory B-cell Population in Human Hepatoma That Promotes Disease Progression. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 5, p. 546–559, maio 2016.

XU, C. et al. Probabilistic harmonization and annotation of single-cell transcriptomics data with deep generative models. **Molecular Systems Biology**, v. 17, n. 1, p. e9620, jan. 2021.

XU, Y. et al. Astilbin combined with lipopolysaccharide induces IL-10-producing regulatory B cells via the STAT3 signalling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 129, p. 110450, set. 2020.

YANG, Y. et al. Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. **Oncotarget**, v. 8, n. 19, p. 30621–30643, 9 maio 2017.

YE, L. et al. Tumor-derived exosomal HMGB1 fosters hepatocellular carcinoma immune evasion by promoting TIM-1+ regulatory B cell expansion. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 6, n. 1, p. 145, 10 dez. 2018.

YEONG, J. et al. High Densities of Tumor-Associated Plasma Cells Predict Improved Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1209, 2018.

ZAHM, C. D. et al. PD-1 and LAG-3 blockade improve anti-tumor vaccine efficacy. **Oncoimmunology**, v. 10, n. 1, p. 1912892, [s.d.].

ZHANG, L. et al. The predictive and prognostic value of Foxp3+/CD25+ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 40, p. 143–151, jun. 2019.

ZHANG, N.-N. et al. Prognostic impact of tertiary lymphoid structures in breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 536, 15 out. 2021.

ZHANG, Y. et al. Recycling of memory B cells between germinal center and lymph node subcapsular sinus supports affinity maturation to antigenic drift. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 2460, 5 maio 2022.

ZHONG, W. et al. Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse syngeneic models with human tumors. **BMC Genomics**, v. 21, p. 2, 2 jan. 2020.

ZHOU, J. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Correlate with Tumor-Associated Macrophages Infiltration and Lymphatic Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Patients. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 24, p. 4635–4641, 24 nov. 2018.

ZHOU, J. et al. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020.

ZIKHERMAN, J.; PARAMESWARAN, R.; WEISS, A. Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 160–164, 6 set. 2012.

ZOU, J. et al. Tertiary Lymphoid Structures: A Potential Biomarker for Anti-Cancer Therapy. **Cancers**, v. 14, n. 23, p. 5968, 2 dez. 2022.

ANEXO

Dynamic Changes in B Cell Subpopulations in Response to Triple-Negative Breast Cancer Development

Igor Visconte Gonçalves [1] Natália Pinheiro-Rosa [2], Lícia Torres [1], Mariana de Almeida Oliveira [1], Gabriela Rapozo Guimarães [4] Christiana da Silva Leite [1], José Miguel Ortega [1], Miriam Teresa Paz Lopes [3], Ana Maria Caetano Faria [1], Mariana Boroni [4], Liza Figueiredo Felicori [1*]

[1] Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

[2] NYU Grossman School of Medicine, New York University, New York City, United States of America

[3] Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

[4] Laboratory of Bioinformatics and Computational Biology, Division of Experimental and Translational Research, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, , Brazil

* Author for correspondence Liza F. Felicori: liza@icb.ufmg.br

Abstract

Despite presenting a worse prognosis and being associated with highly aggressive tumors, triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the higher frequency of tumor-infiltrating lymphocytes, which have been implicated in better overall survival and response to therapy. Though recent studies have reported the capacity of B lymphocytes to recognize overly-expressed normal proteins, and tumor-associated antigens, how tumor development potentially modifies B cell response is yet to be elucidated. Our findings reveal distinct effects of 4T1 and E0771 murine tumor development on B cells in secondary lymphoid organs. Notably, we observe a significant expansion of total B cells and plasma cells in the tumor-draining lymph nodes (tDLNs) as early as 7 days after tumor challenge in both murine models, whereas changes in the spleen are less pronounced. Surprisingly, within the tumor microenvironment (TME) of both models, we detect distinct B cell subpopulations, but tumor development does not appear to cause major alterations in their frequency over time. Furthermore, our investigation into B cell regulatory phenotypes highlights that the B10 Breg phenotype remains unaffected in the evaluated tissues. Most importantly, we identified an increase in CD19+ LAG-3+ cells in tDLNs of both murine models. Interestingly, although CD19+ LAG-3+ cells represent a minor subset of total B cells (< 3%) in all evaluated tissues, most of these cells exhibit elevated expression of IgD, suggesting that LAG-3 may serve as an activation marker for B cells. Corroborating with these findings, we detected distinct cell cycle and proliferation genes alongside LAG-3+ analyzing scRNA-Seq data from a pan-cancer cohort. More importantly, our study suggests that the presence of LAG-3+ B cells in TNBC patients is associated with a good prognosis, with higher levels of LAG-3+ B cell subset associated with longer progression-free interval rates. This novel insight could pave the way for targeted therapies that harness the unique properties of LAG-3+ B cells, potentially offering new avenues for improving patient outcomes in TNBC. Further research is warranted to unravel the mechanistic pathways of these cells and to validate their prognostic value in larger, diverse patient cohorts.

Keywords: Triple-negative breast cancer, B LAG-3, B-TIL, humoral immune response, tumor-infiltrating lymphocytes, 4T1, E0771.

Introduction

Despite comprising a minority of breast cancer diagnoses, triple-negative breast cancer (TNBC) is considered one of the worse types, as these tumors lack expression of estrogen (ER), progesterone (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), limited therapeutic options are available, and patients are often treated with to chemo- and radiotherapy [1]. Although affecting younger women and characterized by highly aggressive tumors, in recent years, it has been demonstrated that triple-negative tumors have a more pronounced immune response compared to the other types of the disease, presenting a higher frequency of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) [2,3]. Albeit standardization of TIL evaluation is still debated, distinct researchers observed better overall survival (OS) among patients with elevated lymphocytic infiltration. Moreover, higher TIL proportions in breast tumors have predicted a better response to anthracycline/taxane-based chemotherapies in both neoadjuvant and adjuvant therapy settings [4–6], therapeutic regimens that are frequently implemented in Brazil for the treatment of breast cancer patients [7].

Although promising results have emerged from recent studies, TIL encompasses distinct cell populations, and further characterization of the individual components is required for a better understanding of the disease dynamic, as well as their individual impact on carcinogenesis [5]. Despite the elevated heterogeneity in triple-negative tumors, studies demonstrate that TCD4 and TCD8 cells are the predominant lymphocyte population in the tumor microenvironment, usually found in direct contact with tumor cells or residing in stromal areas surrounding cancer cell islands [2,8]. Authors demonstrate that higher infiltration of T cells is associated with a good prognosis, showing the cooperative action between CD4 and CD8 phenotypes in controlling tumor expansion [9–11]. Additionally, TCD4-secreted cytokines (IFN-ɣ, TNF-α and IL-2) majorly contribute to the activation of macrophages, dendritic, and NK cells, which collectively enhances anti-tumoral immune response [12]. Although higher lymphocyte infiltration is a positive finding, pro-tumoral Treg profiles are also detected in the tumor microenvironment (TME), and can significantly contribute to dampening the immune response through different mechanisms [13]. It's been demonstrated that these cells can impair the activation of antigen-presenting cells through immune checkpoint signaling (TIM-3, VISTA, CTLA-4), prevent activation and proliferation of effector T cells, as well as secreting immune suppressive cytokines (IL-10, IL-35, TGF-β). Additionally, it's been established that Tregs can promote neovasculature formation, which contributes to tumor expansion and establishment of metastasis [14,15].

While major progress has been achieved in understanding the role of distinct T cell subpopulations, studies demonstrate that B cells can also be found in the TME. Albeit capable of recognizing mutated proteins and producing antibodies against tumor-associated antigens [16], the overall impact of B lymphocytes on breast tumors is still debated. Although conducted in different clinical settings, authors emphasize the importance of B cells in controlling tumor development, showing a longer disease-free survival (DFS) in patients presenting higher levels of TIL-Bs, as well as elevated CD20 in sentinel lymph nodes [17–19]. Additionally, in transcriptome data analysis, B-cell signatures in breast tumor samples have been associated with improved survival [19]. Oppositely, others argue that B cells can contribute to tumor progression. One study demonstrated a positive association between the density of B cells and high histological-grade tumors [20]. Moreover, other studies showed a shorter recurrence-free survival (RFS) in patients with B-cell and antibody-secreting cells (ASCs) infiltrates [21,22].

Intriguingly, in recent years some authors have proposed that regulatory B cells (Bregs) may also contribute to the disease progression [23]. Early studies demonstrate that Bregs can emerge from distinct B cell subsets and are capable of inhibiting other immune cell and pro-inflammatory pathways [24,25]. Although B10 cells comprise one of the mainly studied Bregs, other populations with distinct surface markers have been revealed [26]. Known for its homology to the CD4 receptor, LAG-3 is usually expressed on early-activated T cells and FoxP3+ Tregs, and upon interaction with its ligand – mostly MHC-II molecules, it inhibits the activation of the targeted cell [27,28]. Interestingly, Lino and colleagues [29] identified a subset of plasma cells expressing LAG-3 and elevated IL-10 expression. Despite the production of IL-10, IL-35, and TGF-β being proposed to be the main mechanism of immune suppression, others suggest that Bregs can promote the differentiation of effector T cells in Tregs, as well as affect TNF-α production in monocytes [30,31]. Although detection of these regulatory profiles has been associated with worse prognosis in gastric and hepatocellular carcinomas [32,33], the impact of these populations remains to be evaluated in breast tumors. While distinct Breg phenotypes have been proposed, the lack of cell-specific transcriptional factors, as well as differences between mice and humans poses a challenge in understanding this potential new B cell subpopulation [31].

Despite the promising emerging results, the dynamic of tumor-infiltrating B lymphocytes remains a challenge, as these populations are presented in lower frequency and are laborious to retrieve. Furthermore, most studies are conducted in advanced tumor or treatment settings, making it difficult to understand the impact of earlier carcinogenic events in these cells. Considering the capacity of tumor cells to modulate the immune response in the tumor microenvironment and relatively sparse literature about B cells in breast tumors, we assessed the impact of 4T1 and E0771 murine breast tumor development on the B cell compartment and regulatory surface markers in secondary lymphoid organs and the TME. Additionally, we extend our research to validate the occurrence of rare B cell subsets within a TNBC cohort and examine their correlation with patient survival outcomes.

Materials and Methods

Cell lines

4T1 (ATCC, CRL- 2539) and E0771 (CH3 Biosystems, 94001) cell lines were kindly donated by Dra. Miriam Lopes and Dra. Catarina Raposo Dias Carneiro from the Institute of Biological Sciences at the Federal University of Minas Gerais/MG, and the Faculty of Pharmaceutical Sciences at the. State University of Campinas/SP, respectively. 4T1 and E0771 cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% Streptomycin/Penicillin (Gibco), and kept at 37°C and 5% CO2 incubator. The cell culture medium was replenished every two or three days, and cell lines were subcultured when cells achieved 70% confluence.

Animals

Wild-type BALB/c and C57BL/6 mice (8 to 10 weeks old female) were obtained from Central Bioterium (ICB/UFMG). The mice were housed under specific pathogen-free conditions at

the Laboratory of Immunology (ICB/UFMG), with free access to food and water. All studies were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA/UFMG 215 / 2018).

Breast cancer model

Mycoplasma-free 4T1 and E0771 tumor cells were resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen), and $5x10^5$ cells were injected (s.c.) in the mammary fat pad of BALB/c and C57BL/6 female mice, respectively. As for the control group, mice received an injection (s.c.) of sterile PBS. After initial inoculation, mice were monitored twice a week for tumor development. After achieving the corresponding period of analysis (7, 14, and 21 days after the tumoral challenge), mice were euthanized, and the spleen, inguinal lymph nodes, and tumor were surgically removed and processed for further analysis. Tumors were measured with a digital caliper. Tumor volume (V) was calculated based on the following formula: $V = (W)^2 \times L \times 3.14 / 6$; W is width, and L is length. Spleen and tDLN organ area was calculated using ImageJ, and the fold change was calculated as it follows: (Tumor group average organ area ÷ Control group average organ area). Lymph nodes, spleen, and tumors were weighted and the area was calculated using ImageJ software. Each experiment was performed twice. tDLN/Spleen sample number (n = 5 to 6), Tumor sample number (total n = 9, each datapoint represents a pool of 3).

Flow Cytometry

Surgically excised tumors were minced using scissors in non-supplemented RPMI media on ice. Tumors pieces were resuspended in 4 mL of RPMI medium and transferred to a 15-mL conical tube containing 3 mL of Ficoll-Paque 1.084 and subsequently centrifuged for 40 minutes at RT. Cells were washed twice with 10 mL 1X PBS to remove potential contaminants. Tumor single cells were suspended in 0.5 mL of 1X PBS. Spleen and tDLN single-cell suspensions were obtained by grinding the tissue against a well of a 24-well plate with a syringe thumb rest on ice. Cells were transferred to a 15-mL conical tube containing 5 mL of RPMI medium and centrifuged at 1500 RPM for 5 minutes at 4°C. tDLN samples were resuspended in 0.5 mL PBS, while spleen samples were vigorously resuspended in 9 mL of distilled water for 10 seconds, followed by the addition of 1 mL of 10X PBS for red blood cell lysis, adapted method from previous work [34]. After centrifugation at 1500 RPM for 5 minutes at 4°C, spleen samples were suspended in 1 mL of 1X PBS. After dead cells assessment by trypan blue cell viability assay, $1x10^6$ cells were added to a 96-well plate, centrifuged (1500 RPM, 4°C), and incubated in viability dye and Fc blocker (1:1000, 0.01 µg/µL in PBS, respectively) for 30 minutes at RT. Cells were centrifuged, washed, and incubated with antibodies according to the manufacturer's instructions. Cells were acquired in FACSFortessa and all analysis were conducted in FlowJo v.10 software. Cellular populations were evaluated through two distinct flow cytometry panels (PN), with the first one used to asses myeloid and lymphoid cells, while the second panel was focused on analyzing the B cell compartment. Correspondent gating strategy for each panel is described as followed. **PN1 (supplementary figure S1-a):** Total cells selected based on FSC-A and SSC-A > selection of single cells > total live leukocytes CD45+. For myeloid cell subpopulations: total myeloid cell based on CD11b+ expression and SSC-H > discrimination of mononuclear (Ly-6C+ Ly-6G-) and polymorphonuclear (Ly-6Clow- Ly-6G+). For lymphoid

cell subpopulations: discrimination of B (CD19+) and T (CD3+) lymphocytes > discrimination of cytotoxic (TCD8+) and helper (CD4+) T cells. **PN2 (supplementary figure S1-a):** Total cells selected based on FSC-A and SSC-A > selection of single cells > total live leukocytes CD45+. For plasma cells: CD138+ and CD19$^{+/-}$ expression. For Pro-B10 B cells: CD19+ CD5+ CD1d+. For Naive and early-activated B cells: CD19+ IgD^{high}, and CD19+ IgD$^{int\text{-}low}$. For LAG-3+ B cells: CD19+ LAG-3+. For Naive and early-activated LAG-3+ B cells: CD19+ LAG-3+ IgD^{high}, and CD19+ LAG-3+ IgD$^{int\text{-}low}$. For LAG-3 plasma cells: LAG-3+ CD138+. All associated fluorochromes are described in Table 1.

