

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-graduação em Patologia

Adriana Jacauna de Oliveira

**Perfil clínico-histopatológico e imunológico do carcinoma invasor de mama em diferentes estadiamentos.**

Belo Horizonte

2022

Adriana Jacauna de Oliveira

**Perfil clínico-histopatológico e imunológico do carcinoma invasor de mama em diferentes estadiamentos.**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Investigativa.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiana Nunes Buzelin

Coorientadora: Dra. Patrícia Rocha Martins

Belo Horizonte

2022

043

Oliveira, Adriana Jacauna de.

Perfil clínico-histopatológico e imunológico do carcinoma invasor de mama em diferentes estadiamentos [manuscrito] / Adriana Jacauna de Oliveira. – 2022.

59 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiana Nunes Buzelin. Coorientadora: Dra. Patrícia Rocha Martins.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Neoplasias da Mama. 3. Estadiamento de Neoplasias. 4. Resposta imune. I. Buzelin, Cristiana Nunes. II. Martins, Patrícia Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 445 DE ADRIANA JACAUNA DE OLIVEIRA**

Realizou-se, no dia 31 de maio de 2022, às 15 horas, no formato *on-line*, a defesa de Dissertação, intitulada "*PERFIL CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICO E IMUNOLÓGICO DO CARCINOMA INVASOR DE MAMA EM DIFERENTES ESTADIAMENTOS*", apresentada por Adriana Jacauna de Oliveira, número de registro 2020673287, graduado no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: *Prof. Paulo Henrique Costa Diniz* – Faculdade De Medicina/UFMG; *Profª. Camila Franca Campos* – Faculdade De Medicina/UFMG; *Residente Pós-Doc Dra. Patrícia Rocha Martins* – ICB/UFMG – COORIENTADORA; *Profª. Cristiana Buzelin Nunes* – Faculdade De Medicina/UFMG – ORIENTADORA.

A Comissão considerou a Dissertação:

- Aprovada  
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 31 de maio de 2022.

\* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Rocha Martins**, Usuário Externo, em 20/06/2022, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Buzelin Nunes**, Membro, em 24/06/2022, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Franca Campos**, Professora do Magistério Superior, em 24/06/2022, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Costa Diniz**, Membro, em 30/06/2022, às 12:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1528718** e o código CRC **695F0089**.

## RESUMO

O câncer de mama (CM) continua sendo o tipo mais frequente de neoplasia entre as mulheres. No Brasil foram estimados em 2022, aproximadamente, 43,74 novos casos a cada 100 mil indivíduos. Estratégias que proporcionem maior rastreamento e fatores preditivos de resposta certamente aumentarão a sobrevida dessas pacientes. Nesse contexto, a caracterização dos diferentes tipos celulares do microambiente tumoral é crucial para a identificação de potenciais alvos preditivos de resposta ao tratamento. Esse estudo visa caracterizar o perfil clínico-anatomopatológicos e imunológicos de carcinomas invasores em pacientes com CM, em diferentes estadiamentos. Aqui, investigamos os linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, os macrófagos CD68<sup>+</sup> associados a tumores (TAMs) que participam do controle da resposta imune e estão relacionados a sobrevida de pacientes com CM. Realizamos também a caracterização dos *immune checkpoints* PD-1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> e PD-L2<sup>+</sup> moléculas envolvidas na supressão da resposta anti-tumoral. Secções de amostras de trinta e duas pacientes portadoras de CM, foram submetidas a técnica de imuno-histoquímica para os marcadores CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD68<sup>+</sup>, PD1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> e PD-L2<sup>+</sup>, em seguida foram avaliadas a expressão destas células na região intratumoral. Na análise entre grupos de estadios e variáveis clínico-histopatológicos foi visto associação entre os estadios e tamanho do tumor, receptor de estrogênio e progesterona e carcinoma *in situ*. Os resultados demonstraram que as pacientes com estadios III e IV possuem maior quantidade de TILs e TAMs nas amostras antes do tratamento. Também foi observado a correlação entre linfócitos T (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>) e os marcadores de *immune checkpoints*. Associações significativas entre TILs e alguns fatores clínicos e patológicos, tornam sua avaliação uma ferramenta para uso futuro na prática clínica.

Palavras-chave: TILs, câncer de mama, imunologia tumoral, pontos de verificação imunes, estadios.

## ABSTRACT

Breast cancer (BC) remains the most frequent type of neoplasm among women. In Brazil were estimated in 2022, approximately 43.74 new cases per 100,000 individuals. Strategies that provide greater screening and response predictive factors will certainly increase the survival of these patients. In this context, the characterization of the different cell types in the tumor microenvironment is crucial for the identification of potential predictive targets of treatment response. This study aims to characterize the clinical, anatomopathological and immunological profile of invasive carcinomas in patients with BC, in different stages. Here, we investigated CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), CD68<sup>+</sup> tumor-associated macrophages (TAMs) that participate in the control of the immune response and are related to the survival of patients with BC. We also performed the characterization of the PD-1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> and PD-L2<sup>+</sup> immune checkpoints molecules involved in the suppression of the antitumor response. Sections of samples from thirty-two patients with BC were submitted to immunohistochemistry technique for the markers CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup>, PD1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> and PD-L2<sup>+</sup>, then the expression of these cells in the intratumoral region was evaluated. In the analysis between groups of stages and clinico-histopathological variables, an association between stages and tumor size, estrogen and progesterone receptor and carcinoma in situ was observed. The results showed that patients with stages III and IV have a higher amount of TILs and TAMs in the samples before treatment. A correlation was also observed between T lymphocytes (CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>) and immunocheckpoint markers. Significant associations between TILs and some clinical and pathological factors make their assessment a tool for future use in clinical practice.

*Keywords:* TILs, breast cancer, tumor immunology, immune checkpoints, stages.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação das taxas de incidência do CM, por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2022.....	11
Figura 2 - Estadio 1 do Câncer da Mama.....	14
Figura 3 - Estadio 2 do Câncer de Mama.....	15
Figura 4 - Estadio 3A do Câncer de Mama.....	16
Figura 5 - Estádios 3B e 3C do Câncer de Mama.....	17
Figura 6 - Principais subconjuntos de células imunes no microambiente tumoral de câncer de mama.....	21
Figura 7- Fotomicrografias de secções coradas em Hematoxilina & Eosina, indicando a porcentagem de Linfócitos Infiltrantes Tumoriais (TILs) em lesões de câncer de mama.....	31
Figura 8 - Caracterização de linfócitos CD8 <sup>+</sup> em tumores mamários com estádios I - II e III - IV.....	33
Figura 9 - Caracterização de linfócitos CD4 <sup>+</sup> em tumores mamários com estádios I - II e III - IV.....	34
Figura 10 - Caracterização de linfócitos CD68 <sup>+</sup> em tumores mamários com estádios I - II e III - IV.....	35
Figura 11 - Caracterização de linfócitos PD1 <sup>+</sup> em tumores mamários com estádios I - II e III - IV.....	36
Figura 12 - Caracterização de linfócitos PD-L1 <sup>+</sup> em tumores mamários com estádios I - II e III - IV.....	37
Figura 13 - Caracterização de linfócitos PD-L2 <sup>+</sup> em tumores mamários com estadiamentos I - II e III - IV.....	38

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1-Representação da análise morfométrica da porcentagem TILs.....	32
Gráfico 2 – Quantificação de marcadores em pacientes portadoras de metástase a distância e não portadoras de metástase a distância.....	39
Gráfico 3 - Análise de correlação entre % TILs e marcadores imunológicos.....	40
Gráfico 4 - Análise de correlação entre CD8 e demais marcadores imunológicos....	41
Gráfico 5 - Análise de correlação entre CD4 e demais marcadores imunológicos.....	42
Gráfico 6 - Análise de correlação entre CD68 e marcadores imunológicos.....	42
Gráfico 7 - Análise de correlação entre o <i>imunocheckpoint</i> PD1 e demais marcadores imunológicos.....	43
Gráfico 8 - Análise de correlação entre os <i>imunocheckpoints</i> PD-L1 e PD-L2.....	43
Gráfico 9 - Distribuição de TILs nos grupos de estadiamento.....	44
Gráfico 10 - Distribuição de TILs nos grupos moleculares de câncer de mama.....	45
Gráfico 11 - Curva de sobrevida em pacientes pertencentes aos estadios I e II, III e IV.....	45



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados no estudo, especificações de uso e padrões de marcação.....	26
Tabela 2 - Teste de associação entre os grupos de estadiamento e variáveis histopatológicas.....	28
Tabela 3 - Teste de associação entre os grupos de estadiamento e variáveis clínicas.....	30
Tabela 4 - Expressão tumoral do <i>immune checkpoint</i> PD-L1.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CLIS	Carcinoma lobular in situ
CM	Câncer de mama
DAB	Diaminobenzidina
FISH	Hibridização in situ por fluorescência
HER2	Receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano
IFN $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
IMP	Instituto Mário Penna
MAT	Microambiente tumoral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Células natural killer
NEP	Núcleo de Ensino e Pesquisa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PBSA	<i>Albumine Phosphate buffer solution</i>
PD1	Proteína de morte celular programada 1
PD-L1	Ligante de morte programada 1
PD-L12	Ligante de morte programada 2
RE	Receptor de estrôgeno
RP	Receptor de progesterona
RPC	Resposta patológica completa
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TFH	Células auxiliares foliculares T
TILs	Linfócitos infiltrantes do Tumor
TAMs	Macrófagos associados a tumores
TMN	Estadiamento tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

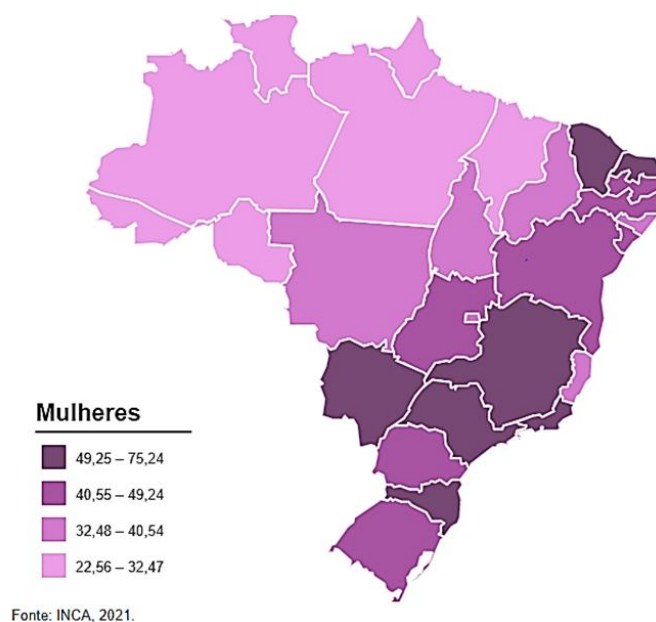
## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 Câncer de mama.....	11
1.2 Infiltração linfocitária no microambiente tumoral do câncer de mama.....	19
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 Grupo de estudo.....	23
4.2 Critérios de inclusão.....	24
4.3 Dados clínicos e anátomo-patológicos.....	24
4.4 Análise do infiltrado inflamatório tumoral.....	25
4.5 Imuno-histoquímica.....	25
4.6 Análise morfométrica.....	26
4.7 Análise estatística.....	27
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 Amostra e caracterização clínico-patológica.....	27
5.2 Análise do infiltrado inflamatório tumoral.....	30
5.3 Marcadores imunológicos no câncer de mama (CM).....	32
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>57</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 O câncer de mama

As neoplasias malignas configuram um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O câncer de mama (CM) é o tipo mais frequente de neoplasia entre as mulheres com 2,3 milhões de novos casos em 2020 e 685.000 mortes, estando entre a quinta causa de morte pela doença em todo mundo (SUNG et al., 2021). No Brasil foram estimados 66.280 novos casos de CM em 2022, com aproximadamente 43,74 novos casos a cada 100 mil indivíduos (INCA 2021).



**Figura 1.** Representação das taxas de incidência do CM, por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2022 (Adaptado: INCA).