Table 1. Antibodies Employed for Flow Cytometry Analysis in this Study*

Reagent or Resource	Dilution	Source	Identifier
Antibodies			
Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD4	1:200 / PN1	Biolegend	100437
FITC anti-mouse CD45	1:300 / PN1	Biolegend	103108
PE-CF594 Hamster anti-mouse CD3e	1:200 / PN1	BD	562332
PE-Cy™7 Rat anti-mouse Ly-6C	1:200 / PN1	BD	560593
PE Rat anti-mouse CD19	1:300 / PN1	BD	557399
PerCP-Cy™5.5 Rat anti-CD11b	1:300 / PN1	BD	561114
APC anti-mouse CD8a	1:100 / PN1	Biolegend	100712
APC-Cy™7 anti-mouse Ly-6G	1:200 / PN1	Biolegend	127624
Pacific Blue™ anti-mouse CD1d	1:100 / PN2	Biolegend	123517
FITC Rat anti-mouse CD5	1:100 / PN2	BD	553021
PE-Dazzle™594 anti-mouse CD223 (LAG-3)	1:100 / PN2	Biolegend	125224
PE-Cy™7 anti-mouse CD138	1:100 / PN2	Biolegend	142514
PE anti-mouse IgD	1:300 / PN2	Biolegend	405706
PE-Cy™5 Rat anti-mouse CD19	1:300 / PN2	Invitrogen	15-0193-81
Alexa Fluor® 700 Rat anti-mouse CD45	1:300 / PN2	BD	560510
LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit	-	Invitrogen	L34959

*The tDLNs and spleen from E0771 and 4T1 tumor models were evaluated using two distinct flow cytometry panels (PN1, PN2). Tumor samples were assessed only through panel II due to sample restriction. All antibodies were diluted in a cooled PBS solution.

Single-cell RNA-seq Data Acquisition

We utilized an integrated dataset encompassing single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and annotated data pertaining to a diverse array of cell types derived from seven distinct cancer types. These included both uveal and skin melanomas, alongside lung, colorectal, liver, ovarian, and breast cancers (including samples from TNBC, HER2, Luminal A and B, and normal tissue) [35]. B lymphocytes were identified by the expression of key markers such

as *CD79A/B*, *MS4A1*, and *MZB1*. In order to identify B cells subpopulations, we computed a set of 3,000 genes exhibiting high variability correcting for batch effects (i.e. sample donor, study, and technique), followed by integration using the scVI algorithm [36] from the scvi-tools library (v1.1.0) [37]. The resulting latent space was then translated into a more interpretable 2-dimensional space using the Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) [38] technique. For the clustering of cells, we employed the Leiden algorithm exploring various resolution parameters ranging from 0.3 to 1. We specifically set the Leiden resolution to 0.7 to achieve an optimal balance between granularity and cluster coherence. To further refine our understanding of B cell subpopulations, we did a manual annotation by scrutinizing canonical markers and their associations with differentially expressed genes (DEGs), as revealed by the Model-based Analysis of Single-Cell Transcriptomics (MAST) algorithm using the FindAllMarkers() function of Seurat (v 4.3.0) [39,40]. We selected the top hundred genes identified in the analysis of DEGs, sorting them by the log fold change for each cluster. These genes were then used for functional enrichment analysis with the Reactome database using the clusterProfiler package. We considered pathways with a p-adjusted value ≤ 0.05 as significant.

Digital Cytometry

To investigate the clinical impact of B LAG3^{+} subpopulation, we downloaded bulk RNA-Seq and clinicopathological data from the breast cancer cohort of The Cancer Genome Atlas (TCGA) database defined as TNBC using the TCGAbiolinks package (v.3.17) [41]. Our approach involved estimating the proportions of cellular subtypes identified in our scRNA-Seq analysis within these bulk RNA-Seq samples. We employed the BayesPrism digital cytometry tool (v2.1) [42] for this deconvolution, using cellular signatures identified in breast cancer tumors. We considered 45 cellular signatures, including fibroblasts, endothelial cells, mast cells, plasmacytoid dendritic cells, malignant cells, normal breast cells, macrophages (n = 12), monocytes (n = 6), conventional dendritic cells (n = 8), T cells (n = 9), NK cells (n = 2), neutrophils (n = 3), previously determined in addition to the B lymphocytes subpopulations (n = 5) characterized here. Genes expressed in fewer than 5 cells, ribosomal genes, mitochondrial genes, X and Y chromosome-linked genes, and the MALAT gene were removed using the *cleanup.genes()* function. Afterward, to obtain more consistent results, we filtered protein-coding genes and used the *get.exp.stat()* function to select differentially expressed genes between cellular states of different cell types using default parameters, except for the pseudo-count parameter set to 0.1, as the data were predominantly from 10x. The default parameters of the *new.prism()* function was applied, using tumor cells as a reference.

Statistical Analysis

Numeric data were presented as mean ± standard deviation. Normally distributed data were analyzed by Student t-test (two groups) or one-way ANOVA (more than two groups) with the Tukey test. Non-normal distributed data were analyzed by the Mann-Whitney rank test (two

groups), Kruskal-Wallis test (more than two groups) with Dunn's test. A two-tailed p-value of < 0.05 was considered statistical significance. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 for Macintosh (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). To assess the impact of all cell types on survival, the surv_cutpoint() function from the Survminer package was applied to divide samples into *High* and *Low* groups based on the enrichment of B lymphocyte subpopulations among TCGA patients. Subsequently, the Kaplan-Meier method was used to visualize the difference between progression-free interval (PFI) curves, and p-values were calculated using the log-rank test.

Results

4T1 tumor elicits significant morphologic alterations in the tumor microenvironment and secondary lymphoid organs

It's well recognized that tumor development changes the dynamic of the immune response not only in the TME but also in lymphoid organs. Although most studies have been primarily focusing on understanding the kinetics of T cells, B cells are also observed in tumors, how cancer development affects the B cell compartment remains to be further elucidated. To determine the impact of breast cancer development on the B cell dynamic in the TME and secondary lymphoid tissues, we used two distinct *in vivo* murine breast tumor models. Syngeneic immunocompetent 8-week-old female BALB/c and C57BL/6 mice were distributed in tumor and control groups, and injected (s.c) in the mammary fat pad with $5x10^5$ 4T1 and E0771 tumor cells, respectively. Mice from the control group were injected (s.c) with an equivalent volume of PBS solution. Following initial inoculation, mice were followed weekly for tumor assessment and were euthanized after 7, 14, and 21 days (n=6, each period of analysis). Spleen, tDLN, and tumors were surgically excised, measured, and processed for flow cytometry analysis (Figure 1a).

Although both murine models presented palpable primary tumors after 7 days following initial inoculation, in each correspondent period of analysis, 4T1 tumors were larger compared to E0771 tumors (Figure 1b). While the difference in tumor growth between the two murine models may involve distinct genetic and molecular pathways, 4T1 and E0771 cell lines present distinct morphologic features, with 4T1 cells presenting an epithelial-like polygonal shape. In contrast, E0771 cells displayed an elongated shape. Furthermore, in all timepoints 4T1 induced tumors were denser and presented more necrotic areas than E0771 induced tumors, which were softer (supplementary figure 4). Additionally, 4T1 tumor development was more pronounced compared to E0771, as 4T1 tumor volume was considerably larger than E0771 tumors on day 21 (volume: 142 mm3 vs. 575 mm3) (Figure 1c). Although both tumors presented a meaningful change in size and volume over time, among isolated infiltrating mononuclear cells, only E0771 tumors demonstrated alteration for B cells, featuring a decrease between the first and third week, while no changes were seen for 4T1 tumors (Figure 1d). Interestingly, the impact of 4T1 and E0771 tumor growth was distinct in secondary lymphoid organs. Although both tumor models caused an increase of the tDLN, the enlargement of the organ was more noticeable in the 4T1 model, as early

as the first week, while in the E0771 model, a pronounced fold change in the lymph node area was only seen from the second week on. Despite this initial difference, draining lymph nodes persisted larger throughout tumor development (Figure 1 e-f, supplementary figure S2).

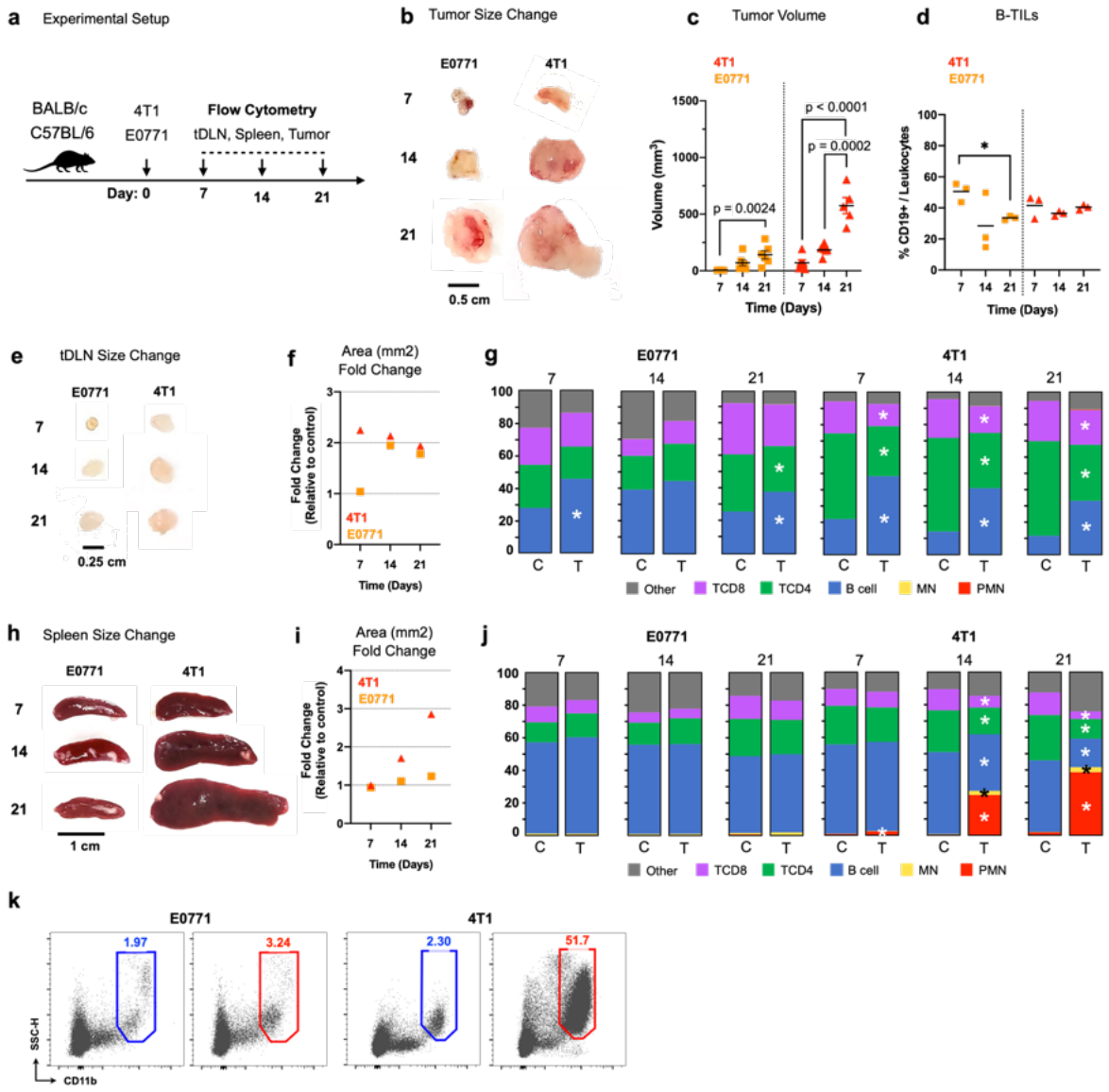


Figure 1. Impact of tumor development in morphologic and cellular composition in the TME and SLOs. 8-week-old female mice were assigned to control and tumor groups. BALB/c and C57BL/6 mice were injected (s.c.) with $5x10^5$ 4T1 and E0771 tumor cells, respectively. Mice from the control group were injected (s.c.) with an equivalent volume of sterile PBS solution. Cell lines were tested for mycoplasma sp. contamination before inoculation. Mice were euthanized on days 7, 14, and 21, and the tumor-draining lymph node (tDLN), spleen, and tumor were surgically excised and processed for flow cytometry analysis **(a)**. Representative images of E0771 and 4T1 tumors **(b).** Tumor volume (mm^3) for 4T1 and E0771 tumors throughout the weeks **(c)**. Frequency of tumor-infiltrating B cells (B-TILs). Tumor samples were processed mechanically, and mononuclear TILs isolated through Ficoll-Paque centrifugation. Each dot represents a pool of 3 tumors (total n = 9) **(d)**. Representative images of the tDLNs from E0771 and 4T1 tumor groups **(e)**. Area (mm^2) fold change of the tDLNs between control and tumor group mice for 4T1 and E0771 models **(f)**. Frequency (as % of total CD45+) of TCD8, TCD4, B cells, mononuclear myeloid cells (MN), and polymorphonuclear myeloid cells (PMN) of the tDLNs **(g),** and spleen **(j)** for control (C) and tumor (T). Representative images of the spleen from E0771 and 4T1 tumor groups **(h).** Area (mm^2) fold change of the spleen between control and tumor group mice for 4T1 and E0771 models **(i)**. Gated CD11b+ myeloid cells from spleen samples (21 Days) from control (blue)

and tumor (red) groups for 4T1 and E0771 models **(k)**. 4T1 (red), E0771 (orange). One-way ANOVA Tukey post hoc test. (figure 1 c-d). Student t-test (figure 1 g, j). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

When investigating the cellular populations, it was demonstrated an elevation of B cell frequency in both murine models when compared to mice from the control group, yet this relative increase was more evident in 4T1 models through the weeks (Figure 1g). Corroborating with these findings, we also observed a more robust elevation in the absolute cell count for B and T cells in the 4T1 model (supplementary figure S3a-c). Although myeloid cells were detected in the tDLNs in both murine models, mono (MN) and polymorphonuclear (PMN) populations corresponded only to a minor fraction of total leukocytes (<1%) (supplementary figure S3d-e). Conversely, morphologic changes in the spleen were only detected for the 4T1 model (Figure 1h), with a 3-fold change in organ area in the third week comparing mice from tumor and control groups (Figure 1i). While major increment in CD11b+ myeloid cells was observed in the spleen of 4T1 tumor-bearing mice throughout the weeks – comprising on average for almost half of the leukocytes in the last period of analysis (Figure 1j-k), we did not detect any significant alterations for mice injected with E0771 tumor cells. Moreover, mononuclear myeloid cells in 4T1 tumor-bearing mice only accounted for <5% of total leukocytes (supplementary figure S3J), with a predominance of polymorphonuclear myeloid cells. Compared to 4T1 tumor-bearing mice, mice injected with E0771 cells presented a more pronounced increase in the absolute cell count for the splenic B and T cell populations (supplementary figure S3f-h). Despite that, in opposition to tDLNs, the elevation of total B and T cells was only detected in the last period of analysis (21 days).

tDLNs of 4T1 and E0771 models present expansion of distinct B cell subsets

To further investigate the impact of tumor development in the B cell dynamic in the tumor microenvironment and associated lymphoid organs, we evaluated the distinct B cell subsets following tumor challenge. Although showing distinct tumor development kinetics and 4T1-induced tumors promoting splenomegaly and early elevation of the area in tDLNs, CD19+ IgD+ high was the predominant subpopulation (CD19+ IgD+) in both spleen and tDLNs of control and 4T1 and E0771 tumor-bearing mice (Figure 2a-b). Despite that, tDLNs presented a noticeable elevation of IgD+ high phenotype, with a significant increase of this B cell subset as early as 7 days for both models (Figure 2c). While the elevation of IgD+ high cell phenotype is an indication of proliferating B cells upon antigen recognition, lower expression of this cell marker suggests an ongoing differentiation process. Evaluating IgD+ intermediate/low population, we observed a significant increase of this phenotype in both models for tDLNs samples. Despite that, 4T1 presented a more robust elevation compared to the E0771 model (Figure 2d). In addition to IgD+ high and intermediate/low B cell profiles, we also noticed an elevation of plasma cells (CD138+), further suggesting a sustained proliferation and differentiation process in tDLNs as early as 7 days of tumoral challenge (Figure 2e). While significant changes were detected for tDLNs in both murine models, elevation was modest for the spleen, presenting an increase of IgD high, intermediate/low, and plasma cells (CD138+) only after 21 days of tumoral challenge in the 4T1 murine model. (Figure 2f-h).

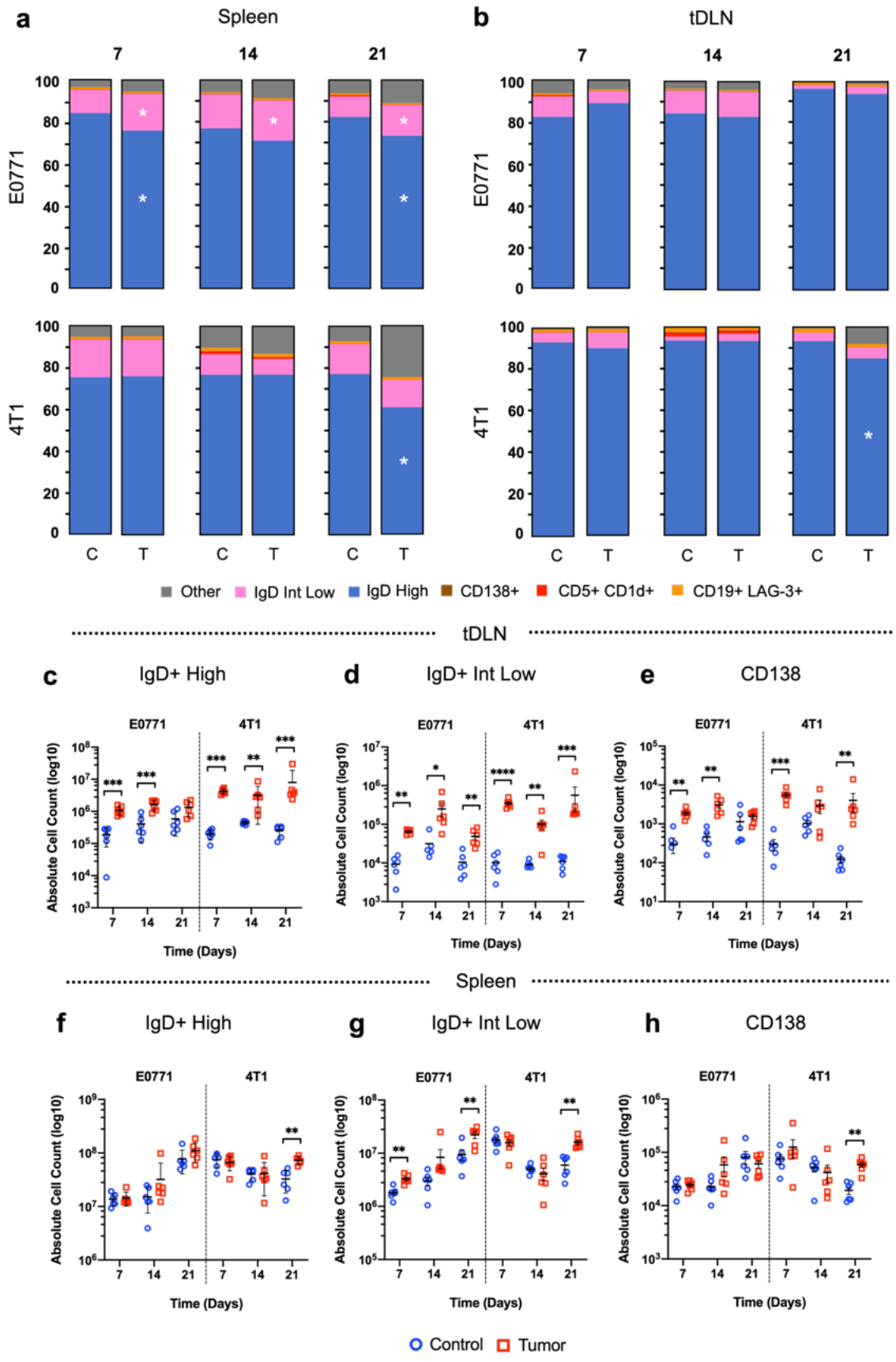


Figure 2. Evaluation B cell subsets in tDLN and spleen from E0771 and 4T1 tumor-bearing mice. Frequency of IgD+ High (pink), IgD+ intermediate/low (blue), CD138+ (brown), CD5+ CD1d+ (red), CD19+ LAG-3+ (orange) as % of total B cells (CD19+) in the spleen **(a)**, and tDLNs **(b)** after 7, 14 and 21 days of tumor challenge with 4T1 and E0771 cells. Subcolumns C and T, as control and tumor groups. Absolute cell count of IgD+ High **(c,f)**, IgD+ intermediate/low **(d,g)**, and plasma-cells **(e,h)** for control and 4T1/E0771 tumor-bearing

mice in the tDLNs and the spleen, respectively. Student t-test (figure 2 c-h). p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

Although the tumor microenvironment is characterized by immune suppression, B cells are still detected in the TME as previously demonstrated (Figure 1D). Interestingly, analyzing B cell subsets in 4T1 and E0771 tumors we observed a similar profile to tDLNs and spleen, in which IgD+ high was the predominating B cell subset, suggesting that although 4T1 and E0771 induced tumors have distinct kinetics profile, the humoral immune response in the TME is similar (Figure 3A). Although we did not observe changes for this population in 4T1 tumors, we detected an elevation for E0771 between the first and third week of the tumoral challenge (Figure 3B). Conversely, while in distinct period intervals, both 4T1 and E0771 had a decrease in IgD+ intermediate/low population (Figure 3C). While the presence of these subsets could indicate the proliferation and differentiation of B cells in the TME, cell events corresponding to plasma cells were rare or absent in both murine models (Figure 3D), which could be explained by the lower cell yield in tumor samples compared to lymph nodes, as well as distinct differentiation process between the evaluated compartments.

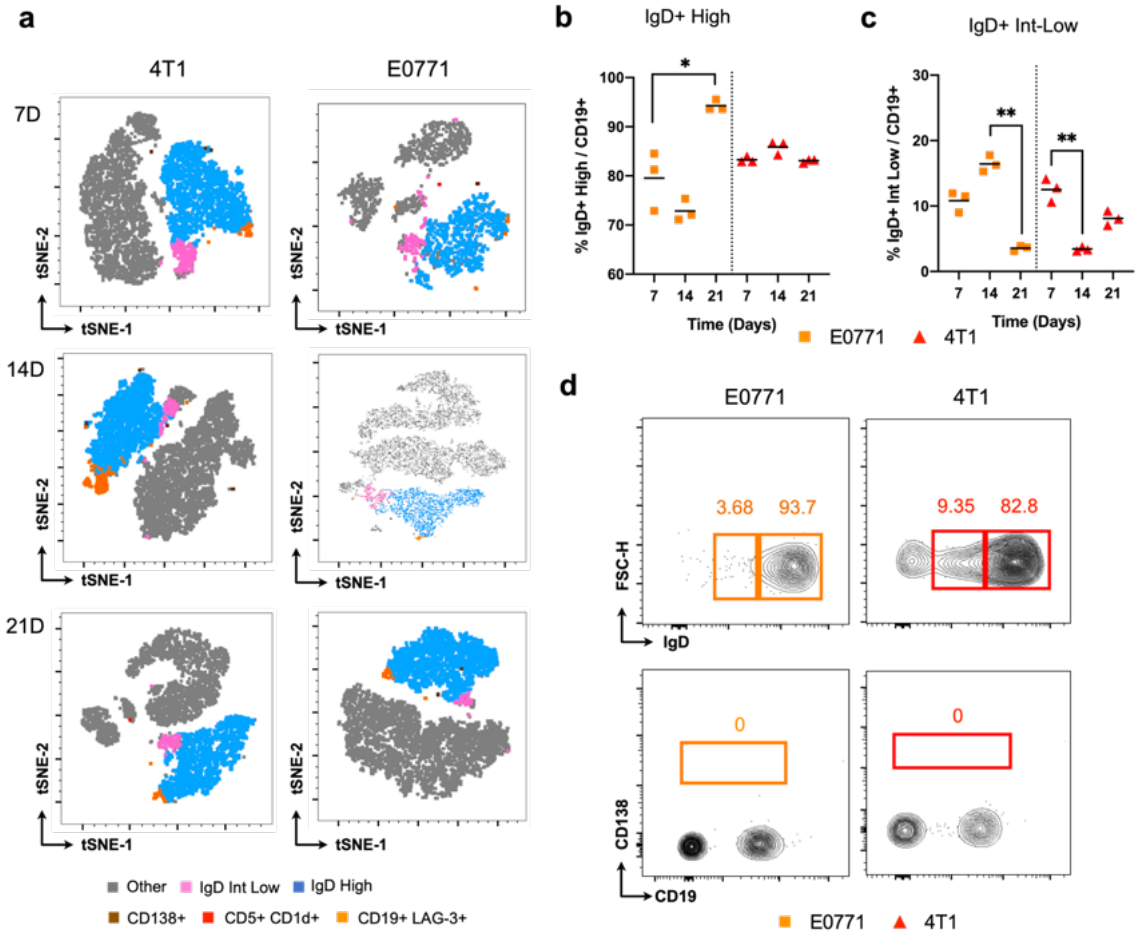


Figure 3. Evaluation B cell subsets in E0771 and 4T1 tumors. tSNE analysis depicting distinct B cell subsets through E0771 (right) and 4T1 (left) tumor development after 7, 14, and 21 days of initial inoculation **(a).** Frequency of IgD+ high **(b)** and intermediate/low B cells **(c)** in 4T1 and E0771 tumors. Each dot represents a pool of 3 tumors (total n = 9). Gated IgD+ high and intermediate/low B cells (top) and CD138+ cells (low) in E0771 (orange) and 4T1 (red) 21-day tumors **(d).** Kruskal-Wallis test, Dunn's post hoc test (figure 3b-c). p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

LAG-3 B cells in the TME and SLOs are predominantly IgD+

Considering the capacity of tumor cells to promote regulatory phenotypes in the TME, and recent evidence demonstrating distinct phenotypes of Bregs, we evaluated the impact of tumor development in the expression of LAG-3 in B cells in SLOs and in the TME throughout time. In addition, we also evaluated the expression of CD5 and CD1d, surface markers that characterize the B10 Breg population. Although the function of LAG-3 on B cells still needs to be better elucidated, we observed the expression of the immune checkpoint only in a fraction of B cells for all evaluated tissues, with CD19+ LAG-3+ cells corresponding to 1-3% of total B cells in the tDLNs and the spleen (Figure 4a-b). Curiously, despite the fact that the frequency of these cells remained relatively similar throughout time in the spleen and tDLNs, we observed a slight decrease for the subset in the first week for the E0771 model in the spleen, and in the second week for the 4T1 model in tDLNs (Figure 4a-b). Despite that, the tDLNs from E0771 and 4T1 tumor-bearing mice presented an increased absolute cell count of CD19+ LAG3-3+ cells compared to the control group mice (Figure 4c). Interestingly, although an elevation of the absolute cell counts for CD19+ LAG-3+ cells was also detected for the spleen, this elevation was restricted to the spleen after 21 days of tumoral challenge (Figure 4d). As for tumor samples, similar to the tDLNs and spleen we observed that CD19+ LAG-3+ comprised only a fraction of total B cells. Although a transitory elevation in the frequency of this phenotype was observed for the 4T1 model 14 days after the initial inoculation, CD19+ LAG-3+ comprised on average 3% of total B cells in the TME of both murine models (Figure 4e).