O CM é visto como uma doença que acomete principalmente mulheres acima dos 40 anos. Nos homens também há relatos da doença, porém em número bem mais raro, a incidência nesse grupo é de 1% de todos os casos diagnosticados (INCA, 2019).

Apesar de sua evolução na incidência se apresentar ascendente, o CM vem apresentando tendência de declínio da mortalidade em países desenvolvidos (FERLAY et al., 2018). Acredita-se que essa relação se dá ao diagnóstico precoce e maior acesso da doença, melhorando assim a sobrevida (DOS SANTOS et al., 2022). Entretanto, a mortalidade no Brasil permanece elevada, sendo considerado como motivo principal o diagnóstico tardio da doença (OHL et al., 2016)

A mama feminina madura é composta por lóbulos e ductos, que são revestidos pois células luminais e mioepiteliais. As células luminais estão situadas na porção interna, são colunares, e possuem a capacidade de absorver e secretar fluidos, são de fenótipo epitelial, expressando receptores de estrogênio,  $\alpha$ -lactoalbumina e ceratinas (7,18 e 18). A camada mais externa é formada por células mioepiteliais, que possuem morfologia diversa (células arredondadas ou alongadas) (BRASILEIRO Gerado 2016).

No período de reprodução, a mama sofre alterações cíclicas em resposta a alterações hormonais ditadas pelo ciclo menstrual. Após a ocorrência da menopausa, o tecido adiposo e conjuntivo aumentam, e o tecido mamário glandular se torna retraído fazendo com que a mama modifique o seu tamanho e forma. Com o aumento da expressão da enzima aromatase (com a diminuição do estrogênio circulante), é mais suscetível o aumento de inflamação no tecido adiposo (FIGUEIREDO, 2019).

Alterações na glândula mamária podem dar início a carcinomas. Quando não ultrapassam a membrana basal do tecido são chamados de “in situ”. O carcinoma ductal in situ (CDIS) apresenta crescimento para dentro do lúmen do ducto e forma calcificações intraluminais detectáveis em mamografias. Porém, os considerados invasivos, infiltram o estroma adjacente formando ninhos de células atípicas heterogêneas e substituição do tecido adiposo por tecido conjuntivo, conhecido como resposta desmoplásica. Já o carcinoma lobular “in situ” (CLIS), observa-se a preservação da arquitetura tecidual, com células de núcleos ovais ou arredondados, morfologia que se mantém quando se torna infiltrante, porém, as células invadem o estroma formando fileiras isoladas, que apresentam fraca coesão pela mutação com perda de função da E-caderina (LUZ et al., 2021). O tipo mais comum de carcinoma invasivo é o ductal, que corresponde a 75% de todos os cânceres de mama, e o segundo tipo especial é o carcinoma lobular, representando de 5 a 10% dos diagnósticos de câncer de mama (BURKE et al., 2019).

Sendo uma doença altamente complexa e heterogênea, o comportamento tumoral, o potencial de recidiva e a sobrevida global podem ser parcialmente estimados, por meio de características clínico-patológicas, como o tamanho do tumor, o grau histológico e o comprometimento de linfonodos. Tais características determinam o estadiamento tumoral (TNM) de acordo com o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019). Após o diagnóstico clínico é necessária uma avaliação histopatológica do tumor primário, por

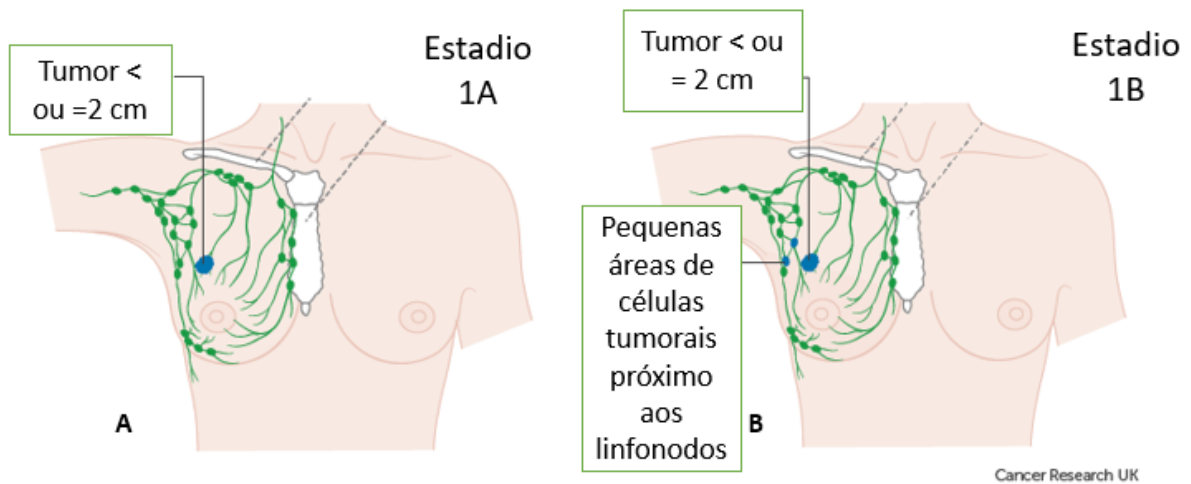
meio de imuno-histoquímica, em que se determina o perfil molecular do CM (GODOY-ORTIZ et al., 2019).

O estadiamento clínico é atribuído através de exame físico e de imagem, enquanto o estágio patológico é atribuído após a cirurgia, variando de acordo com o sistema de estadiamento TNM (T = tumor, N = grau de disseminação para linfonodos e M = metástase) (LIMA; SILVA, 2020). O objetivo do estadiamento é predizer o prognóstico do paciente e determinar um plano de tratamento com base nessa avaliação (SAWAKI; SHIEN; IWATA, 2019).

Na 8ª edição do estadiamento descrito pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), foram inseridos fatores biológicos, incluindo grau do tumor, receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), receptor de estrogênio (ER) e status do receptor de progesterona (PR) proporcionando uma estratificação de risco mais adequada em relação à sobrevida, e proporcionando também um tratamento mais assertivo e individualizado (LI et al., 2022).

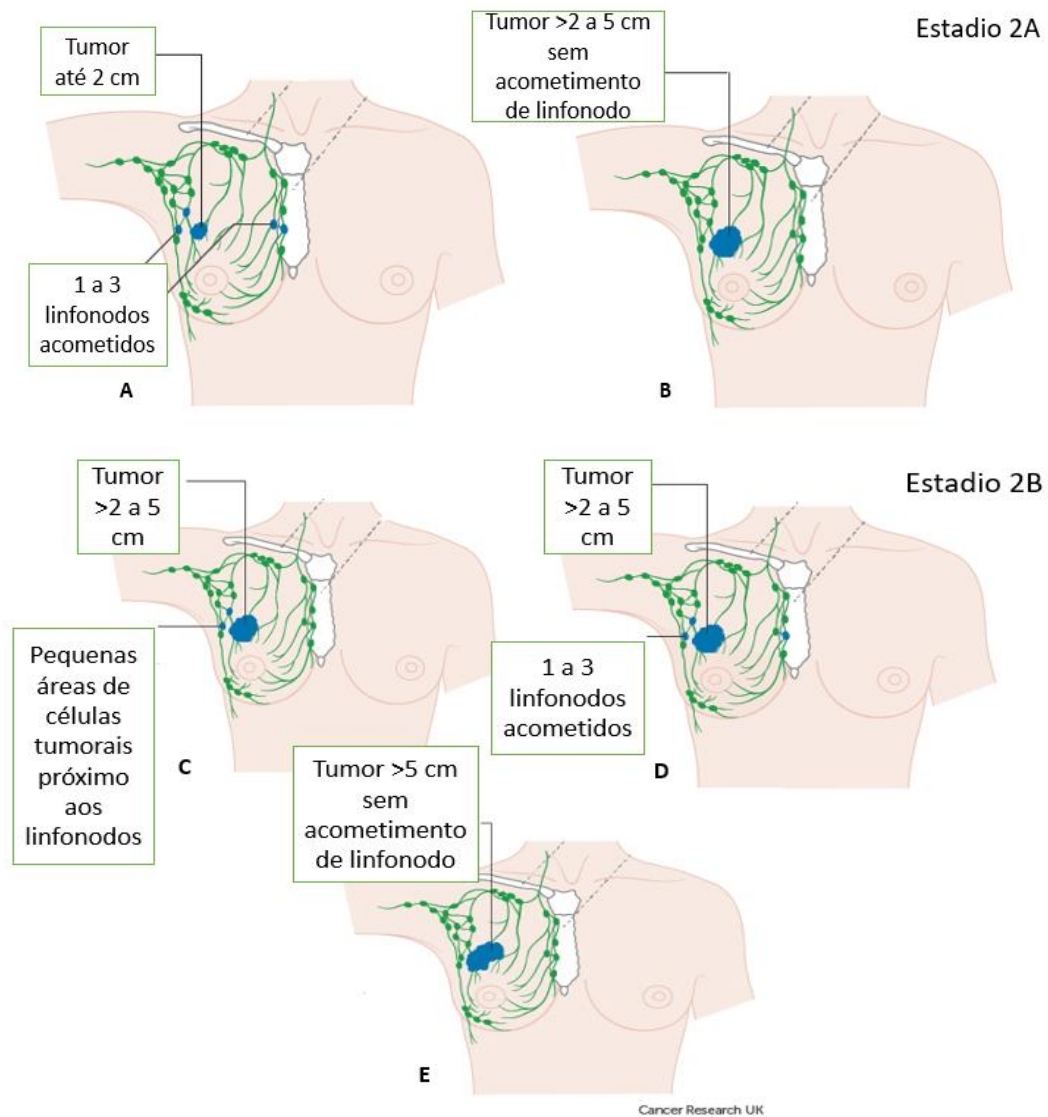
Os estadios consistem em classificar o tumor de acordo com o tamanho e a sua extensão (se já atingiu os linfonodos e já se disseminou para outros tecidos do organismo). Segue classificação simplificada dos estadios:

Estadio 1: É o CM em estágio inicial, pode ser dividido em duas subcategorias: Estadio 1, o tumor tem tamanho menor ou igual a 2 cm e não se observa comprometimento de linfonodos ou outros tecidos (Figura 2A). No estadio 1B- o tumor possui tamanho menor ou igual a 2 cm, porém são encontradas pequenas áreas de células neoplásicas nos linfonodos próximos da mama (Figura 2B) (BRIERLEY et., al 2017).



**Figura 2: Estadio 1 do Câncer da Mama-** Imagem A: Estadio 1A, tumor menor ou igual a 2 cm e sem acometimento de linfonodos. Imagem B: Estadio 1B, tumor menor ou igual 2 cm apresentando comprometimento de linfonodo (adaptado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer>).

Estadio 2: São tumores ainda iniciais que acometem a mama, os linfonodos, ou ambos. Podem também ser subdivididos em 2 categorias: Estadio 2A- São tumores com tamanho de até 2 cm, com comprometimento de 1 a 3 linfonodos axilares (Figura 3-A); ou tumores maiores que 2 a 5 cm sem acometimento de linfonodo (Figura 3-B). Estadio 2B – São os tumores maiores que 2 a 5 cm com pequenas áreas de células tumorais próximas aos linfonodos axilares (Figura 3-C). Tumores maiores que 2 a 5 cm com comprometimento de 1 a 3 linfonodos axilares (Figura 3-D), ou tumores maiores que 5 cm sem comprometimento de linfonodos (Figura 3-E) (BRIERLEY et., al 2017).