When analyzing distinct markers among LAG-3+ B cells, we observed that most of these cells in the spleen and tDLNs had IgD expression for both control and tumor-bearing mice, accounting for ≥ 90% of CD19+ LAG-3+ cells (Figure 4f-g). Similar numbers were found for 4T1 tumors, in which we also reported elevated IgD expression among CD19+ LAG-3+ cells, while the frequency of the same phenotype was more variable for the E0771 tumor model (Figure 4h). Although we couldn't observe a significant change of CD19+ LAG-3+ IgD+ cells for tDLNs and tumor samples in neither of the models throughout the weeks (Figure 4f, h), we detected a decrease of the population in the spleen of 4T1 tumor-bearing mice 21 days after tumor inoculation (Figure 4g).

Though considered one of the main Breg populations, and frequently found in the spleen and peritoneal cavity, CD5+ CD1d+ B cells comprised only a minor portion of the evaluated phenotypes, comprising less than 1% of total B cells in the spleen of both murine models, in control and tumoral conditions (Figure 4i). Moreover, although B10 B cells were also observed in the tDLN, the population only comprised a fraction of total B cells (<0.5%), in which no major alterations were observed throughout 4T1 and E0771 tumor development (Figure 4j).

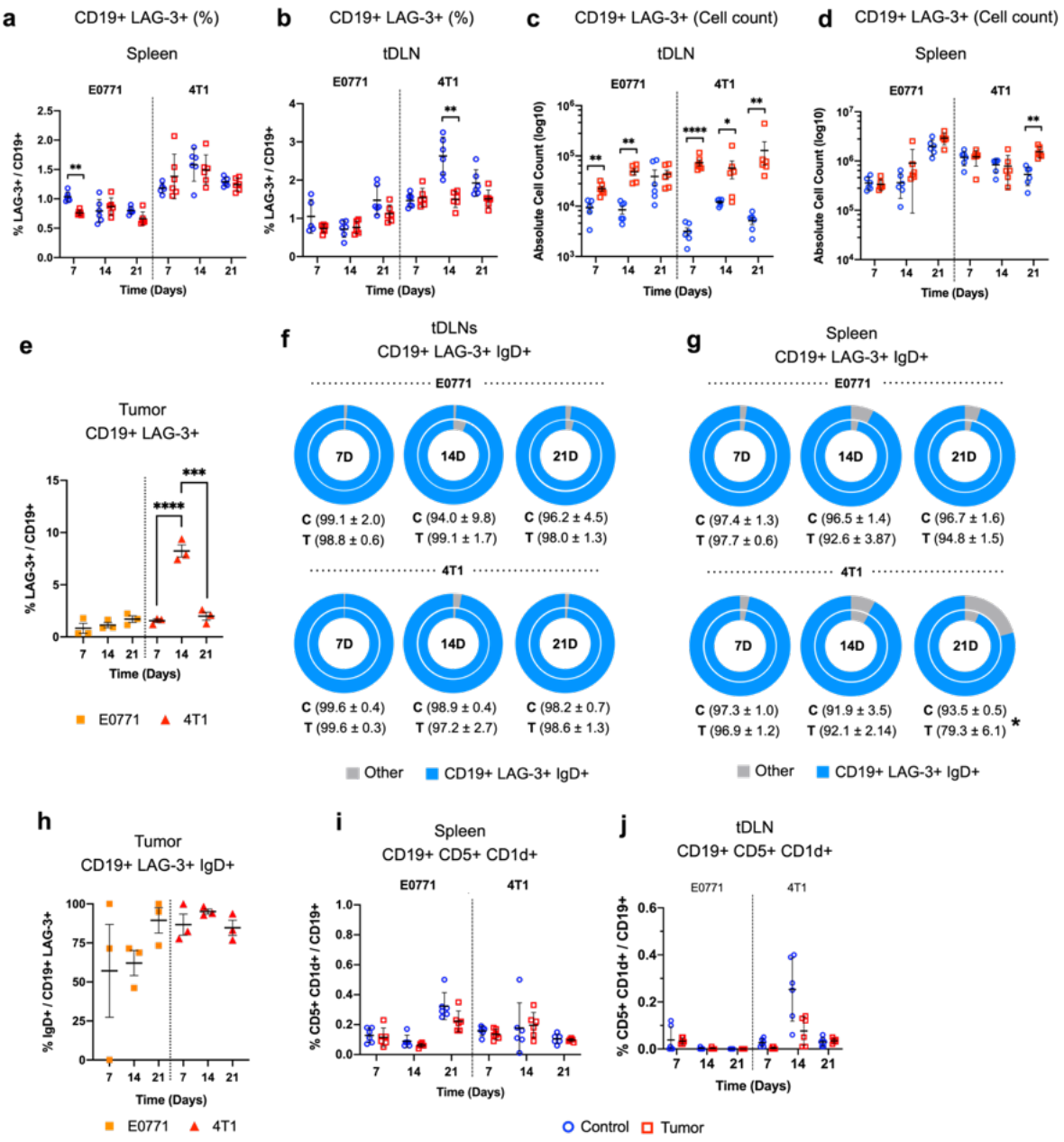


Figure 4. Evaluation of LAG-3+ and CD5+ CD1d+ subsets among B-TILs in E0771 and 4T1 spleen, tDLNs and tumors. Frequency (%) of CD19+ LAG-3+ B cells in the spleen and tDLNs for control, and 4T1 and E0771 tumor groups, respectively **(a,b).** Absolute cell count of CD19+ LAG-3+ B cells in the tDLNs and spleen for control, and 4T1 and E0771 tumor groups, respectively **(c,d)**. Frequency (%) of CD19+ LAG-3+ B cells in 4T1 (red) and E0771 (orange) tumors. Each dot represents a pool of 3 tumors (total n = 9) **(e),** Frequency (%) of CD19+ LAG-3+ IgD+ B cells in the 4T1 and E0771 tumors. Each dot represents a pool of 3 tumors (total n = 9) **(f)**. Frequency of CD19+ LAG-3+ IgD+ in the spleen **(g)** and tDLN **(h)** of control (inner circle) and 4T1 and E0771 tumor-bearing mice (outer circle). Frequency of CD19+ CD5+ CD1d+ cells in the spleen **(i)** and tDLNs **(j).** Control (blue), Tumor (red). Student T-test (figure 4a-d; f-g; i-j), Kruskal-Wallis test, Dunn's post hoc test (figure 4e,h). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

LAG-3 B cells are associated with a good prognosis in TNBC patients

Given the observed increase of LAG-3+ B cells within the TME, along with their notable proliferation in the tumor-draining lymph nodes (tDLNs) of 4T1 and E0771 tumor-bearing mice, we proceeded to investigate the prevalence and potential functional roles of these cells in human breast cancer patients, as well as their broader implications for tumor

biology and patient outcomes. To achieve this objective, we assessed a pan-cancer sc-RNAseq dataset comprising cells from seven different solid tumors including breast cancers. After selecting B cells by evaluating the expression of canonical cellular markers (*CD79A/B*, *MS4A1*, and *MBZ1*), we evaluated highly variable genes among these cells, and separated these cells according to distinct genes expression as it follows: naïve B cells (n = 3,746; *CD19*, *MS4A1*, *IGHD*, *IGHM*), memory B cells (n = 11,264; *CD19*, *MS4A1*, *CD27*), plasma cells (n = 3,719; *IGHG1*, *IGHG2*, *MZB1*, *CD38*), proliferative (n = 455; *CD19*, *MS4A1*, TOP2A), and LAG-3+ (n = 893; *CD19*, *LAG3*) (Figure 5a). Although LAG-3+ B cells comprised a minor portion (4%) of total tumor-infiltrating B cells (n = 20,077 cells), evaluating other cellular markers, we observed that these cells also co-express *IGHD* and *PDCD1* alongside LAG-3 (Figure 5b). In this LAG3+ B cell population, we observed differential expression of *FCRL4, HCK*, *CCR1*, *ITGAX*, *IFIT1*, and in minor extent *OSTN-AS1*, *SOX5*, *IFIT1*, *ADAP1*, *PDCD1*, *GPR25*, *ZEB2-A21*, *RBPMS2*, *FAM72B*, *EIF3P3* (Figure 5c). Moreover, through enrichment pathway analysis using the Reactome database, we observed that these cells had enrichment for the costimulatory CD28 receptor family as well as for IFN-ɣ, and IFN-α/β pathways (Figure 5d). Importantly, patients with higher levels of LAG-3+ B cell enrichment demonstrated superior progression-free interval (PFI) rates in comparison to those with lower enrichment (log-rank test, p-value = 0.047). At the end of the 5-year interval, 33 patients with higher LAG-3+ B cell signature remained alive, while only 8 patients, comprising the group with lower levels of LAG-3+ B cells were alive (Figure 5e).

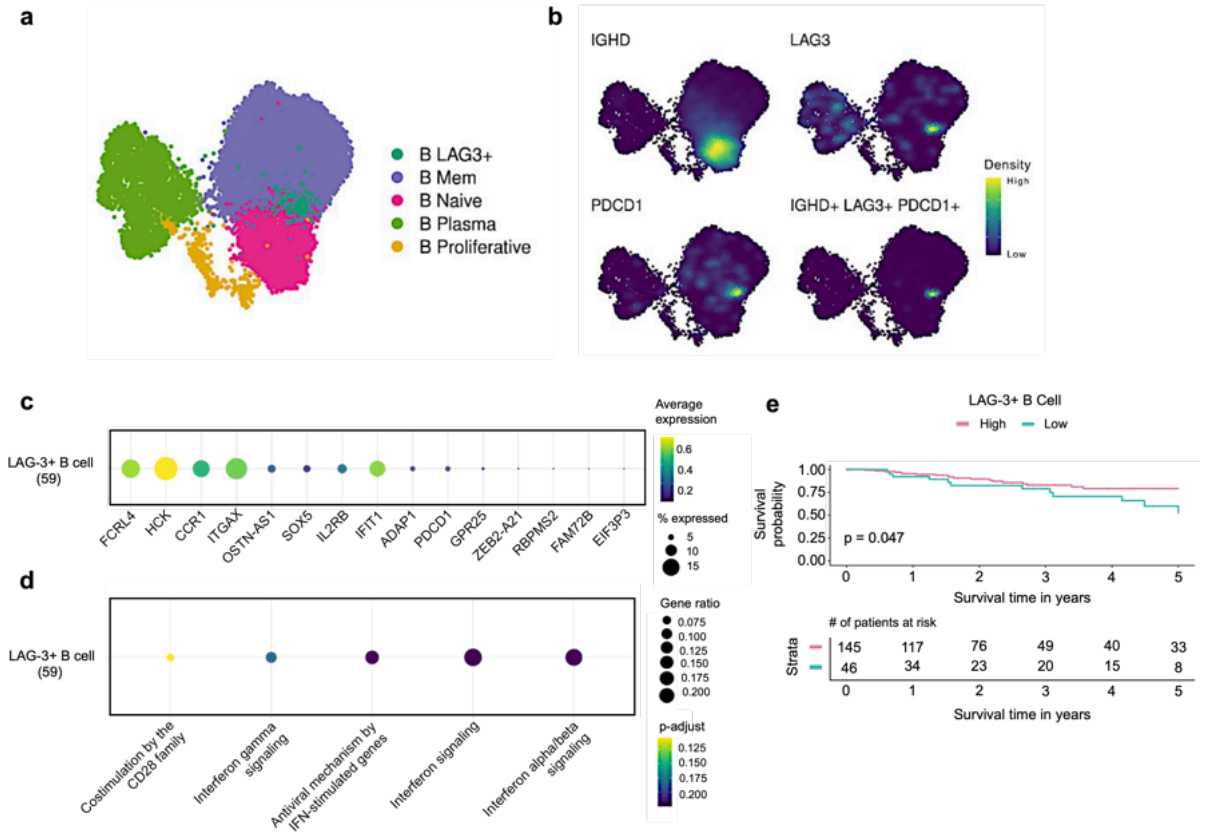


Figure 5 Analysis of tumor-infiltrating LAG-3 B cells in TNBC patients. (a) UMAP of tumor-infiltrating B cells, color-coded according to cell types. **(b)** Density plots highlighting the expression of individual markers and co-expression of *IGHD*, *LAG3*, and *PDCD1*. **(c)** Dot plot showing the top 15 differentially expressed genes in the B LAG3^{+} subpopulation in relation to the other B cells subpopulations. The dot size indicates the percent

of expressing cells, and the dot color represents the normalized average expression. **(d)** Enrichment pathways analysis of B LAG3$^+$ subpopulation using Reactome database. The size of each circle represents the ratio of the number of genes detected and the number of genes belonging to a given pathway and such circles are colored by p-adjust. **(e)** Kaplan–Meier curves for PFI for the TNBC patients from the TCGA cohort. The patients were divided into Low-B LAG3$^+$ and High-B LAG3$^+$ groups using the *surv_cutpoints()* function. P-values were calculated using the log-rank test.