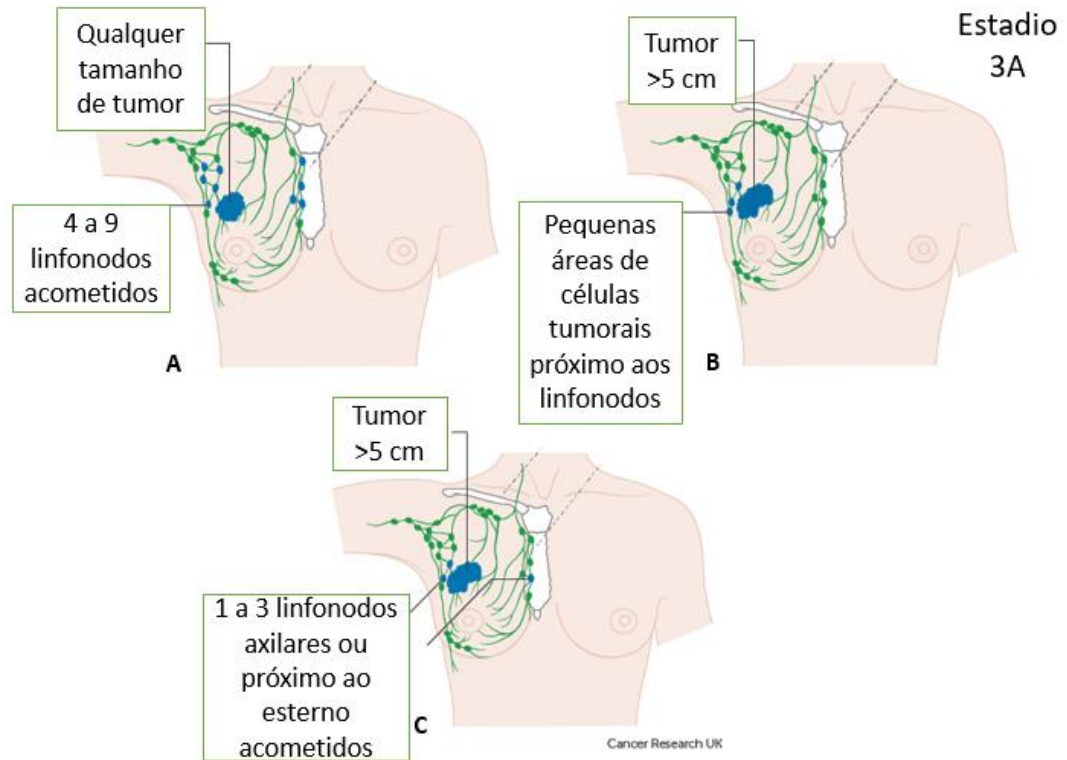


**Figura 3: Estadio 2 do Câncer de Mama** – Imagens A e B, tamanho do tumor e acometimento de linfonodos no estadio 2A. Imagens C, D e E, tamanho do tumor e acometimento de linfonodos no estadio 2B (adaptado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2>).

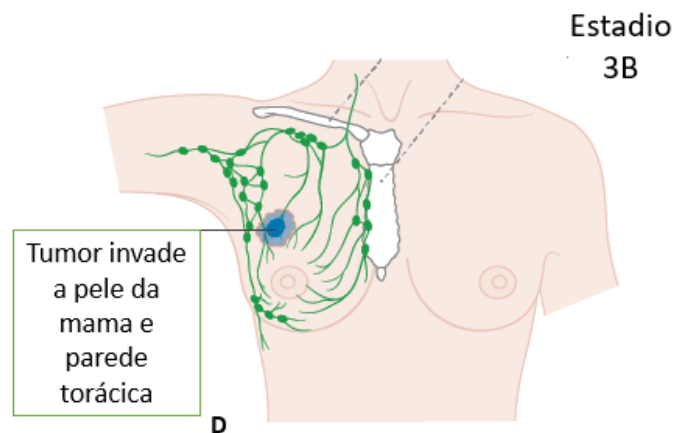
Estadio 3: São os tumores que já invadiram a pele da mama, linfonodos e parede torácica, são designados como CM localmente avançado. É subdividido nas seguintes subcategorias: Estadio 3A – São tumores com qualquer tamanho e comprometimento de 4 a 9 linfonodos axilares (Figura 4-A). Tumores maiores que 5 cm tem mais do que 5 cm e com pequenas áreas de células tumorais próximas aos linfonodos axilares (Figura 4-B) ou tumores maiores de 5 cm com comprometimento de 1 a 3 linfonodos axilares ou próximos ao esterno (Figura 4-C). Estadio 3B – São tumores que invadiram a pele ou a parede torácica e que ainda podem acometer os linfonodos (Figura 5-D). Estadio 3C – São tumores que invadiram a pele da mama,

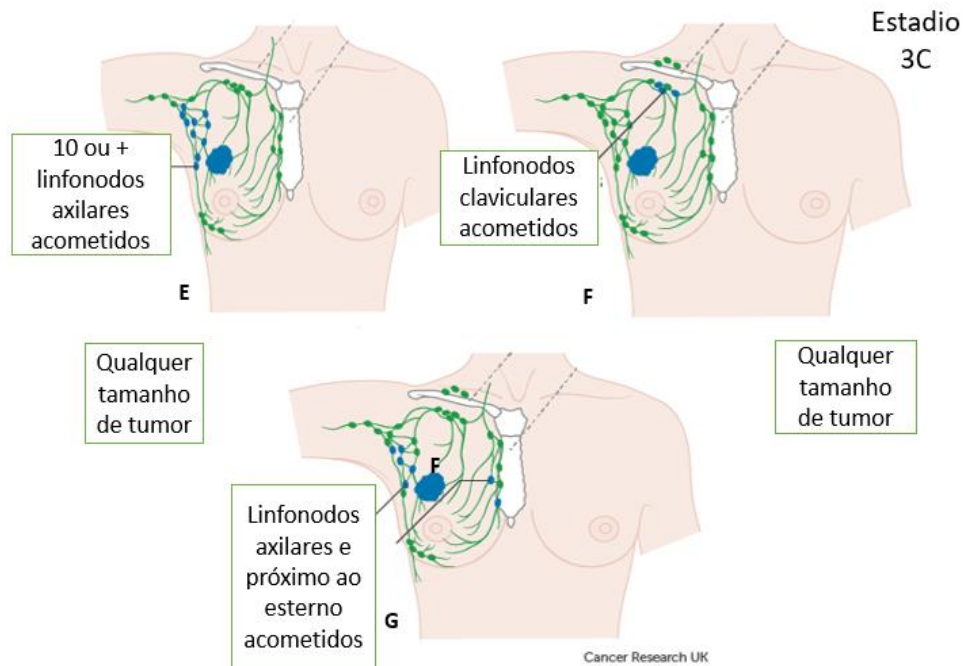


parede torácica e ainda para uma ou mais das seguintes estruturas: acometimento de 10 ou mais linfonodos (Figura 5-E), linfonodos acima ou abaixo da clavícula (Figura 5-F) e linfonodos próximos do esterno (Figura 5-G) (BRIERLEY et., al 2017).



**Figura 4: Estadio 3A do Câncer de Mama** – Imagens A, B e C, tamanho do tumor e acometimento de linfonodos no estadio 3A. (adaptado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2>).





**Figura 5: Estádios 3B e 3C do Câncer de Mama** –Imagem D, invasão de pele da mama e parede torácica no estadio 3B. Imagens E, F e G, tumores sem distinção de tamanho, com acometimento de linfonodos axilares, claviculares e próximo ao esterno. (adaptado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2>).

Estadio 4: Esse estadio, se refere aos tumores de qualquer tamanho que podem ou não ter acometimento de linfonodos, porém já existem células tumorais em outros órgãos e tecidos (metástase). Os órgãos mais comuns de metástase são os ossos, pulmão, fígado ou cérebro (BRIERLEY et., al 2017).

Os tumores de mama se diferem quanto ao comportamento, evolução e resposta ao tratamento, sendo o diagnóstico precoce a principal estratégia para melhorar os resultados do tratamento. Essa família de neoplasias é diversa e complexa, cuja classificação é principalmente definida por seu perfil imunológico, estes são comumente categorizados de acordo com a presença ou ausência de marcadores celulares para receptores de estrógeno (RE) ou progesterona (RP) e do *fator de crescimento epidermal 2* (HER2) (WAKS; WINER, 2019).

Os receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) estão presentes nas células de diversos órgãos, onde funcionam como estimuladores de diversos processos biológicos quando são ativados (ULANER et al., 2016). O RE é um receptor de hormônios esteroides que se encontram em cerca de 70% dos tumores de mama primários. O CM é considerado positivo para RE quando há a marcação  $\geq 1\%$  dos

núcleos das células tumorais por imuno-histoquímica. A expressão de RP está fortemente correlacionada com a expressão de RE, apenas 1% dos tumores de mama são positivos para RP, mas negativos para RE (ZARDAVAS, SWANTON, PICCART 2015) (CAP, 2018).

A expressão de RE é um fator crítico para a sensibilidade às terapias hormonais: doentes com expressão de RE e RP positivo fazem uso da hormonioterapia como tratamento adjuvante, durante o período de, pelo menos 5 anos, terapia que não é indicada para mulheres com tumores RE e RP negativos (DUFFY et al., 2017). Este tipo de tratamento diminui a taxa de mortalidade em 30%, porém, quando em uso na terapia neoadjuvante, tumores com RE positivo têm menos possibilidade de alcançar uma resposta patológica completa (RPC) do que tumores com RE negativos ou tumores HER2 positivos (CUNHA et al., 2013).

O Her2 é um receptor situado na membrana celular, que em quantidades normais, tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento das células epiteliais. A determinação do status de Her2 é feita através de imuno-histoquímica e é um dado importante para o diagnóstico, prognóstico e indicação de tratamento do tumor, a doença mais agressiva e tem maior chance de ocorrer metástase, porém, tem uma boa resposta a tratamentos que bloqueiam estes receptores – terapias anti Her2 (TSANG; TSE, 2019).

Na rotina de avaliação imuno-histoquímica, os resultados são classificados como 0, 1+ (negativo), 3+(positivo) e 2+ (equivoco). Nos casos 2+ é necessária a confirmação pelo teste de hibridização in situ por fluorescência (FISH). Todos os resultados de imuno-histoquímica com 2+ precisam da avaliação através do teste de FISH. Este tem como finalidade verificar se as células tumorais possuem ou não um número anormal de genes Her2 (WAKS; WINER, 2019)(LIGIBEL; WINER, 2002) (CAP, 2018).

O ki67, é uma proteína situada no núcleo celular sendo medida em % e reflete a velocidade de proliferação (multiplicação) celular. Normalmente é usado como valor de corte 15%. Significa que em 100 células presentes no tecido, 15 estão em divisão. Quanto maior o número de células, supostamente mais agressivo será o tumor. O que torna esse marcador molecular é um excelente indicador de células em fase ativa e proliferativa, contribuindo para o estabelecimento do prognóstico de diversas neoplasias (CUNHA et al., 2013). Na mama ele é mais importante nos tumores receptores hormonais positivos.

No início dos anos 2000, Perou e Sorlie revolucionaram o conhecimento dos carcinomas mamários com seus estudos sugerindo uma classificação molecular para o câncer de mama. Dos subtipos moleculares os mais prevalentes são os grupos luminal A e B que correspondem a média de 60 a 70% dos tumores mamários, o subtipo luminal A possui um melhor prognóstico e maiores taxas de sobrevida, enquanto o subtipo luminal B possuem um prognóstico não muito favorável, as pacientes desse grupos normalmente tem diagnósticos em estadios mais avançados e com comprometimento linfonodal, esse grupo também tem apresentam maior porcentagem de p53 (proteína supressora de tumor) (GONÇALVES et al., [s.d.]). O subtipo HER2<sup>+</sup> constitui de 15 a 20% dos tumores mamários e são caracterizados pela ativação/amplificação do gene HER2, resultando na superexpressão do receptor em células tumorais, sendo associado a uma menor sobrevida do paciente (KAVARTHAPU; ANBAZHAGAN; DUFAU, 2021).

O câncer de mama tipo basal corresponde a 10% dos tipos moleculares, é um subtipo complexo e é definido pela falta de expressão dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e também são altamente associados a mutações BRCA1. São tumores com comportamentos bem mais agressivos que os demais e não possuem terapias direcionadas, o que resulta em piores resultados no tratamento da doença (ZEVALLOS et al., 2020).