Discussion

Diagnosed in younger women and known for their aggressive behavior, triple-negative tumors (TNBC) have posed a challenge to the medical field in the last decades. Interestingly, despite being associated with a worse prognosis, triple-negative tumors are more likely to present intense lymphocyte infiltrate, a finding that has been correlated with better overall survival rates and better response to chemotherapy [43,44]. Though most studies demonstrate that on average T cells are the most prominent lymphocyte population in breast tumors, other cellular profiles including B cells are also described, yet how tumors affect these populations remains largely unknown [45]. Here, using 4T1 and E0771 breast cancer murine models we initially demonstrated that these tumors presented a distinct kinetics profile despite mice being injected with the same number of cells. While the larger volume and detection of necrotic areas in 4T1 induced tumors are suggestive of a more pronounced proliferation by these cells compared to the E0771 cell line, other variables are likely involved.

While both cell lines mimic the behavior of human breast tumors, 4T1 cells have been considered a model for stage IV breast cancer, while E0771 cells staging is unknown [46,47]. Although the classification of murine cell lines and their relation to human tumors may be difficult to establish, evidence demonstrates that this cell line resembles the basal-like intrinsic subtype, as authors pointed for the expression of cytokeratin-14, as well as high levels of proliferation and metastasis markers, such as Top2a, Birc5, Msln, Plk1 [47]. Though the E0771 has also been isolated from a spontaneous tumor from the C57BL/6 mice strain, the cell line features distinct morphology and different enrichment cellular pathways. While the ongoing debate over the classification of E0771 tumors, transcriptome analysis demonstrates that these cells share common features with claudin-low tumors, with enriched pathways for angiogenesis, invasion, and epithelial-to-mesenchymal transition properties. Additionally, it has been shown that E0771 cells have lower differentiation and proliferation profiles [46,48]. Despite not evaluating the effects of tumor development on B cell populations, authors also demonstrated that 4T1 tumors were larger compared to E0771 after each correspondent period of analysis, further corroborating with the distinction between the two cell lines [49–51].

The difference between the basal-like (4T1) and claudin-low (E0771) murine models was also observed when we analyzed the effect of tumor development in SLOs. Although the elevation of myeloid cells in the spleen, as well as lymph nodes are recognized in 4T1 tumor-bearing mice - and it was reported by our group and previous authors [52–54], few studies have evaluated the kinetics of these cells in non-basal-like breast tumors. While different authors demonstrate that obesity, as well as distinct treatment regimens including immune checkpoint blockade (anti-PD-1) [55], gemcitabine [56], and ranitidine [57] affects the

frequency of myeloid CD11b+ populations in the TME and spleen of E0771 tumor-bearing mice, timepoints were limited, preventing observing the potential alterations throughout tumor development. In the current study, despite detecting Ly-6C+ Ly-6G- and Ly-6C$^{low/-}$ Ly-6G+ cells in the spleen of E0771 tumor-bearing mice, we did not observe major alterations throughout tumor growth. This could explain the lack of morphologic alteration in the spleen of E0771-injected mice, since continuous elevation of myeloid cells majorly contribute to the enlargement of the organ. Collectively, these findings lead us to believe that G- and GM-CSF production by 4T1 cells is more pronounced in comparison to E0771 cells. Corroborating this hypothesis, despite not evaluating the concentration of G-CSF throughout tumor development, Hiraga and colleagues observed elevated plasma levels of G-CSF in mice inoculated with 4T1 compared to E0771 [58]. In addition to these results, while not evaluating E0771 cell line, authors demonstrated a higher concentration of G-CSF from 4T1-derived cell culture supernatants compared to other murine cell lines [59].

Interestingly, in addition to presenting distinct kinetics for myeloid-derived cells throughout 4T1 and E0771 tumor development, a distinct dynamic for the lymphoid cell compartment was also observed in the spleen. Despite presenting an increased frequency and absolute cell count for B and T cells in later periods (21 days), this increase was more pronounced in E0771 tumor-bearing. Considering recent findings demonstrating that MDSCs cell are able to hamper B cell expansion and differentiation through the suppression of Tfh cells, as well as production of ROS, arginase-1 and nitric oxide (NO) [60–62], it may be possible that expanded MDSCs in the spleen of 4T1 tumor-bearing mice difficult the expansion of local B cells. In addition to these differences, we only demonstrated an elevated frequency of IgD$^{int\text{-}low}$ B cells in the spleen of E0771 tumor-bearing, further suggesting for the negative impact of MDSCs in the differentiation process of B cells in the spleen of 4T1 tumor-bearing mice. Intriguingly, while decreased expression of IgD in B cells indicates an ongoing differentiation process and isotype switch, the elevation in IgD$^{int\text{-}low}$ B cell in the spleen of E0771 model was not followed by a correspondent increase of plasma cells (CD138+). While we have evaluated antibody-secreting cells, it may be possible that emerging B cells have memory phenotype (CD27+). Although the current paper highlights that kinetics of splenic B cell subpopulations throughout claudin-low and basal-like breast tumors growth, future studies are necessary to address other B cell subpopulations, as well as understanding the potential differences in antigens derived from distinct breast cancer subtypes.

Despite CD11b+ myeloid cells were also detected in tDLNs in both murine models, these populations comprised a minor fraction of total leukocytes (<1%), with B cells accounting for most of the cells following the tumoral challenge. In opposition to the spleen which only has access to antigens transported through the blood, tDLNs and associated lymphatic vessels are located adjacent to the tumor site, and provide immediate access to TAAs shed from eliminated and necrotic tumor cells [63]. These differences may explain the early elevation of total B cells in tDLNs in both murine models in comparison to the spleen. Furthermore, as previously demonstrated, MDSCs (CD11b+ Ly-6G+ Ly-6Clow-) were almost absent in LNs. In a recent study, authors demonstrated that tDLNs from E0771 tumor-bearing mice undergo an intense morphological change following tumoral implantation. According to Louie, e*t al.,* tumor growth leads to the expansion of LN conduits in the B cell zone and disruption of the sub-capsular sinus (SCS) macrophage layer, favoring the transport of TAAs to GC zones and associated follicular dendritic cells (FDCs) [64]. Despite

not assessing the kinetics of distinct B cell subsets through the weeks of tumor development, Louie, e*t al.* reported the appearance of GC B cells in the tDLNs of the E0771 model as early as 7 days post-tumor implantation, indicating activation and proliferation of B cells in this site. Corroborating these findings, Gu, Y. *et al.,* analyzing the role of B cells in the formation of lymph node metastasis, reported an increase in both cell count and frequency of CD19+ B220+ cells in the tDLN of 4T1 tumor-bearing mice. Additionally, the authors also demonstrated that this elevation was more pronounced in tDLNs compared to non-draining lymph nodes (nDLN) [65]. The capacity of B cells to produce antibodies against tumoral antigens was confirmed in the work of Díaz-Zaragoza and colleagues, that demonstrated serum-derived IgM antibodies capable of recognizing 4T1 protein extracts [66].

In agreement with these results, we reported a significant elevation in total B cells, as well as B LAG-3+ cells and plasma cells in the tDLNs not only 7 days after the initial tumor injection, but a sustained proliferation throughout the weeks, indicating a continuous influx of TAAs to tDLNs, leading to activation, proliferation and differentiation of B cells, that may or may not migrate to the TME. The relevance of tDLNs in priming humoral immune response against tumor antigens was observed in another study, in which the transferring of activated tDLN B cells resulted in the inhibition of lung metastasis. Moreover, the combined B and T cell transfer enhanced T cell response against 4T1 tumors [67]. Though collectively these findings support the elaboration of a humoral immune response against TAAs and TSAs, it may not be excluded an unspecific elevation of lymphocytes in these organs due to tumor-derived cytokines. Previous works demonstrated that both 4T1 and E0771 cell lines promote the elevation of pro-inflammatory cytokines (e.g. IFN-γ, TNF, IL-1β, IL-6, GM-CSF), which could contribute to elevate lymphocytes in SLOs [68,69].

Although different studies in pre-clinical and clinical settings have reported the presence of B cells in the TME [70], the impact of earlier tumor development in B cell kinetics is still unknown. Interestingly, both 4T1 and E0771 tumor development caused infiltration of B cells in the TME as early as 7 days of implantation, yet changes were less pronounced compared to SLOs, and most of these populations were comprised of IgD+ cells. These results contrast with those observed in the spleen and especially in the tDLNs, which demonstrated an elevation in plasma cells (CD138+) in addition to the IgD+ B cells. These results suggest that although B cells may be able to migrate to the TME, proliferation, and differentiation into antibody-secreting stages may be hampered, either by the immune suppression exerted by distinct tumor-infiltrating cell profiles (Tregs, MDSCs) [60–62], and/or absence of essential cellular and molecular components required for the optimal B cell activation and selection, such as cognate activation by T cells, and co-stimulatory signaling from Tfh cells [71]. Corroborating this hypothesis, one study demonstrated that although E0771 tumors were followed by expanded tumoral vasculature, there was a progressive decrease of infiltrating B lymphocytes alongside an increase of MDSCs and Tregs cells [72].

Although the detection of B cells in the TME is suggestive of an ongoing anti-tumoral response, and recent studies using the 4T1 murine model propose that tDLN B cells are capable of mediating tumor cell death through Fas-FasL interaction [73], the maintenance of immune suppression is considered one of the cancer hallmark [74]. Despite lacking a proper lineage marker similar to FOXP3 in Tregs, it has been demonstrated that B regulatory cells can contribute to immune suppression by implementing distinct mechanisms, including the production of IL-10, IL-35, TGF-β and granzyme B (GZMB) [75,76]. Although distinct Bregs populations, such as $CD25^{+}CD81^{High}$ $B7H\text{-}1^{High}$, PD-1- PD-L1+ CD19+, and

$CD19^{+}$ $CD25^{High}$ $CD69^{High}$ have been described for breast cancer murine models [30,77,78], most studies use a single time point, preventing understand how tumor development influence these cells. Moreover, despite the extensively used 4T1 model (basal-like), it's important to better understand the dynamic of Bregs in other breast tumor subtypes, as the emerging results could result in a better overall comprehension of the existing diverse breast malignant neoplasms. In an attempt to better understand the emergence of Breg phenotypes in the early moments of carcinogenesis, we used two distinct murine models. In this regard, considering the distinction between 4T1 and E0771 cell lines, we hypothesized that basal-like and claudin-low tumor development could lead to distinct increase in Bregs phenotypes in SLOs, but, more importantly, in the TME. Curiously, although Bregs populations have been implicated in pro-tumoral action in pancreatic adenocarcinoma [79], and lymphoma [80], in the current study we were not able to detect B10 Breg (CD5+ CD1d+) phenotype in the TME of neither the used murine models, suggesting that other mechanisms may be involved in the emergence of this phenotype other than differences in the breast tumor subtype. Corroborating these findings, although we have detected this phenotype in the spleen and tDLN of both murine models, 4T1 and E0771 tumor development did not cause alterations in the frequency of these cells. Despite these results, the existence of B10 Bregs in the TME should not be excluded, since the phenotype comprises only a minor fraction of total B cells (<0.5%).

Interestingly, although B10 Breg cells remained unaltered in SLOs and were absent in the TME, in the present work we detected LAG-3+ B cells in all the assessed tissues and timepoints (7-, 14- and 21-days post tumor cell injection). In addition, we reported an elevation of the absolute cell count for LAG-3+ B cells in the tDLNs of both murine models throughout the weeks. In opposition to the previous results, here we observed a more pronounced increase of this phenotype in the 4T1 tumor-bearing mice, which could suggest that distinct breast tumor subtypes may distinctively influence the emergence of LAG-3+ B cells. Yet, similar to B10 Breg cells, LAG-3+ B cells comprised a minor fraction of total B cells, accounting for up to 2 and 3% of B cells in the spleen and tDLNs, respectively. Although this immune checkpoint molecule was initially characterized in T cells [81], it has also been described in B cells, yet the role in B cells is still elusive, as different ligands have been proposed, and the downstream signaling pathway is still unknown [82]. Early findings from *in vitro* experiments demonstrated that the expression of LAG-3 can be a T-dependent activation marker in B cells [83]. Considering the capacity of tumor cells to promote sustained expression of IC, we hypothesized that tumor growth could impact the expression of LAG-3 in B-TILs, yet we only observed a transient elevation in 4T1 tumors. While the causes of this transient elevation need better clarification in future experiments, it may be possible that 14-day tumor growth corresponds to the period of higher B cell activity in these tumors, followed by suppression of TILs and predominance in MDSCs as previously demonstrated in a study [53]. In case this hypothesis is correct, the absent increase of LAG-3+ B cells in the E0771 TME, could either indicate that B cells are not properly stimulated in that microenvironment, or that B cells reach peak stimulation in a period beyond the last timepoint (21 days). Interestingly, despite their distinct classification and differences in the kinetics of LAG-3+ B cells, both 4T1 and E0771 tumor-bearing mice presented a similar composition when analyzing different cell markers within the LAG-3+ B cell compartment. We observed that most of these cells had high expression of IgD+ cells, suggesting that these are early activated B cell stages, rather than another Breg phenotype. Curiously, despite detecting

this phenotype in non-tumoral conditions, only in the tumor-bearing mice a cell count elevation in tDLNs was observed. Considering the IgD and LAG-3 co-expression in these cells, LAG-3 may provide inhibitory signaling to balance activation of BCR after antigen binding and recognition, in a similar manner to T cells, which counterbalances TCR activation by inhibiting calcium flux and activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) [84]. Despite naturally LAG-3+ CD138^{hi} regulatory B cell subset has been reported in one study, and authors demonstrated that the population may emerge from B1b and other B cell subsets in a BCR-dependent manner, our study did not identify this cell profile in SLOs and TME throughout time, suggesting that these cells may appear under specific pathological conditions.