Mais recentemente, como uma forma de acesso mais amplo a esta classificação, foi sugerido realizar uma aproximação ao diagnóstico genético através do estudo imuno-histoquímico dos receptores hormonais, HER2 e Ki67. Assim surgiu a classificação em 4 subtipos principais: luminal A-like (HR+/Her2-, com baixo ki67) e luminal B-like (HR+/Her2+ ou Her2-, com alto ki67), que são positivos para a expressão de receptores de hormonais (HR), sendo estes receptores para estrogênio (ER) ou progesterona (PR); os Her2-like, que não expressam receptores hormonais mas expressam Her2+ (HR-/Her2+); e triplo-negativo (ER-/Her2-/PR-), os quais não expressam nenhum desses receptores (DESARTIS et al., 2019) (TSANG; TSE, 2019).

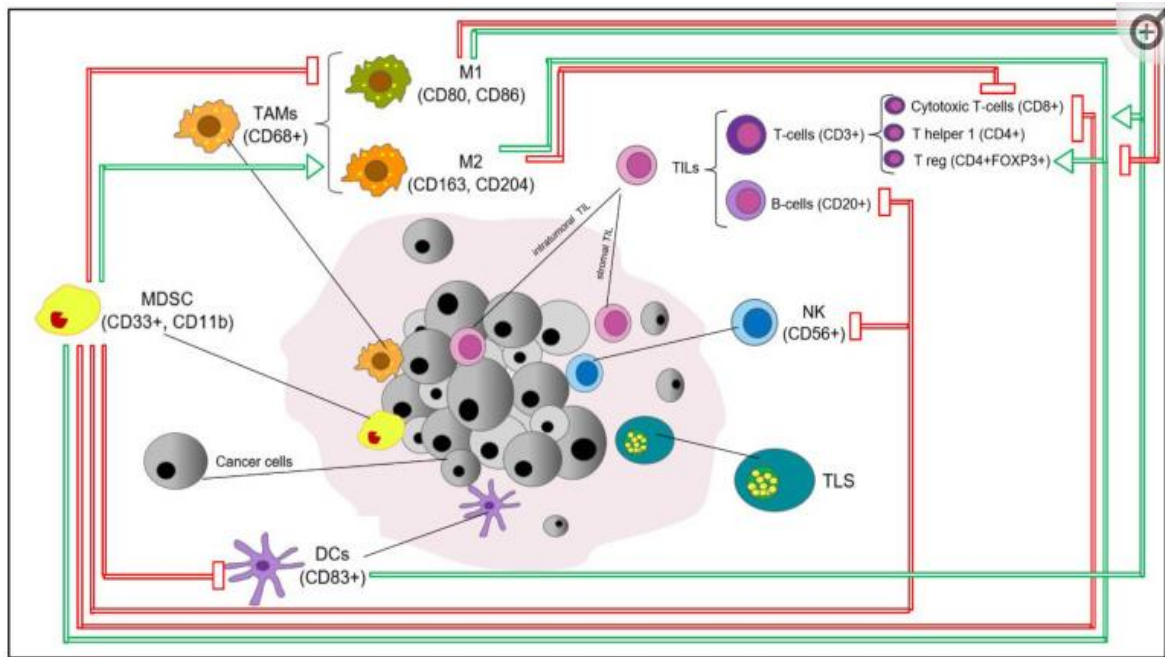
## **1.2 Infiltração linfocitária no microambiente tumoral do câncer de mama**

O sistema imune apresenta mecanismos de regulação da sua atividade com intuito de modular a resposta inflamatória e evitar o dano tecidual na ocorrência de

uma resposta imune. O desenvolvimento tumoral é um processo complexo controlado por fatores genéticos e epigenéticos que tem como base o controle do crosstalk entre células tumorais e os componentes do microambiente tumoral (MAT) (SALEMME et al., 2021). O tumor tem como uma de suas características, fazer a modulação do comportamento do MAT, que tanto pode ser ao seu favor, promovendo o seu desenvolvimento, quanto no sentido contrário ao induzir resistência no seu hospedeiro, mais conhecido como imunidade antitumoral (FIGUEIREDO, 2019).

Os linfócitos infiltrantes do tumor (TILs) têm sido foco de intenso estudo nos últimos anos devido ao seu papel na modulação da resposta imune. Estudos comprovam que essas células possuem papel relevante na determinação da intensidade da resposta imune. Os TILs são compostos principalmente por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A maior quantidade de TILs CD8<sup>+</sup>, tipo citotóxico que controla o crescimento tumoral está bem associado a resposta ao tratamento e maior sobrevida. Já os linfócitos CD4<sup>+</sup>, se dividem em subpopulações, com atividades pró ou antitumorais (AHN et al., 2020). Destes, os fenótipos que possuem resposta Th1, juntamente com as recém descobertas Tfh (células auxiliares foliculares T) possuem respostas favoráveis nos tratamentos quimioterápicos. Já aquelas de resposta Th2, possuem atividade reguladora (FOXP3), sendo assim associadas a um pior prognóstico (ZEPPELLINI et al., 2021).

TILs CD4<sup>+</sup>Th1, através da expressão de IFN $\gamma$  são responsáveis pela expansão, diferenciação e ativação de TILs CD8<sup>+</sup>, que em seguida liberam citocinas citotóxicas que são responsáveis por eliminar células tumorais, o que acontece através do reconhecimento de antígenos específicos associados ao tumor. Os TILs CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, por sua vez, são mediadores imunossupressores e tem como função a inibição de células T CD8<sup>+</sup>, células apresentadoras de antígenos profissionais(APCs), natural killer (NKs) e células Th1 CD4<sup>+</sup>(DIECI; MIGLIETTA; GUARNERI, 2021).



**Figura 6: Principais subconjuntos de células imunes no microambiente tumoral de câncer de mama.** Células CD4<sup>+</sup> Th1 estão relacionadas a diferenciação e ativação de linfócitos CD8, que exterminam células tumorais por meio de citocinas, liberadas a partir da interação do antígeno ao anticorpo, após apresentação do antígeno por células com essa função. TILs CD4<sup>+</sup>FOXP3 são mediadores imunossupressores que inibem células T CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> Th1, APCs e células natural killer (NKs). Macrófagos associados ao tumor TAMs-M1 são associados a resposta Th1, com propriedades antitumorais, o contrário dos TAMs-M2 que possuem resposta Th2, suprimindo a função de células T. Células NK são membros citotóxicos do sistema imune inato. Células dendríticas são apresentadoras de antígenos do sistema adaptativo. Células supressoras mieloides (MDSCs) são imunossupressoras de células T, B, NKs, TAMs-M1 e DCs. O recrutamento e acúmulo de mediadores imunossupressores é mediado por citocinas e quimiocinas de células tumorais. As setas vermelhas e verdes refletem relações inibitórias e estimulatórias, respectivamente. Adaptado: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7911608/>

Outro tipo celular que tem importância na interação dos componentes do MAT, os macrófagos associados a tumores (TAMs), são outro grupo celular bem estudado atualmente. TAMs podem ser classificados em subtipos M1 e M2 (RETECKI et al., 2021). No tipo M1, são ativados através do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e expressam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1, IL-6, IL-12 ou IL-23, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Enquanto os que se diferenciam em M2 regulam a expressão do MHC classe II e IL-12, além de induzir a expressão de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e arginase (FIGUEIREDO, 2019).

Em 1992 foi descrito pela primeira vez por Honjo e *cols.* Os inibidores de ponto de checagem imunes. A partir daí, deu-se início a uma nova era de estudos sobre o

entendimento de como se dá a interação do sistema imune com as células tumorais. Porém seu efeito regulador só foi descrito no ano de 1999 pelo mesmo grupo (Iwai et al., 2002). A proteína de morte celular programada 1 (PD-1) é uma molécula da família B7-CD28 e são consideradas moléculas coestimuladoras. As células imunes que expressam PD-1 tem como principais ligantes as proteínas PD-L1 e PD-L2, que são moléculas expressas na superfície de células tumorais e células imunes infiltrantes de tumor sob indução de diversas citocinas, sendo a mais comum interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Durante a interação com PD-1, PD-L1 através de diversas vias de sinalização, ocorre a diminuição da expressão de marcadores de superfície celular que culminam com a supressão de linfócitos T citotóxicos que são responsáveis por combater o desenvolvimento tumoral (HALIM et al., 2021). Um fato curioso, é que embora a interação entre PD1 e PD-L2 seja entre 2 a 6 vezes maior do que a apresentada por PD-L1, este é considerado o principal ligante de PD-1. A função de PD-L2 atualmente ainda é menos conhecida, porém, se sabe que PD-L2 é uma proteína em que sua expressão é induzida não apenas por células apresentadoras de antígenos, mas também por meio de citocinas associadas a resposta Th2 (ABAD et al., 2022).

## **2.0 JUSTIFICATIVA**

Nesse cenário, são necessários estudos prospectivos para a investigação dos fenótipos de TILs e sua localização no microambiente tumoral nos diversos tipos moleculares e histológicos de CM, para confirmar os achados anteriores e contribuir para a melhoria das futuras abordagens terapêuticas das pacientes. Como a matriz extracelular é regulada por eventos genéticos e epigenéticos, esse projeto propõe investigar o perfil clínico-histopatológico e imunológico de carcinomas invasores em pacientes com CM nos diferentes estadiamentos.

Nesse sentido, caracterizar os TILs no microambiente de tumores sólidos e associar a características prognósticas já reconhecidas nos carcinomas mamários pode fornecer informações sobre o valor prognóstico de uma variedade de tumores de mama.

### **3.0 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar comparativamente a expressão de célula imunes na matriz extracelular tumoral e sua associação à características histopatológicas e clinicas em dois grupos de estadiamento (estádios I e II; e estádios III e IV).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 3.2.1 Caracterizar o CM através dos achados clínico-patológicos (tais como: tamanho, subtipo e grau histológico do tumor, estadiamento, comprometimento linfonodal, status de metástase, invasão perineural e invasão vascular e expressão de receptores hormonais, HER2 e Ki67);
- 3.2.2 Analisar a intensidade do infiltrado inflamatório no estroma tumoral (TILS) e comparar nos dois grupos de estádios do CM;
- 3.2.3 Caracterizar as células inflamatórias e imunológicas do TILS e comparar nos dois grupos de estádios do CM;
- 3.2.4 Investigar a expressão dos *imuno checkpoints* PD1, PD-L1, PD-L2 em linfócitos no estroma tumoral e comparar nos dois grupos de estádios do CM;

### **4.0 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Grupo de estudo**

As mulheres recrutadas para o estudo foram pacientes acima de 18 anos, atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), nos ambulatórios da equipe de Mastologia do Instituto Mário Penna, com diagnóstico de carcinoma mamário invasor, independente do estadiamento, submetidas aos tratamentos: adjuvante e neoadjuvante e hormonal. O material utilizado foi: os blocos de parafina provenientes de intervenções cirúrgicas ou biópsia colhida através de core biopsy.

Este estudo é prospectivo, composto por dois braços que receberão a mesma análise. Sendo também observacional e comparativo. Um dos braços do estudo foi formado pelas pacientes que pertencem aos estádios I e II. O outro braço foi referente às pacientes pertencentes aos estádios III e IV.



As amostras selecionadas foram processadas no Núcleo de Ensino e Pesquisa (NEP) do Instituto Mário Penna (IMP). Todas as pacientes foram convidadas a participar da pesquisa e o material só foi solicitado junto ao laboratório de anatomia patológica do Hospital Luxemburgo, após a aplicação do Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1).

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Mário Penna, nº 2.481.975 (ANEXO 2).

#### **4.2 Os critérios de inclusão**

Para a inclusão das pacientes no estudo, foram utilizados os seguintes critérios:

4.2.1 Mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma invasor;

4.2.2 Mulheres sem evidência de outras neoplasias, doenças auto-imunes ou processos inflamatórios sistêmicos;

4.2.3 Mulheres sem passado de tratamento sistêmico anti-neoplásico ou tratamento locorregional radioterápico;

4.2.4 Mulheres sem passado de uso de imunossupressores há, pelo menos um ano;

4.2.5 Termo de consentimento livre e esclarecido assinado;

As pacientes que não atenderam a algum dos critérios acima, foram excluídas do estudo.

#### **4.3 Dados clínicos e anátomo-patológicos**

Os dados clínico-patológicos das pacientes recrutadas foram coletados de prontuários no sistema do Hospital Luxemburgo do IMP. Os blocos de parafina e as lâminas histológicas coradas em Hematoxilina & Eosina foram cedidas pelo Laboratório de Anatomia patológica do IMP. Todas as lâminas foram revisadas por um segundo patologista com experiência em patologia mamária e demais pesquisadores do estudo. Os casos selecionados foram analisados seguindo as recomendações diagnósticas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019). Os seguintes dados foram coletados: tamanho do tumor, tipo e grau histológico,

comprometimento linfonodal, metástase à distância, invasão perineural, invasão vascular e estadiamento patológico e clínico. A classificação molecular foi estabelecida, através da expressão imuno-histoquímica para os receptores de estrógeno, progesterona, HER-2 e Ki67 realizados em laboratório parceiro do IMP e classificados em luminal A-like, luminal B-like, basal-like, triplo negativo e HER2<sup>+</sup>.

#### 4.4 Análise do infiltrado inflamatório tumoral

Os cortes histológicos dos blocos de parafina contendo amostras dos CM corados em Hematoxilina & Eosina foram analisados semiquantitativamente, em microscópio óptico sob aumento de 10X e 40X, considerando o infiltrado inflamatório intratumoral das amostras de core biopsy e infiltrado intratumoral das amostras oriundas de peças de cirurgia. Foram considerados infiltrado baixo (0 a 10%), infiltrado médio (>10 a 40%) e infiltrado alto (>40 a 90%). Essa análise foi realizada seguindo os critérios padronizados pelo *International TILs group* indicados no *guia de Avanços em Anatomia Patológica* (Hendry et al. 2017; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer, 2019).

#### 4.5 Imuno-histoquímica

A investigação dos marcadores imunológicos foi realizada por imuno-histoquímica utilizando-se os seguintes anticorpos primários monoclonais/policlonais de coelho/camundongo anti-humano: anti-CD68, marcador de macrófagos; e marcadores de subpopulação de linfócitos T anti-CD8 e anti-CD4 e *imunocheckpoints* PD1, PD-L1 e PD-L2 padronizados previamente pelo nosso grupo (MARTINS et al., 2019) (tabela1). Blocos de parafina contendo as amostras dos CM foram submetidos a microtomia em cortes de 4µm de espessura. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados sob imersão em três banhos de xilol e, hidratados na sequência de álcoois a 100%, 90%, 80% e 70%. As lâminas foram submetidas à reativação antigênica em banho-maria, utilizando-se as soluções indicadas na tabela 1, sob temperatura de 92°C por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de metanol e peróxido (2%) e seguido por lavagem em solução tampão de PBS (*Phosphate buffer solution*) pH 7,2 – 7,4. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado por incubação das lâminas por 30 minutos em solução de albumina bovina a 2%. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de PBSA( *Albumine*

*Phosphate buffer solution*) 2% nas concentrações conforme Tabela 1 e incubados à 4°C (overnight). Posteriormente, foi adicionado o sistema de detecção Hides Detection HRP Polymer System (Cell Marque, Rocklin, CA, EUA) em duas sessões de 10 minutos cada, com lavagens em PBS nos intervalos. Após essa etapa, as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e contra-corados em hematoxilina por 50 segundos. Seguiu-se a desidratação realizada em banhos de álcool nas graduações 70%, 80%, 90%, 100% e diafanização em três banhos de xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas utilizando-se entelan e prosseguiram para análise em microscopia de luz.

**Tabela 1: Anticorpos utilizados no estudo, especificações de uso e padrões de marcação.**

Anticorpo primário	Fabricante	Espécie	Código	Diluição	Reativação Antigênica	Padrão de marcação
CD4 (SP35) linfócitos	Abcam	Monoclonal/ coelho	CMC10431040	1:300	Tris-edta	Citoplasmática Membranar
CD8 (SP16) linfócitos	Abcam	Monoclonal/ coelho	CMC10831030	1:500	Tris-edta	Membranar
CD68 macrófagos	Abcam	Monoclonal / camungongo	Ab 955	1:50	Citrato	Membranar
PD1 linfócitos	Abcam	Monoclonal/ coelho	137132	1:300	Tris-edta	Membranar
PDL-1	TermoFisher	Policlinal/ coelho	20343	1:500	Citrato	Citoplasmática Membranar
PDL-2	Abcam	Policlinal/ coelho	244332	1:500	Citrato	Citoplasmática Membranar

#### 4.6 Análise morfométrica

Para a análise de TILs CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, macrófagos CD68<sup>+</sup> e *immune checkpoints* PD1, PD-L1 e PD-L2 nas amostras de CM, foram quantificados o número total de cada tipo celular nos cortes submetidos à imunohistoquímica. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico (NIKON eclipse E200), com ampliação de 400x, em 10 campos aleatórios, nas regiões do estroma intratumoral (*International TILs group*, Hendry, 2019). Os dados foram representados graficamente pela média do número de células de 10 campos no estroma intratumoral para cada CM.

## 4.7 Análise estatística

As variáveis clínicas e patológicas foram testadas quanto ao tipo de tratamento, utilizando qui quadrado ( $X^2$ ) para teste de associação através do programa Jamovi, 2021 (Version 1.8) *Jamovi.org*. A análise de variância foi realizada utilizando-se o *Graphpad Prism* (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). Todos os dados foram testados para normalidade utilizando o *Komogorov-Smirnov test*. Os dados foram submetidos ao *Teste T* para aqueles com distribuição normal e para os dados que não apresentaram distribuição normal, foram realizados testes não paramétricos de *Mann-Whitney*. Para os testes de correlação, foram utilizados os testes de *Spearman*. Na análise de sobrevida foi utilizado o método de *Kaplan-Meier*. Os dados foram expressos graficamente como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Amostra e Caracterização Clínico-Patológica

Foram incluídas neste estudo 32 pacientes do sexo feminino com câncer de mama, sendo que 15 pacientes pertencem aos estadios I e II e 17 pacientes, aos estadios III e IV. As pacientes em estadio I e II foram submetidas a tratamento adjuvante com amostras de peça cirúrgica e as pacientes em estadio III e IV tiveram amostras em core biopsy por serem submetidas a tratamento neoadjuvante, exceto uma paciente que foi submetida a tratamento adjuvante. As características histopatológicas e clínicas estão representadas nas Tabelas 2 e 3.

Entre as pacientes em estadios I e II, 60% dos CM apresentaram grau histológico III e 73,3% apresentaram tumores variando entre 2 e 5 cm. Nas pacientes em estadios III e IV, 58,8% dos CM apresentaram grau histológico II e 55,5% dos tumores mediram de 2 a 5 cm. O tipo histológico Ductal SOE foi o mais prevalente entre os dois grupos de estadios, com 93,3% nos estadios I e II e 94,1% para o estadios III e IV, corroborando com o tipo que é mais prevalente. A identificação de carcinoma “*in situ*” associado foi mais frequente nos tumores das pacientes em estádios I e II (86,07%), o que talvez tenha implicação pois foram avaliados nos estadios I e II a peça cirúrgica e nos estadios III e IV biópsias de core byopsy.

A porcentagem de expressão do receptor de estrogênio foi considerada alta na maioria das pacientes, em ambos os grupos de estadiamento, predominando nos estádios I e II. A maioria destas pacientes, 93,3%, receberam hormonioterapia, já a porcentagem de alta expressão de receptores de progesterona predominou nos tumores das pacientes em estádios I e II. No entanto, nas pacientes em estádios III e IV, 47,1% dos tumores não apresentaram expressão de receptores de estrogênio, com uma associação significativa de  $p=0,004$ . A expressão de Ki67 foi acima de 10% em ambos os grupos, 88,2% nos estádios III e IV e 73,3% nos estádios I e II. Não foi observada expressão do receptor de HER2 na maioria das pacientes em ambos os grupos de estádios I e II, e III e IV (66,7% e 82,0%), respectivamente.

Quanto aos dados clínicos representados na tabela 3, foi observado que a média de idade das pacientes nos estádios III e IV é abaixo de 50 anos, 58,8%, enquanto as pacientes nos estádios I e II tem média de idade > 50 anos a 68 anos, 53,3%. Nos dois grupos de estádios foi observado que o histórico familiar de câncer é presente em um pouco mais que na metade das pacientes, 57,1% nos estádios I e II e 58,8% dos estádios III e IV. E com relação ao histórico de familiar de câncer de mama, a maioria das pacientes dos estádios III e IV, 60% não tem apresentam casos de câncer de mama entre seus familiares.

A diferença no número de pacientes avaliadas entre as variáveis analisadas se deu por não serem encontrados alguns dos dados avaliados no prontuário eletrônico das mesmas.

**Tabela 2: Teste de associação entre os grupos de estadiamento e variáveis histopatológicas**

<i>Análise Histopatológica</i>			
<i>Variáveis</i>	<i>Estadiamento</i>		<i>Valor de p</i>
	<i>I e II</i>	<i>III e IV</i>	
<b><i>Tamanho do tumor (cm)</i></b>	<b><i>N (%)</i></b>	<b><i>N (%)</i></b>	
<i>Até 2 cm</i>	4(26,7)	0	
<i>2 a 5 cm</i>	11(73,3)	5(55,5)	
<i>&gt;5cm</i>	0(0)	4(44,5)	0,009
<b><i>Total</i></b>	<b>15</b>	<b>9</b>	
<b><i>Tipo histológico</i></b>			
<i>Ductal SOE</i>	14(93,3)	16(94,1)	
<i>Lobular</i>	1(6,7)	0(0)	0,365

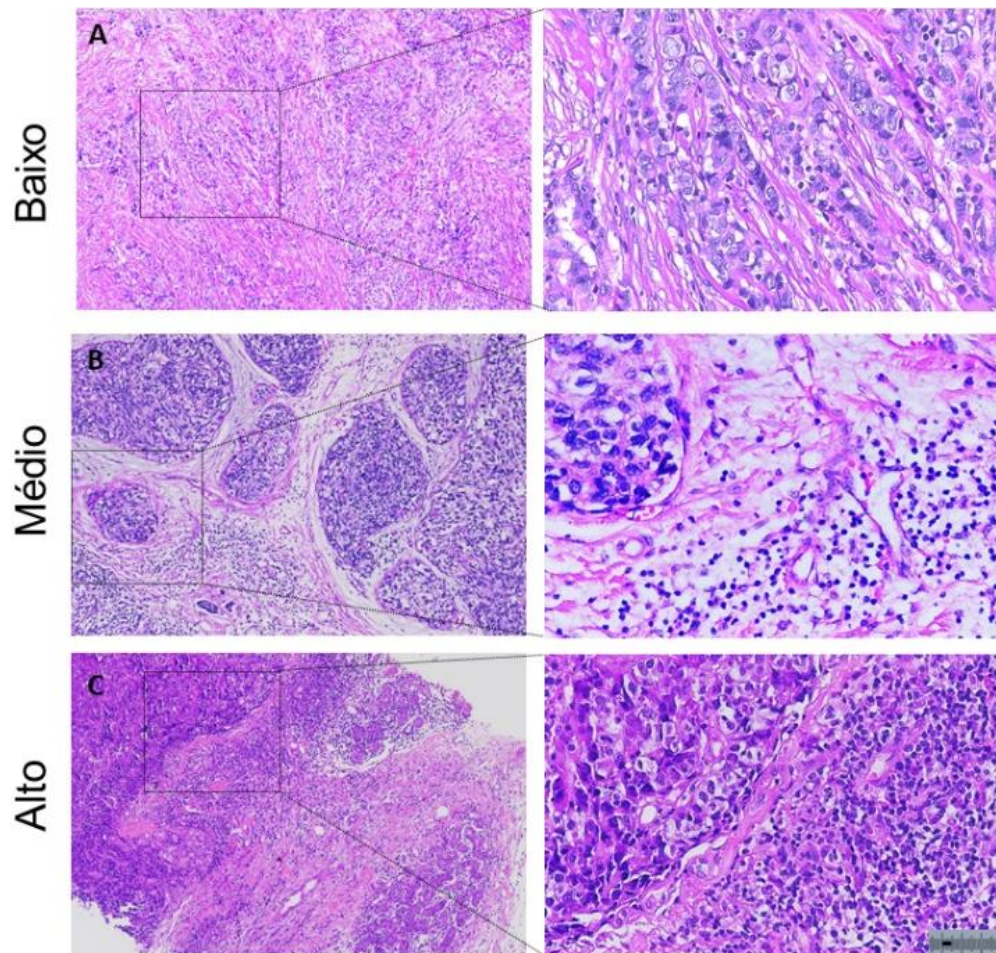
<i>Medular</i>	0(0)	1(5,9)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Grau Histopatológico</b>			
<i>I</i>	0(0)	1(5,8)	
<i>II</i>	6(40)	10(58,8)	0,289
<i>III</i>	9(60)	6(35,4)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Receptor estrogênio (%)</b>			
<i>Negativo</i>	0(0)	5(29,4)	
<i>Baixo</i>	0(0)	2(11,8)	
<i>Médio</i>	0(0)	3(17,6)	
<i>Alto</i>	15(100,0)	7(41,2)	0,005
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Receptor progesterona (%)</b>			
<i>Negativo</i>	2(13,3)	8(47,1)	
<i>Baixo (Até 30)</i>	3(20,0)	0(0)	
<i>Médio (40-70)</i>	1(6,7)	6(35,3)	
<i>Alto (&gt;80)</i>	9(60,0)	3(17,6)	0,004
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Intensidade de expressão de Her2</b>			
<i>0</i>	10(66,7)	14(82,3)	
<i>1+</i>	1(6,7)	0(0)	
<i>2+</i>	2(13,3)	1(5,9)	
<i>3+</i>	2(13,3)	2(11,8)	0,597
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Ki67</b>			
<i>Abaixo de 10%</i>	4(26,7)	2(11,8)	
<i>Acima de 10%</i>	11(73,3)	15(88,2)	0,281
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Diagnóstico molecular</b>			
<i>Luminal A</i>	3(20,0)	2(11,8)	
<i>Luminal B</i>	9(60,0)	8(47,0)	
<i>Triplo Negativo</i>	0(0)	5(29,4)	
<i>Her2+</i>	3(20,0)	2(11,8)	0,148
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Carcinoma "in situ" associado</b>			
<i>Ausente</i>	2(13,3)	8(53,3)	0,002
<i>Presente</i>	13(86,7)	7(46,7)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