Although our initial analysis corroborates with the hypothesis of LAG-3 B cells being early-activated stages, as these cells also had IgD transcripts, we also observed genes that are involved in other cellular stages. Belonging to the Fc receptor-like family, studies demonstrate that FCRL4 is mainly expressed in memory B cells in sub-epithelial regions, and the presence of the receptor is associated with viral infections (e.g., HIV) and autoimmune diseases (e.g., rheumatoid arthritis), yet authors demonstrate that other cellular stages might express this receptor, including plasma cells [85,86]. Authors argue that FCRL4 is involved in pro-inflammatory B cell stages, contributing to balancing the BCR response, as FCRL4 activation leads to phosphorylation of ITIM domains by scr-family kinases, ultimately contributing to a lower cell cycle in B cells. Interestingly, studies demonstrate that other genes and proteins are associated with FCRL4 expression, including surface receptors (ITGAX (CD11c)), chemokine receptors (CCR1, CCR5), scr-family kinases (HCK, LYN) transcription factors, as well as activation-induced cytidine deaminase (AICDA) [87–89,86] – some of which have been detected in our analysis. Although other genes (e.g., ADAP1, OSTN-AS1, ZEB2-A21) were found differentially expressed in LAG-3 B cells, their role and contribution to this phenotype are still elusive, yet authors demonstrate that ZEB2 alongside ITGAX is essential to B cell differentiation [90,91].

Interestingly, we also observed expression of PDCD1, despite the immune checkpoint receptor being known to balance activation of T cells by modulating MHC-TCR interaction, evidence suggests that this receptor is also involved in balancing BCR activation signaling [92,93]. Additionally, the enriched CD28 costimulatory pathway in LAG-3+ B cells further suggests the involvement of these cells with activated B cell stages, as ligands of CD28 (CD80/CD86) are found in activated B cells, and are associated with germinal center B survival [94,95]. Though the functions of LAG-3 B cells need better clarification and analysis using other cohorts are required, our study demonstrates that these cells could impact the disease outcome, as our analysis revealed that patients with higher LAG-3 B cell transcript levels had longer progression-free survival (PFS) rates compared to those with lower expression levels.

Collectively, these results suggest that LAG-3 B cell subset is most likely involved in proliferative B cell stages, associated with the emergence and differentiation of memory and plasma cells, and elevated presence could indicate a more robust humoral immune response in part of the TNBC patients.

Here, using two distinct murine syngeneic models, we demonstrated that the development of basal-like (4T1) and claudin-low (E0771) murine breast cancer models have distinct implications in the dynamic of myeloid-derived and lymphocytic-derived cells in the SLOs and TME. While the elevation of myeloid-derived cells is well recognized in the basal-

like 4T1-induced tumors, here we demonstrated that while present, E0771-induced tumors do not cause expansion of these cells in SLOs. More importantly, the distinction between the two murine models was also observed in evaluating B cell subpopulations. While both induced tumors caused an elevation of B cells in tDLNs as early as 7 days post tumor cell inoculation, in addition to the rapid expansion in the organ area, 4T1-induced tumors caused a more robust elevation of IgD^{high}, $IgD^{Int\text{-}low}$, and CD138+ cells compared to E0771 induced tumors. Moreover, despite the emergence of distinct Breg subtypes in malignant neoplasias, to the best of our knowledge, here we reported for the first time the dynamic of B10 and, most importantly, LAG-3+ B cells under physiological, basal-like, and claudin-low breast cancer subtypes. Although the functions associated with the LAG-3 receptor in B cells remain to be elucidated, here we demonstrated that rather than just a regulatory marker, the receptor is most likely associated with a subset of activated B cells. Corroborating with this hypothesis we demonstrated the expression of relevant cell cycle and proliferation genes alongside LAG-3. Despite facing challenges such as restricted time points for analysis and limited sample yields from tumors, this study underscores the distinct B cell dynamics and the development of humoral responses during early carcinogenic events in basal-like and claudin-low breast cancer subtypes. It also sheds light on the potential roles of LAG-3+ B cells within the context of TNBC, particularly in PFI. We advocate for further research and experimental studies to deepen our understanding of the specific functions and mechanisms of action of these B cell phenotypes across various breast cancer subtypes.

Data availability

Data shall be available from the corresponding author upon request. The scRNA-seq integrated data is available in the CELLxGENE portal at the following link: https://cellxgene.cziscience.com/collections/3f7c572c-cd73-4b51-a313-207c7f20f18.

Abbreviations

TNBC: Triple-negative breast cancer

ER: Estrogen receptor

PR: Progesterone receptor

HER: Human epidermal receptor

TILs: Tumor-infiltrating lymphocytes

OS: Overall survival

IFN-ɣ: Interferon gamma

IL-2: Interleukin 2

Treg: T regulatory cell

TME: Tumor microenvironment

DFS: Disease-free survival

RFS: Relapse-free survival

ASC: Antibody-secreting cell

Breg: B regulatory cell

MHC-II: Major histocompatibility complex II

LAG-3: Lymphocyte activation gene 3

IL-35: Interleukin 35

TGF-β: Transforming growth factor beta

tDLN: Tumor-draining lymph node

PBS: Phosphate-buffered saline

PMN: Polymorphonuclear

MN: Mononuclear

tSNE: t-distributed Stochastic Neighbor Embedding

TSAs: Tumor-specific antigens

TAAs: Tumor-associated antigens

GC: Germinal center

GZMB: Granzyme B

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

SLOs: Secondary lymphoid organs

References

1. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology* **13**, 674–690 (2016).

2. Savas, P. *et al.* Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* **13**, 228–241 (2016).

3. El Bairi, K. *et al.* The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *npj Breast Cancer* **7**, 1–17 (2021).

4. Adams, S. *et al.* Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *JCO* **32**, 2959–2966 (2014).

5. Dieci, M. V. *et al.* Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Annals of Oncology* **26**, 1698–1704 (2015).

6. Denkert, C. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol* **33**, 983–991 (2015).

7. Carlos Souto Maior Borba, M. A. *et al.* Treatment patterns and healthcare resource utilization for triple negative breast cancer in the Brazilian private healthcare system: a database study. *Sci Rep* **13**, 15785 (2023).

8. Garbar, C., Mascaux, C., Merrouche, Y. & Bensussan, A. Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancer cell sialylation impacts tumor microenvironment T-lymphocyte subset recruitment: a possible mechanism of tumor escape. *Cancer Manag Res* **10**, 1051–1059 (2018).

9. Matsumoto, H. *et al.* Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **156**, 237–247 (2016).

10. Wang, K., Shen, T., Siegal, G. P. & Wei, S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. *Hum Pathol* **69**, 110–117 (2017).

11. Schmidt, M. *et al.* Prognostic impact of CD4-positive T cell subsets in early breast cancer: a study based on the FinHer trial patient population. *Breast Cancer Res.* **20**, 15 (2018).

12. Zhu, X. & Zhu, J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci* **21**, 8011 (2020).

13. Malla, R. R. *et al.* Regulatory T cells: Their role in triple-negative breast cancer progression and metastasis. *Cancer* **128**, 1171–1183 (2022).

14. Vignali, D. A. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**, 523–532 (2008).

15. Romano, M., Fanelli, G., Albany, C. J., Giganti, G. & Lombardi, G. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).

16. Piura, E. & Piura, B. Autoantibodies to Tumor-Associated Antigens in Breast Carcinoma. *Journal of Oncology* **2010**, e264926 (2010).

17. Blenman, K. R. M. *et al.* Sentinel lymph node B cells can predict disease-free survival in breast cancer patients. *npj Breast Cancer* **4**, 1–7 (2018).

18. Qin, Y. *et al.* Tumor-infiltrating B cells as a favorable prognostic biomarker in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell International* **21**, 310 (2021).

19. Hu, Q. *et al.* Atlas of breast cancer infiltrated B-lymphocytes revealed by paired single-cell RNA-sequencing and antigen receptor profiling. *Nat Commun* **12**, 2186 (2021).

20. Guan, H. *et al.* PD-L1 mediated the differentiation of tumor-infiltrating CD19+ B lymphocytes and T cells in Invasive breast cancer. *Oncoimmunology* **5**, e1075112 (2016).

21. Mohammed, Z. M. A., Going, J. J., Edwards, J., Elsberger, B. & McMillan, D. C. The relationship between lymphocyte subsets and clinico-pathological determinants of survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer* **109**, 1676–1684 (2013).

22. Miligy, I. *et al.* Prognostic significance of tumour infiltrating B lymphocytes in breast ductal carcinoma in situ. *Histopathology* **71**, 258–268 (2017).

23. Shang, J., Zha, H. & Sun, Y. Phenotypes, Functions, and Clinical Relevance of Regulatory B Cells in Cancer. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).

24. Katz, S. I., Parker, D. & Turk, J. L. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature* **251**, 550–551 (1974).

25. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. & Bhan, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219–230 (2002).

26. Tedder, T. F. B10 Cells: A Functionally Defined Regulatory B Cell Subset. *The Journal of Immunology* **194**, 1395–1401 (2015).

27. Maruhashi, T., Sugiura, D., Okazaki, I.-M. & Okazaki, T. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer* **8**, e001014 (2020).

28. Graydon, C. G., Mohideen, S. & Fowke, K. R. LAG3's Enigmatic Mechanism of Action. *Frontiers in Immunology* **11**, (2021).

29. Lino, A. C. *et al.* LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity* **49**, 120-133.e9 (2018).

30. Olkhanud, P. B. *et al.* Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting $CD4^+$ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Research* **71**, 3505–3515 (2011).

31. Rosser, E. C. & Mauri, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**, 607–612 (2015).

32. Shao, Y. *et al.* Regulatory B cells accelerate hepatocellular carcinoma progression via CD40/CD154 signaling pathway. *Cancer Lett* **355**, 264–272 (2014).

33. Murakami, Y. *et al.* Increased regulatory B cells are involved in immune evasion in patients with gastric cancer. *Sci Rep* **9**, 13083 (2019).

34. Vuorte, J., Jansson, S.-E. & Repo, H. Evaluation of red blood cell lysing solutions in the study of neutrophil oxidative burst by the DCFH assay. *Cytometry* **43**, 290–296 (2001).

35. Guimarães, G. R. *et al.* Identification of novel myeloid-derived cell states with implication in cancer outcome. 2023.01.04.522727 Preprint at https://doi.org/10.1101/2023.01.04.522727 (2023).

36. Lopez, R., Regier, J., Cole, M. B., Jordan, M. I. & Yosef, N. Deep generative modeling for single-cell transcriptomics. *Nat Methods* **15**, 1053–1058 (2018).

37. Gayoso, A. *et al.* A Python library for probabilistic analysis of single-cell omics data. *Nat Biotechnol* **40**, 163–166 (2022).

38. McInnes, L., Healy, J. & Melville, J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. Preprint at https://doi.org/10.48550/arXiv.1802.03426 (2020).

39. Finak, G. *et al.* MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biology* **16**, 278 (2015).

40. Hao, Y. *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **184**, 3573-3587.e29 (2021).

41. Colaprico, A. *et al.* TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Research* **44**, e71–e71 (2016).

42. Therneau, T. M. & Grambsch, P. M. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. (Springer, 2000). doi:10.1007/978-1-4757-3294-8.

43. Gao, G., Wang, Z., Qu, X. & Zhang, Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **20**, 179 (2020).

44. Loi, S. *et al.* Tumor infiltrating lymphocyte stratification of prognostic staging of early-stage triple negative breast cancer. *npj Breast Cancer* **8**, 1–4 (2022).

45. Wu, S. Z. *et al.* Stromal cell diversity associated with immune evasion in human triple-negative breast cancer. *The EMBO Journal* **39**, e104063 (2020).

46. Yang, Y. *et al.* Immunocompetent mouse allograft models for development of therapies to target breast cancer metastasis. *Oncotarget* **8**, 30621–30643 (2017).

47. Schrörs, B. *et al.* Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Frontiers in Oncology* **10**, (2020).

48. Kim, I. S. *et al.* Immuno-subtyping of breast cancer reveals distinct myeloid cell profiles and immunotherapy resistance mechanisms. *Nat Cell Biol* **21**, 1113–1126 (2019).

49. Stagg, J. *et al.* Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 1547–1552 (2010).

50. Ager, E. *et al.* Blockade of MMP14 Activity in Murine Breast Carcinomas: Implications for Macrophages, Vessels, and Radiotherapy. *Journal of the National Cancer Institute* **107**, (2015).

51. Panagi, M. *et al.* TGF-β inhibition combined with cytotoxic nanomedicine normalizes triple negative breast cancer microenvironment towards anti-tumor immunity. *Theranostics* **10**, 1910–1922 (2020).

52. Liu, M. *et al.* Macrophages Support Splenic Erythropoiesis in 4T1 Tumor-Bearing Mice. *PLoS One* **10**, e0121921 (2015).

53. Ouzounova, M. *et al.* Monocytic and granulocytic myeloid derived suppressor cells differentially regulate spatiotemporal tumour plasticity during metastatic cascade. *Nat Commun* **8**, 14979 (2017).

54. Bosiljcic, M. *et al.* Targeting myeloid-derived suppressor cells in combination with primary mammary tumor resection reduces metastatic growth in the lungs. *Breast Cancer Research* **21**, 103 (2019).

55. Pingili, A. K. *et al.* Immune checkpoint blockade reprograms systemic immune landscape and tumor microenvironment in obesity-associated breast cancer. *Cell Reports* **35**, 109285 (2021).

56. Wu, C. *et al.* Tumor microenvironment following Gemcitabine treatment favors differentiation of immunosuppressive Ly6Chigh myeloid cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **204**, 212 (2020).

57. Vila-Leahey, A. *et al.* Ranitidine modifies myeloid cell populations and inhibits breast tumor development and spread in mice. *Oncoimmunology* **5**, e1151591 (2016).

58. Hiraga, T., Ito, S. & Mizoguchi, T. Opposing Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on the Initiation and Progression of Breast Cancer Bone Metastases. *Molecular Cancer Research* **19**, 2110–2119 (2021).

59. Ravindranathan, S. *et al.* Tumor-derived granulocyte colony-stimulating factor diminishes efficacy of breast tumor cell vaccines. *Breast Cancer Research* **20**, 126 (2018).

60. Lelis, F. J. N. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses. *Immunol Lett* **188**, 108–115 (2017).

61. Wang, Y. *et al.* Myeloid-Derived Suppressor Cells Impair B Cell Responses in Lung Cancer through IL-7 and STAT5. *The Journal of Immunology* **201**, 278–295 (2018).

62. Knier, B. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells control B cell accumulation in the central nervous system during autoimmunity. *Nat Immunol* **19**, 1341–1351 (2018).

63. Garnier, L., Gkountidi, A.-O. & Hugues, S. Tumor-Associated Lymphatic Vessel Features and Immunomodulatory Functions. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).

64. Louie, D. A. P. *et al.* Tumor-Draining Lymph Node Reconstruction Promotes B Cell Activation During E0771 Mouse Breast Cancer Growth. *Front Pharmacol* **13**, 825287 (2022).

65. Gu, Y. *et al.* Tumor-educated B cells selectively promote breast cancer lymph node metastasis by HSPA4-targeting IgG. *Nat Med* **25**, 312–322 (2019).

66. Díaz-Zaragoza, M., Hernández-Ávila, R. & Ostoa-Saloma, P. Recognition of tumor antigens in 4T1 cells by natural IgM from three strains of mice with different susceptibilities to spontaneous breast cancer. *Oncol Lett* **13**, 271–274 (2017).

67. Li, Q. *et al.* Adoptive transfer of tumor reactive B cells confers host T-cell immunity and tumor regression. *Clin Cancer Res* **17**, 4987–4995 (2011).

68. Santander, A. M. *et al.* Paracrine Interactions between Adipocytes and Tumor Cells Recruit and Modify Macrophages to the Mammary Tumor Microenvironment: The Role of Obesity and Inflammation in Breast Adipose Tissue. *Cancers* **7**, 143–178 (2015).

69. Walker II, W. H. *et al.* Mammary Tumors Induce Central Pro-inflammatory Cytokine Expression, but Not Behavioral Deficits in Balb/C Mice. *Sci Rep* **7**, 8152 (2017).

70. Laumont, C. M., Banville, A. C., Gilardi, M., Hollern, D. P. & Nelson, B. H. Tumour-infiltrating B cells: immunological mechanisms, clinical impact and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **22**, 414–430 (2022).

71. Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 429–457 (2012).

72. O'Melia, M. J., Manspeaker, M. P. & Thomas, S. N. Tumor-draining lymph nodes are survival niches that support T cell priming against lymphatic transported tumor antigen and effects of immune checkpoint blockade in TNBC. *Cancer Immunol Immunother* **70**, 2179–2195 (2021).

73. Tao, H. *et al.* Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. *European Journal of Immunology* **45**, 999–1009 (2015).

74. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **12**, 31–46 (2022).

75. Gupta, S. L., Khan, N., Basu, S. & Soni, V. B-Cell-Based Immunotherapy: A Promising New Alternative. *Vaccines (Basel)* **10**, 879 (2022).

76. Flores-Borja, F. & Blair, P. Mechanisms of induction of regulatory B cells in the tumour microenvironment and their contribution to immunosuppression and pro-tumour responses. *Clinical and Experimental Immunology* **209**, 33–45 (2022).

77. He, Y. *et al.* The Roles of Regulatory B Cells in Cancer. *J Immunol Res* **2014**, 215471 (2014).

78. Shen, M. *et al.* A novel MDSC-induced PD-1 $^{-}$ PD-L1 $^{+}$ B-cell subset in breast tumor microenvironment possesses immuno-suppressive properties. *OncoImmunology* **7**, e1413520 (2018).

79. Das, S. & Bar-Sagi, D. BTK signaling drives CD1dhiCD5+ regulatory B-cell differentiation to promote pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* **38**, 3316–3324 (2019).

80. Horikawa, M., Minard-Colin, V., Matsushita, T. & Tedder, T. F. Regulatory B cell production of IL-10 inhibits lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Clin Invest* **121**, 4268–4280 (2011).

81. Triebel, Jitsukawa & Baixeras. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* **171**, 1393–1405 (1990).

82. Long, L. *et al.* The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer* **9**, 176–189 (2018).

83. Kisielow, M., Kisielow, J., Capoferri-Sollami, G. & Karjalainen, K. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol* **35**, 2081–2088 (2005).

84. Ming, Q. *et al.* LAG3 ectodomain structure reveals functional interfaces for ligand and antibody recognition. *Nat Immunol* **23**, 1031–1041 (2022).

85. Amara, K. *et al.* B cells expressing the IgA receptor FcRL4 participate in the autoimmune response in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity* **81**, 34–43 (2017).

86. Siewe, B., Nipper, A. J., Sohn, H., Stapleton, J. T. & Landay, A. FcRL4 Expression Identifies a Pro-inflammatory B Cell Subset in Viremic HIV-Infected Subjects. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).

87. Ehrhardt, G. R. A. *et al.* Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *J Exp Med* **202**, 783–791 (2005).

88. Moir, S. *et al.* Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* **205**, 1797–1805 (2008).

89. Yeo, L. *et al.* Expression of FcRL4 defines a pro-inflammatory, RANKL-producing B cell subset in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **74**, 928–935 (2015).

90. Gao, X. & Cockburn, I. A. The development and function of CD11c+ atypical B cells - insights from single cell analysis. *Front Immunol* **13**, 979060 (2022).

91. Dai, D. *et al.* The transcription factor Zeb2 drives formation of age-associated B cells. 2021.07.24.453633 Preprint at https://doi.org/10.1101/2021.07.24.453633 (2023).

92. Good-Jacobson, K. L. *et al.* PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* **11**, 535–542 (2010).

93. Thibult, M.-L. *et al.* PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* **25**, 129–137 (2013).

94. Sahoo, N. C., Rao, K. V. S. & Natarajan, K. CD80 expression is induced on activated B cells following stimulation by CD86. *Scand J Immunol* **55**, 577–584 (2002).

95. Good-Jacobson, K. L., Song, E., Anderson, S., Sharpe, A. H. & Shlomchik, M. J. CD80 expression on B cells regulates murine T follicular helper development, germinal center B cell survival and plasma cell generation. *J Immunol* **188**, 4217–4225 (2012).

Acknowledgments

We would like to express our acknowledgment to Prof. Dra. Catarina Raposo Dias Carneiro from Unicamp University for kindly donating the E0771 murine breast cell line for the conduction of the experiments. We also would like to thank the Brazilian funding agencies CAPES, CNPq, and FAPEMIG for sponsoring this research.

Authors information

Authors and Affiliations

Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte — MG, 31270-901, Brazil

Igor Visconte Gonçalves, Lícia Torres, Mariana de Almeida Oliveira, Christiana da Silva Leite, José Miguel Ortega, Ana M. Caetano Faria, Liza F. Felicori

NYU Grossman School of Medicine, NYU Langone Health, New York University, 550 1st Ave – New York, NY 10016, United States of America

Natália Pinheiro-Rosa

Department of Pharmacology, Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte — MG, 31270-901, Brazil

Miriam Teresa Paz Lopes

Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Pesquisa, Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional - Rua André Cavalcanti, 37, 1 Andar, Centro, 20231050 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Gabriela Rapozo Guimarães, Mariana Boroni

Contributions

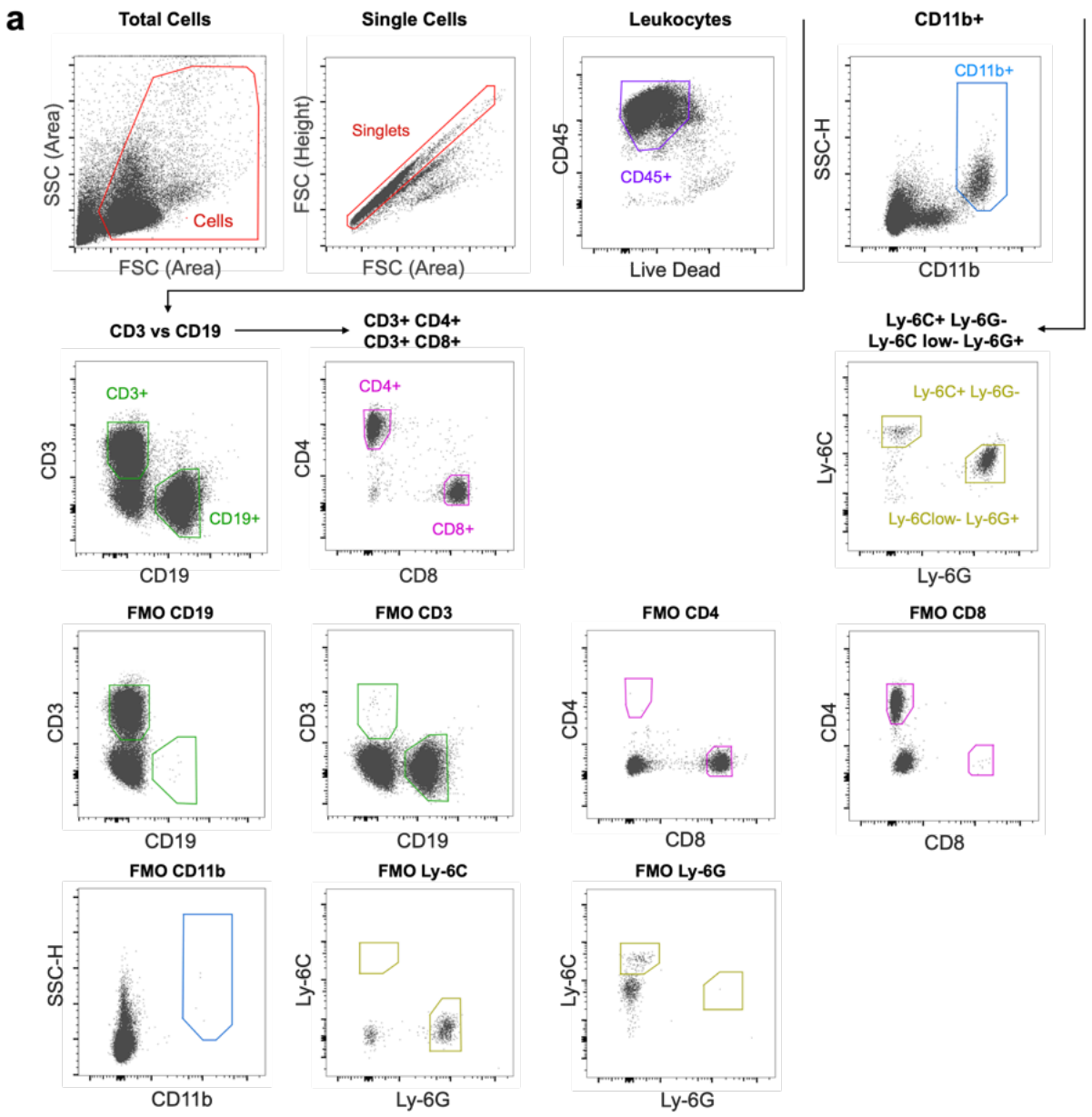
A.M.C.F., L.F.F., and J.M.O. provided the conceptual idea of this research. I.V.G., L.C., M.A.O., C.S.L., N.P-R., performed the experiments. M.T.P.L. helped with cell culture. G.R.G. conducted scRNA-seq analysis. I.V.G. conducted all the data analysis, as well as drawing figures, and charts, which was revised by L.F.F., M.L.B.M., and A.M.C.F.. I.V.G. was the major contributor to the writing of this manuscript, which was revised by L.F.F. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Supplementary Material



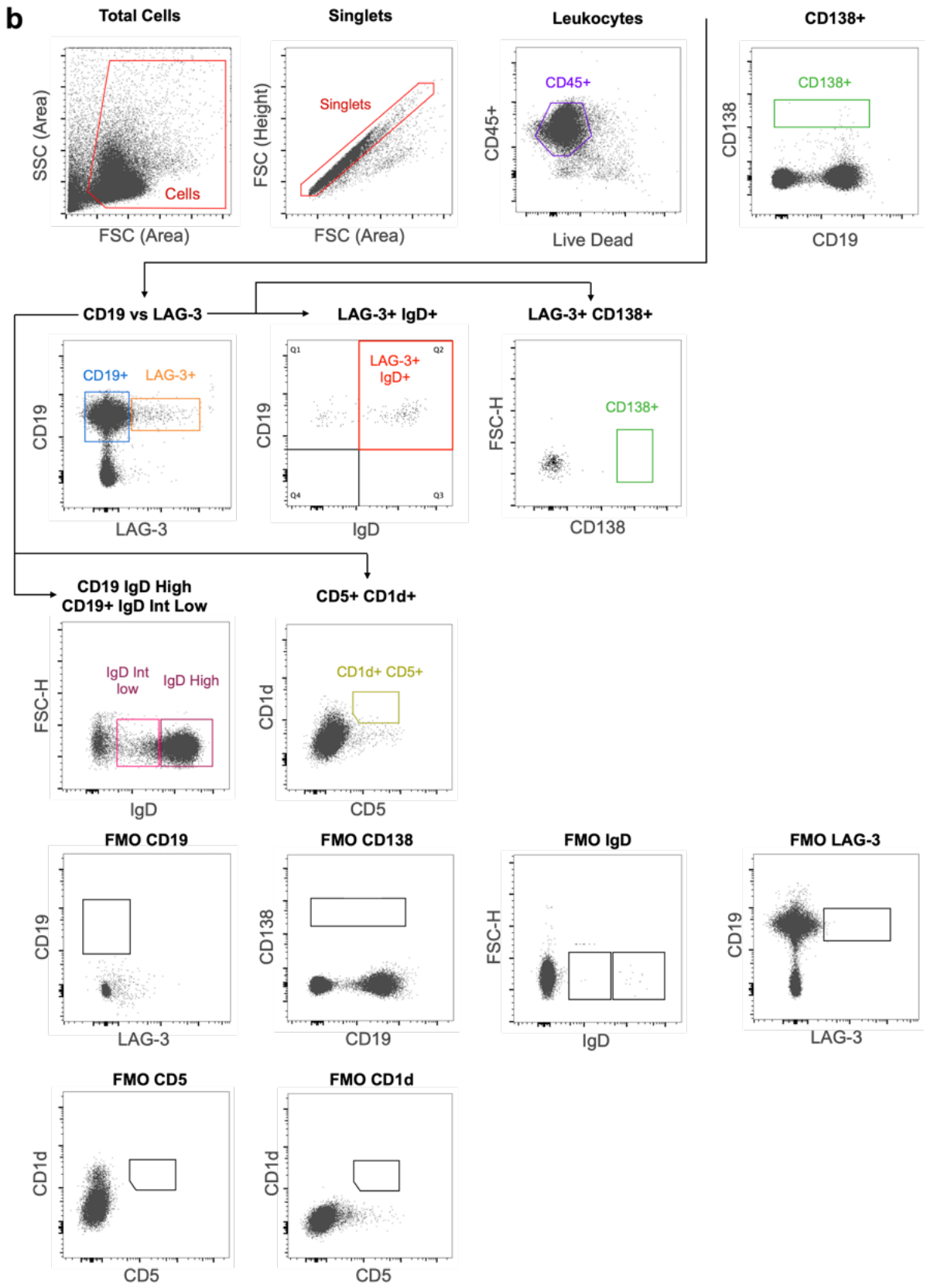


Figure S1. Gating strategies for the assessment of myeloid and lymphoid cells. Total cells were gated by plotting forward scatter area (FSC-A) versus side scatter area (SSC-A). Single cells were selected by plotting forward scatter area (FSC-A) versus forward scatter height. Live cells were selected by gating