**Tabela 3: Teste de associação entre os grupos de estadiamento e variáveis clínicas.**

<b>Análise Clínica</b>			
	<b>Estadiamento</b>		
<b>Variáveis</b>	<b>I e II</b>	<b>III e IV</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Idade</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
Abaixo de 50 anos	5(33,3)	10(58,8)	
> de 50 a 68 anos	8(53,3)	5(29,4)	0,326
Acima de 68 anos	2(13,4)	2(11,8)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Histórico familiar de câncer</b>			
Ausente	6(42,9)	7(41,2)	
Presente	8(57,1)	10(58,8)	0,925
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	
<b>Histórico familiar de câncer de mama</b>			
Ausente	4(50,0)	6(60,0)	
Presente	4(50,0)	4(40,0)	0,671
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	
<b>Uso de tamoxifeno (hormonioterapia)</b>			
Não	1(6,7)	8(47,1)	
Sim	14(93,3)	9(52,9)	<b>0,005</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	

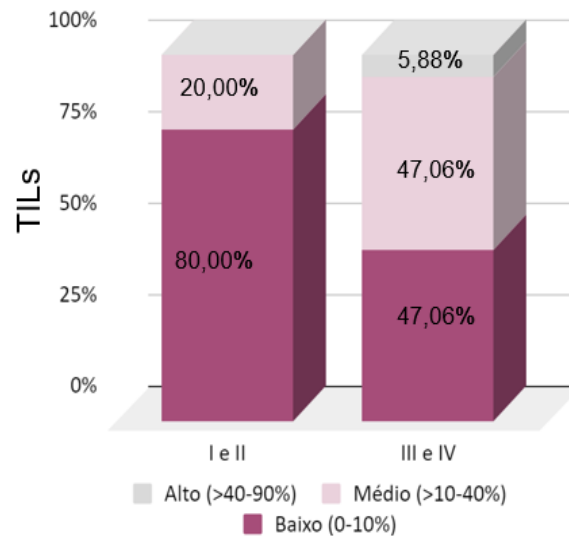
## 5.2 Análise do infiltrado inflamatório tumoral

A análise do infiltrado inflamatório foi realizada como apresentado na figura 7, a fotomicrografia mostra os três tipos de densidades observadas em menor e maior aumentos. As análises morfométricas indicaram que as pacientes com estadios III e IV possuem maior quantidade de TILs. Dessas, 47,06% apresentam baixo número de TILs (0 a 10%) e médio (>10% a 40%), e somente 5,88% alto número (>40% a 90%), enquanto os estadios I e II, a grande maioria, 80% dos casos, possuem baixo número de TILs, enquanto os 20% restantes foi observado médio número de TILs (Gráfico 1).



**Figura 7. Fotomicrografias de secções coradas em Hematoxilina & Eosina, indicando a porcentagem de Linfócitos Infiltrantes Tumorais (TILs) em lesões de câncer de mama. As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama em aumentos de 10X e 40X. Em A, B e C foram demonstrados os números de TILs baixo, médio e alto, respectivamente.**

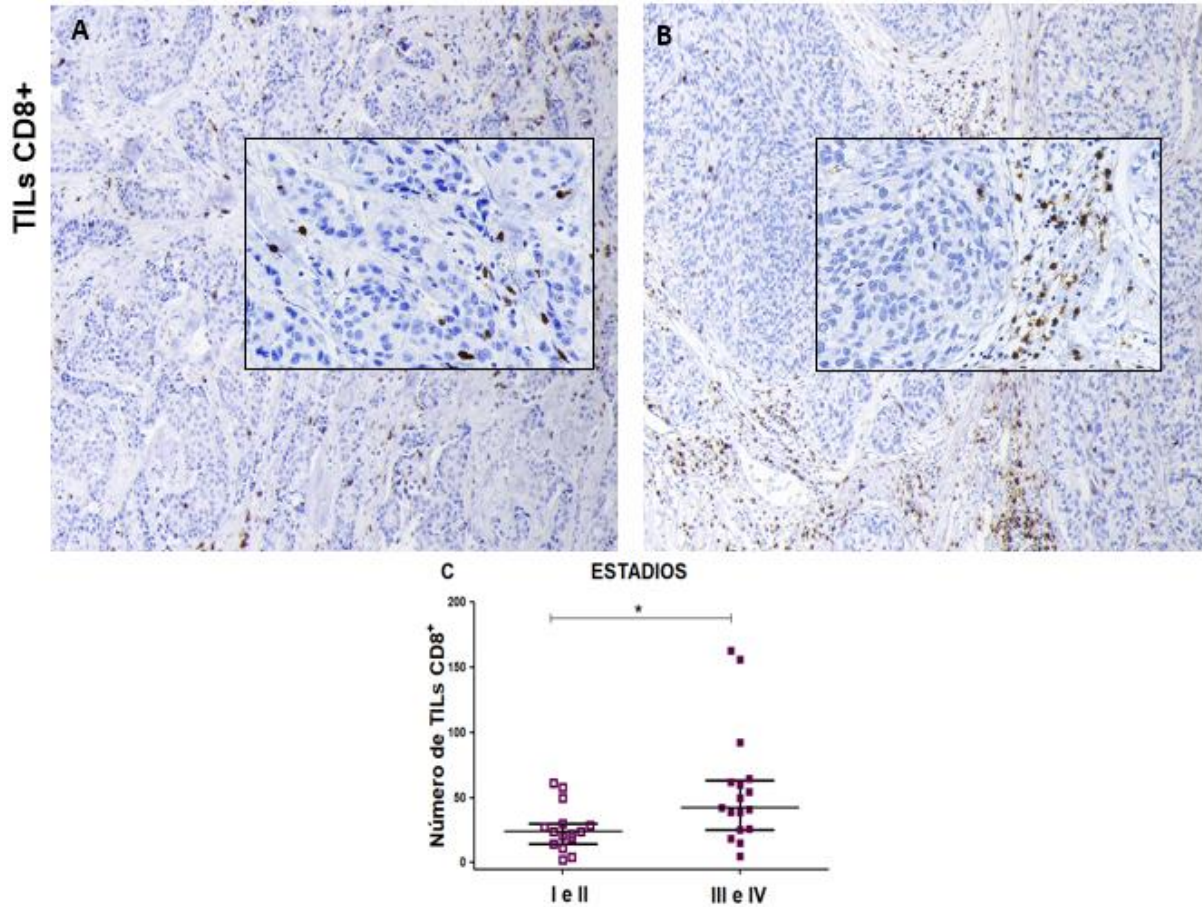




**Gráfico 1.** Representação da análise morfométrica da porcentagem TILs, pacientes com estadios III e IV apresentaram maior número de TILs em relação as pacientes com estadios I e II.

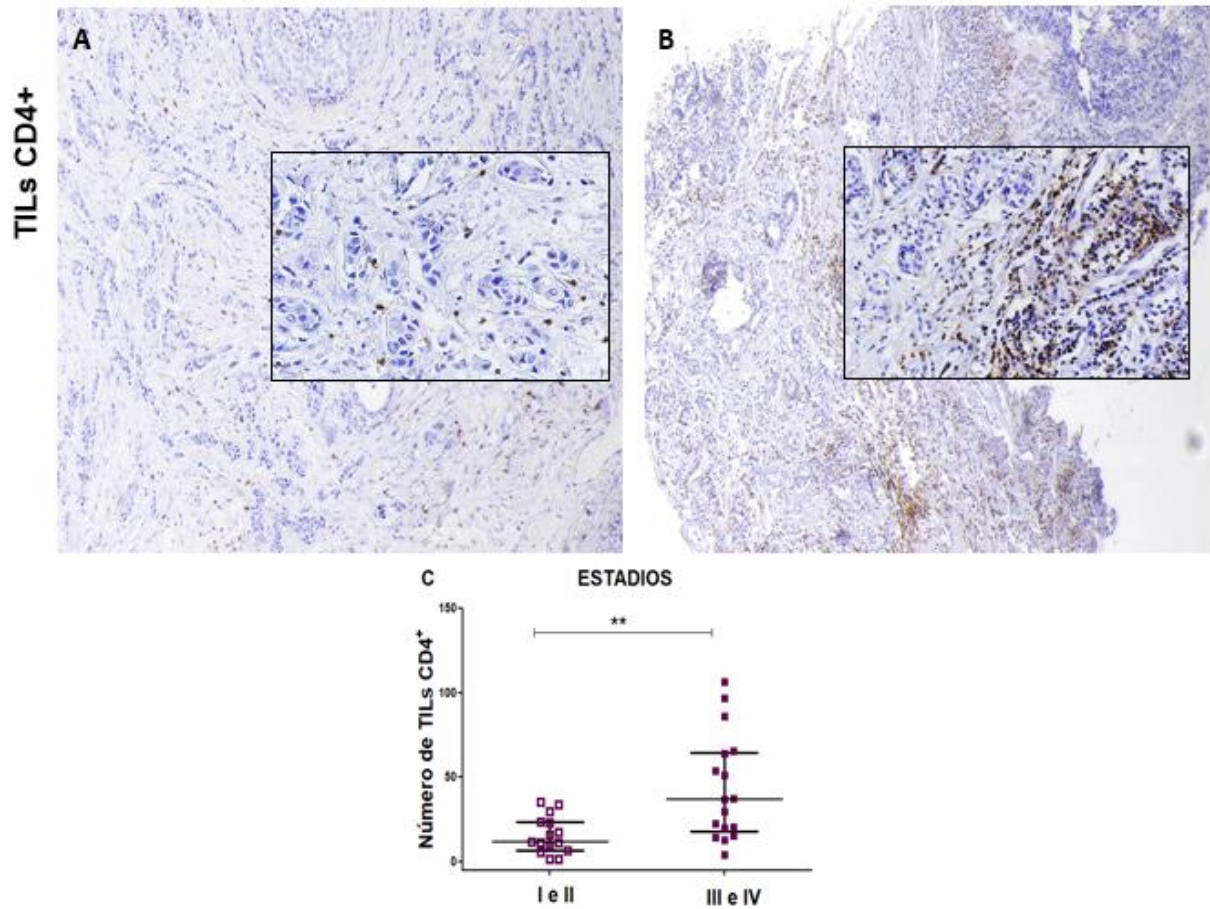
### 5.3 Marcadores imunológicos no câncer de mama (CM)

Para analisar o perfil das células imunológicas no microambiente tumoral dos CM foi realizado o teste de imuno-histoquímica. Uma grande quantidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, bem como, macrófagos CD68<sup>+</sup> infiltrados no tecido mamário de pacientes dos dois grupos de estadiamento, podem ser observados das figuras 8, 9 e 10. Foram quantificados também, TILs expressando as proteínas de superfície celular PD1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> e PD-L2<sup>+</sup>, conhecidas também como *imunocheckpoints*, observados nas figuras 11, 12 e 13. Análises morfométricas revelaram maior número de linfócitos CD8<sup>+</sup> nas pacientes com estadios III e IV (55,9±44,3), comparado as pacientes do grupo com estadios I e II (26,3±17,4). Valor de p<0,05.