unstained cells for the viability dye. Total leukocytes in the samples were selected by gating CD45+ cells. **(a)** Lymphoid cell populations were gated by plotting CD19 versus CD3, and myeloid cells were gated by plotting side scatter height (SSC-H) versus CD11b. Each population of interest were gated as follows: B Cell (CD45+ CD19+); TCD4 Cells (CD45+ CD3+ CD4+); TCD8 Cells (CD45+ CD3+ CD8+); Polymorphonuclear myeloid cells (CD11b+ Ly-6G+ Ly-6C-); Mononuclear myeloid cells (CD11b+ Ly-6G- Ly-6C+). **(b)** Each population of interest were gated as follows: B Cell (CD45+ CD19+); Plasma cells (CD45+ CD138+); B10 B cell (CD45+ CD19+ CD5+ CD1d+), Naive B Cell (CD45+ CD19+ IgD High), Early-activated B cells (CD45+ CD19+ IgD Int Low); B Cell LAG-3+ subsets (CD45+ CD19+ LAG-3+): IgD Int Low, IgD High, CD138+.

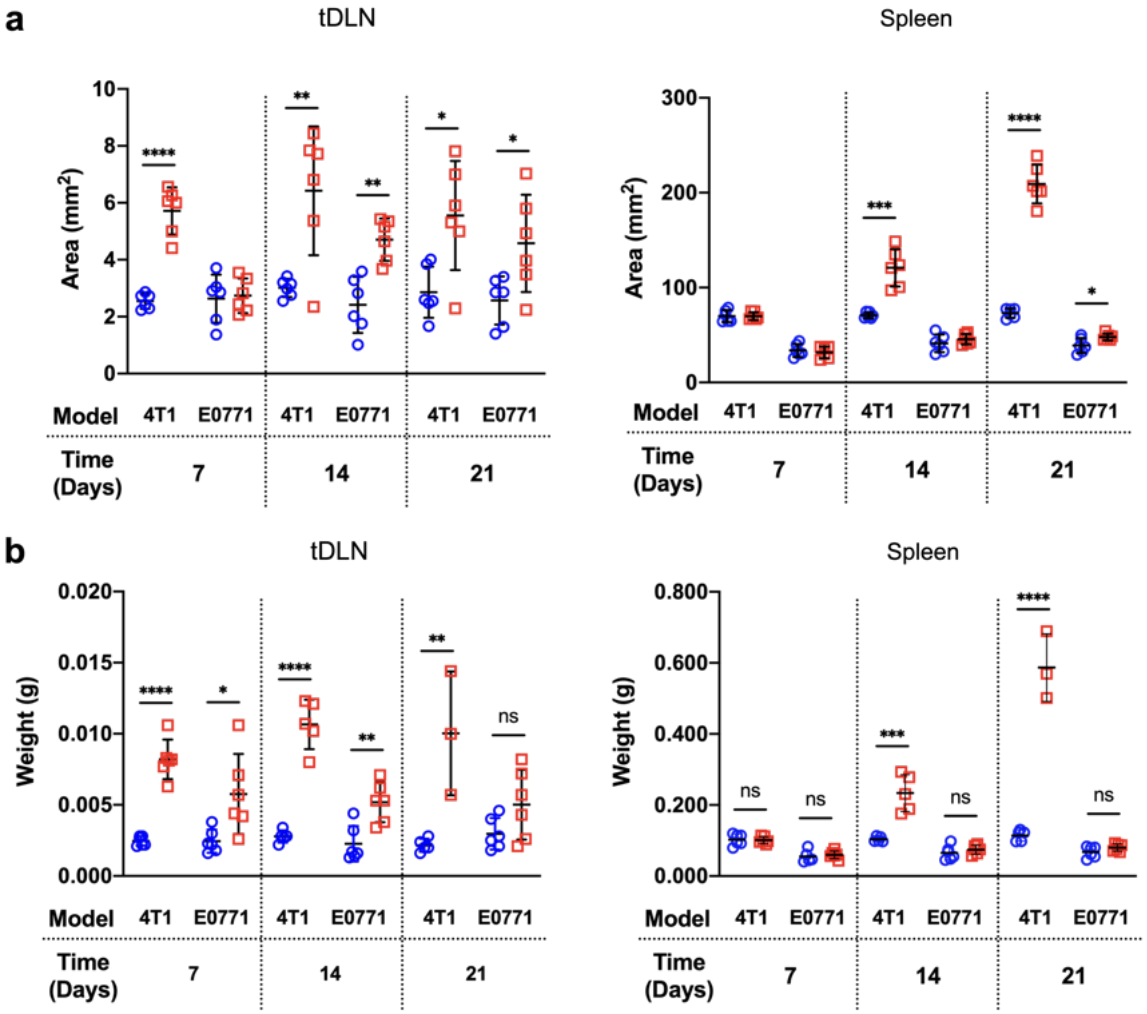


Figure S2. Area and weight of spleen and tDLNs. Area of the tDLNs (right) and the spleen (right) in mice from control (blue) and 4T1/E0771 tumor-bearing mice after 7, 14 and 21 days of tumoral challenge **(a).** Weight of the tDLNs (right) and the spleen (right) in mice from control (blue) and 4T1/E0771 tumor-bearing mice after 7, 14 and 21 days of tumoral challenge **(b).** Student t-test. p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

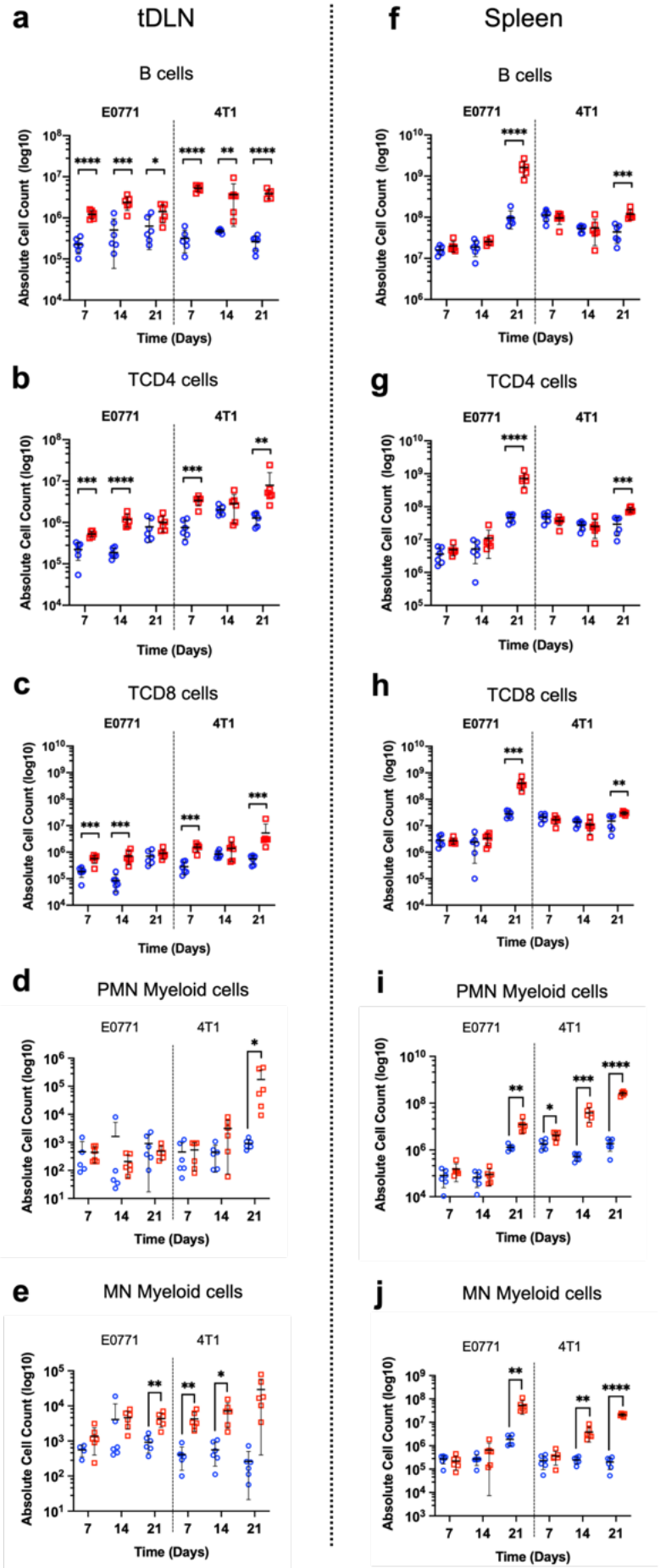

a
tDLN
B cells
E0771
4T1
Absolute Cell Count (log10)
Time (Days)
b
TCD4 cells
c
TCD8 cells
d
PMN Myeloid cells
e
MN Myeloid cells
f
Spleen
B cells
g
TCD4 cells
h
TCD8 cells
i
PMN Myeloid cells
j
MN Myeloid cells

Figure S3. Absolute cell count for lymphoid and myeloid cells in the tDLN and spleen. Cell count for B cells **(a, f)**, TCD4 cells **(b, g)**, TCD8 cells **(c, h)**, PMN myeloid cells **(d, i),** and MN myeloid cells **(e, j)** in the tDLNs and the spleen from control (blue) and 4T1/E0771 tumor-bearing mice (red) 7, 14 and 21 days after the initial inoculation, respectively**.** Student t-test. p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

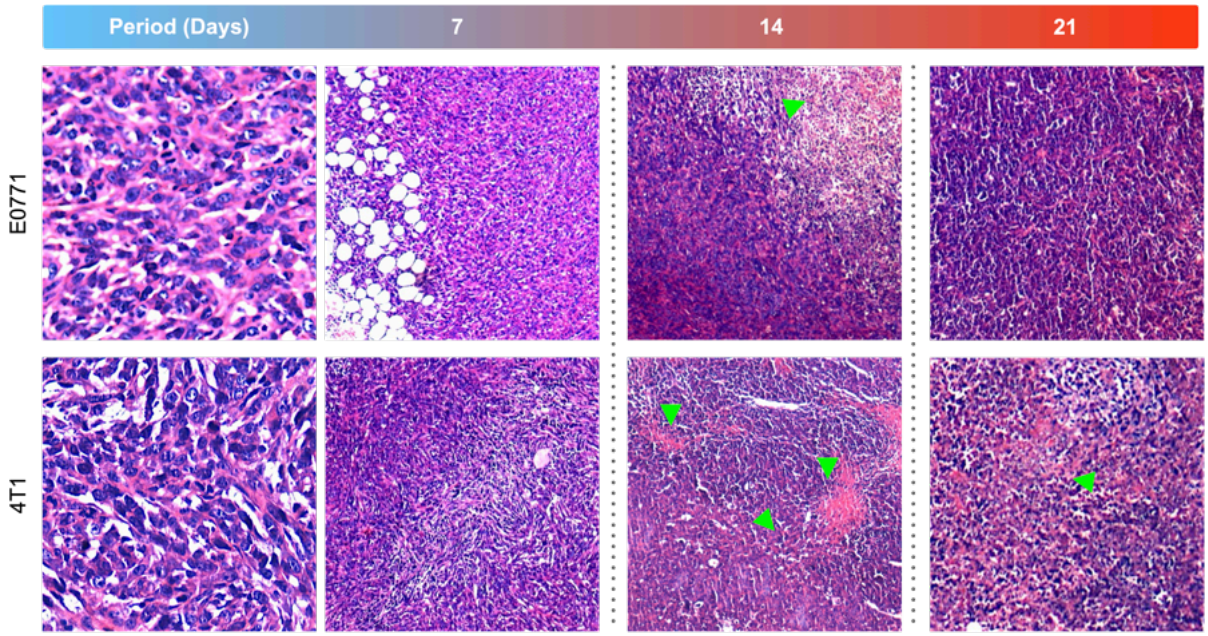


Figure S4. Histopathological evaluation of 4T1 and E0771 induced tumors. Representative image of 4T1 (upper row) and E0771 (bottom row) induced tumors after 7, 14 and 21 days of development. Tumor slides stained in Hematoxylin and Eosin (H&E) and analyzed under light microscopy (column 1: 40x magnification, columns 2-4: 4x magnification) Green arrows indicating necrotic areas.