**Figura 8. Caracterização de linfócitos CD8<sup>+</sup> em tumores mamários com estadios I - II e III - IV.** As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a imuno-histoquímica no aumento de 10X e 40X (sobrepostas). A coloração marrom (+) indica expressão proteica de CD8<sup>+</sup> em tumor mamário. Em B, pacientes com estadios III e IV apresentaram maior número de TILs CD8<sup>+</sup> em relação as pacientes com estadios I e II (imagem A). Em C, está representada a análise morfométrica de CD8<sup>+</sup> no tumor (\*) representa p<0,05.

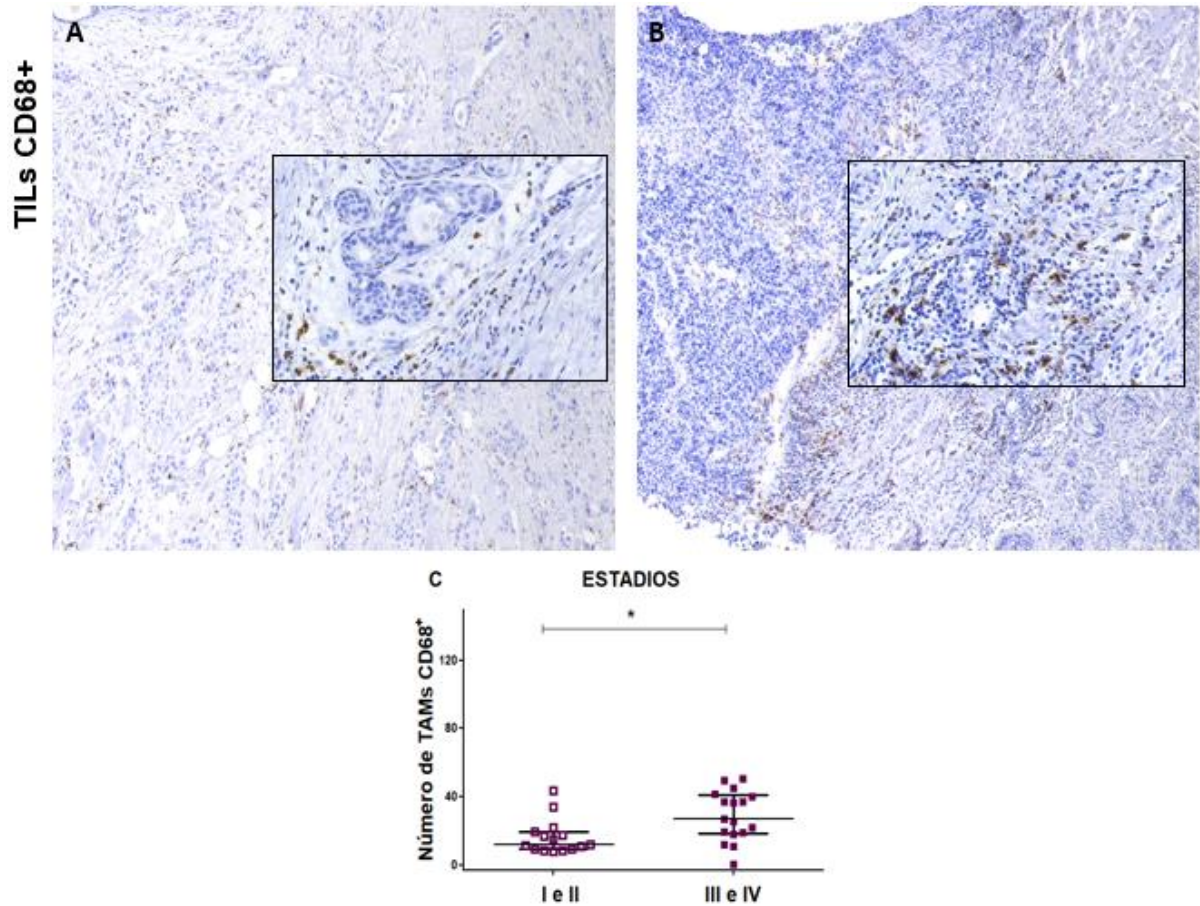
Um grande número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram observados distribuídos tanto na região estromal como intratumoral dos tumores de mama. Quando analisadas as regiões, foi observado aumento de TILs CD4<sup>+</sup> nas pacientes do grupo de estadios III e IV ( $43,3 \pm 31,2$ ) vs grupo de estadios I e II ( $15,8 \pm 11,4$ ). Valor de  $p=0,0089$  (Figura 9).



**Figura 9. Caracterização de linfócitos CD4<sup>+</sup> em tumores mamários com estadios I - II e III - IV.** As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a imuno-histoquímica no aumento de 10X e 40X (sobrepostas). A coloração marrom (+) indica expressão proteica de CD4<sup>+</sup>. Em B, pacientes com estadios III e IV apresentaram maior número de TILs CD4<sup>+</sup> em relação as pacientes com estadios I e II (figura A). Em C, está representada a análise morfométrica de CD4<sup>+</sup> no tumor mamário (\*\*) representa  $p=0,0089$ .

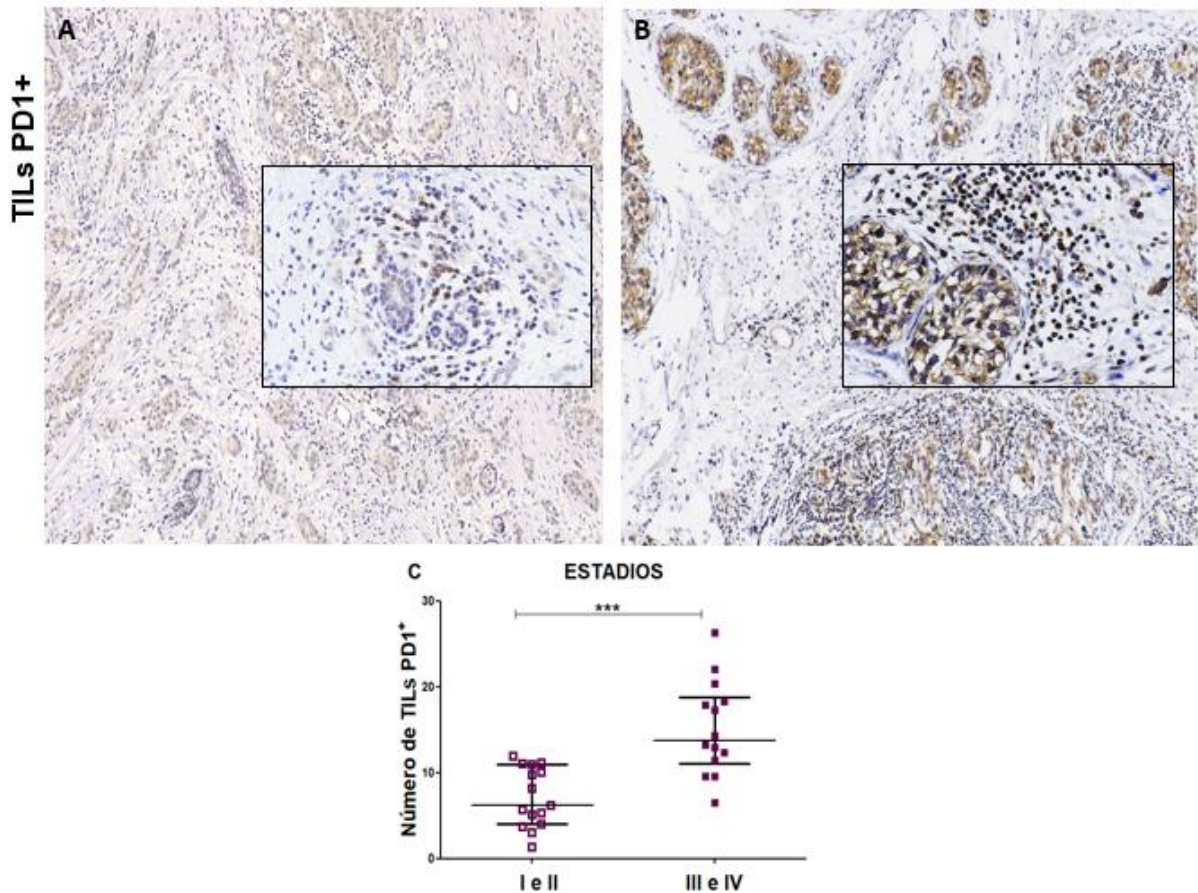
Os macrófagos associados aos tumores (TAMs) são células importantes na apresentação de antígenos na resposta imune. Nesse trabalho observamos ampla distribuição dessas células nos tumores mamários (Figura 10). O número de TAMs CD68<sup>+</sup> quando analisados nas regiões estromal e intratumoral foi maior entre as pacientes com estadios III e IV ( $28,8 \pm 14,7$ ) vs estadios I e II ( $16,3 \pm 10,2$ ). Valor de  $p < 0,05$ .





**Figura 10. Caracterização de linfócitos CD68<sup>+</sup> em tumores mamários com estádios I - II e III - IV.** As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a imuno-histoquímica no aumento de 10X e 40X (sobrepostas). A coloração marrom (+) indica expressão proteica de CD68<sup>+</sup>. Em B, pacientes com estádios III e IV apresentaram maior número de TILs CD68<sup>+</sup> em relação as pacientes com estádios I e II (figura A). Em C, está representada a análise morfométrica de CD68<sup>+</sup> no tumor mamário. (\*) representa  $p < 0,05$ .

A superexpressão de moléculas inibidoras, os chamados *imunes checkpoints*, tais como PD-1 (receptor de morte celular programada - 1) e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 constitui um dos principais mecanismos de resistência imunológica a tumores nos tecidos periféricos. Em pacientes com estádios III e IV foi observado aumento significativo de TILs PD1 ( $15,1 \pm 5,4$   $p < 0,0001$ ) em relação as pacientes de estádios I e II ( $7,1 \pm 3,4$ ) (Figura 11). Valor de  $p < 0,0001$ .



**Figura 11. Caracterização de linfócitos PD1<sup>+</sup> em tumores mamários com estadios I - II e III - IV.** As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a imuno-histoquímica no aumento de 10X e 40X (sobrepostas). A coloração marrom (+) indica expressão proteica de PD1<sup>+</sup>. Em B, pacientes com estadios III e IV apresentaram maior número de TILs PD1<sup>+</sup> em relação as pacientes com estadios I e II (figura A). Em C, está representada a análise morfométrica de PD1<sup>+</sup> no tumor mamário. (\*\*\*) representa  $p < 0,0001$ .

As pacientes foram avaliadas quanto a expressão do marcador PD-L1 no tumor, nos estadios III-IV se observa uma expressão alta um pouco maior (47,0%) do que as pacientes nos estadios I- II (40,0%). As expressões baixa e média foram 17,7% e 35,3% para os estadios III - IV e 13,3% e 46,7% nos estadios I- II, respectivamente.

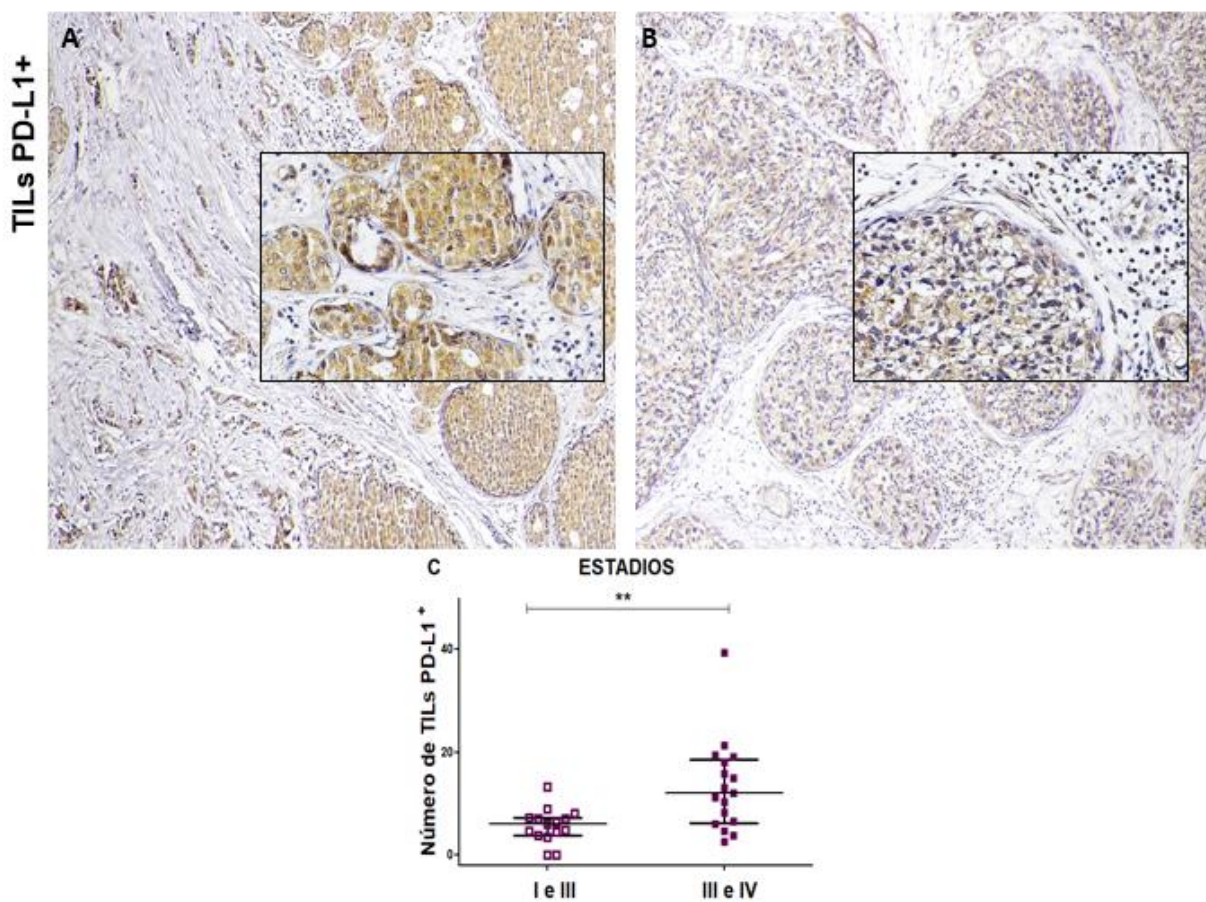
**Tabela 4: Expressão tumoral do *immune checkpoint* PD-L1.**

	EXPRESSION DE PD-L1			TOTAL(N)
	BAIXA	MÉDIA	ALTA	
ESTADIO I, III	13,30%	46,70%	40,00%	15
ESTADIOS III, IV	17,70%	35,30%	47,00%	17

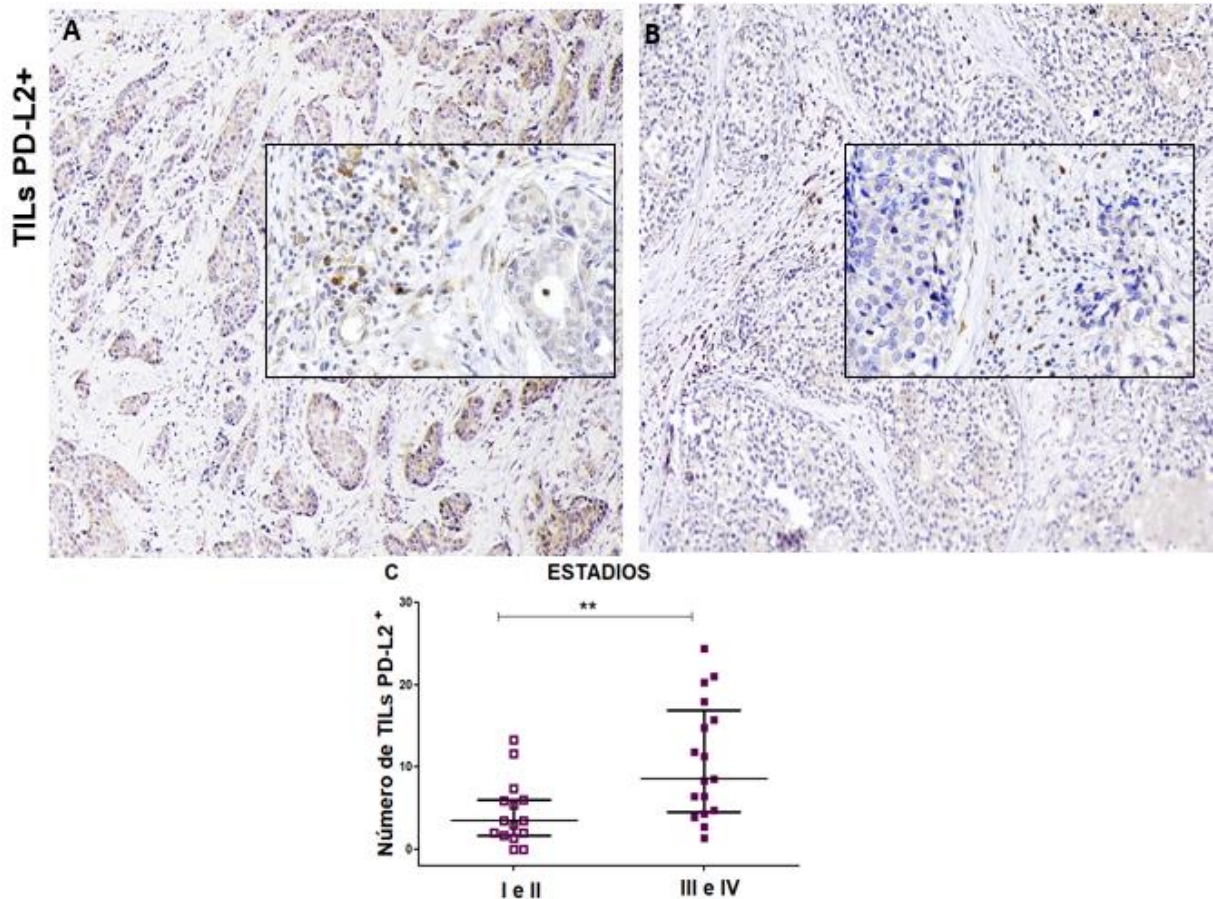


Os ligantes de PD1, PD-L1 e PD-L2 também demonstraram maior número de TILs nos estadiamentos III e IV ( $13,3\pm 8,9$ ) e ( $10,8\pm 7,9$ ) com relação aos estadiamentos I e II ( $5,6\pm 3,3$ ) e ( $4,4\pm 3,9$ ) respectivamente (Figuras 12 e 13). Valores de  $p=0,003$  e  $p=0,004$ .

Em todas as análises realizadas foram observadas diferenças entre os grupos de estadiamento. Os dados adquiridos até aqui nos permitem afirmar, então, que as pacientes pertencentes aos estadios III e IV, possuem maior quantidade de células inflamatórias.

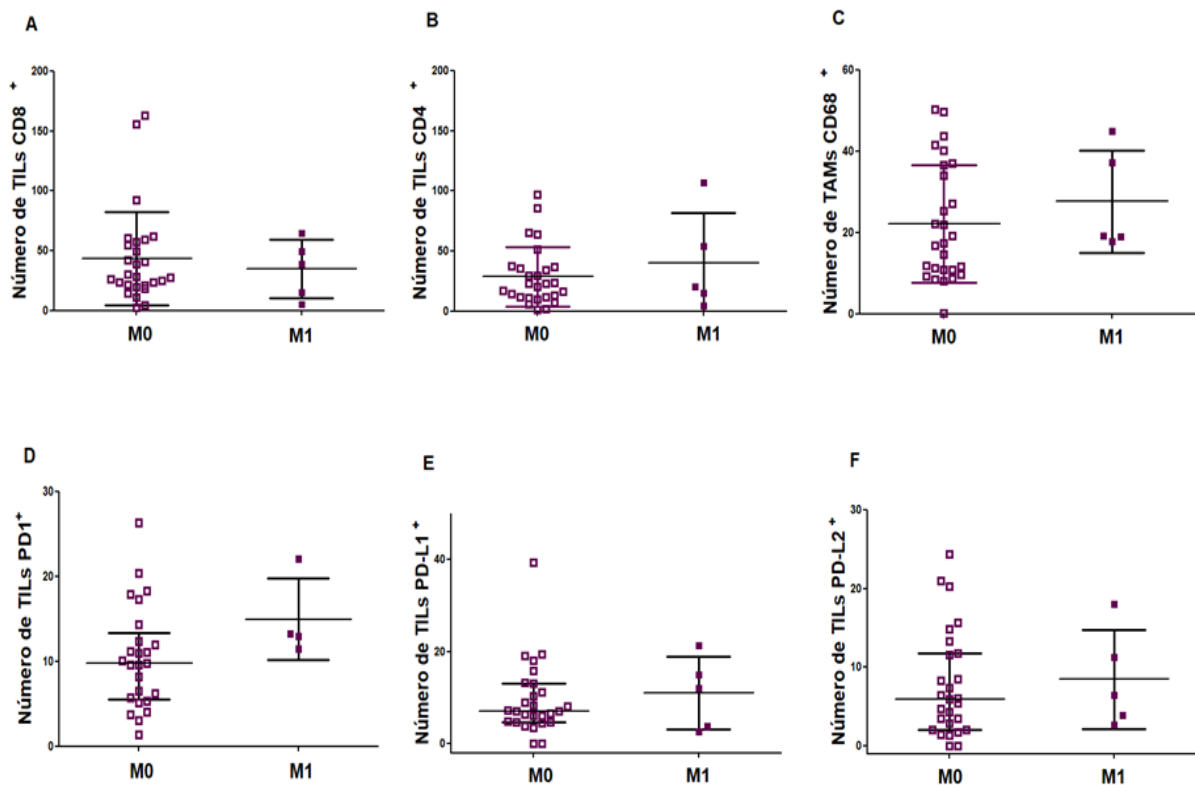


**Figura 12. Caracterização de linfócitos PD-L1<sup>+</sup> em tumores mamários com estadios I - II e III -IV.** As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a imuno-histoquímica no aumento de 10X e 40X (sobrepostas). A coloração marrom (+) indica expressão proteica de PD-L1<sup>+</sup>. Em B, pacientes com estadios III e IV apresentaram maior número de TILs PD-L1<sup>+</sup> em relação as pacientes com estadios I e II (figura A). Em C, está representada a análise morfométrica de PD-L1<sup>+</sup> no tumor mamário. (\*\*) representa  $p=0,003$ .



**Figura 13. Caracterização de linfócitos PD-L2<sup>+</sup> em tumores mamários com estadiamentos I -II e III - IV.** As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a imuno-histoquímica no aumento de 10X e 40X (sobrepostas). A coloração marrom (+) indica expressão proteica de PD-L2<sup>+</sup>. Em B, pacientes com estadios III e IV apresentaram maior número de TILs PD-L2<sup>+</sup> em relação as pacientes com estadios I e II (figura A). Em C, está representada a análise morfométrica de PD-L2<sup>+</sup> nas regiões no tumor mamário. (\*\*) representa p=0,004.

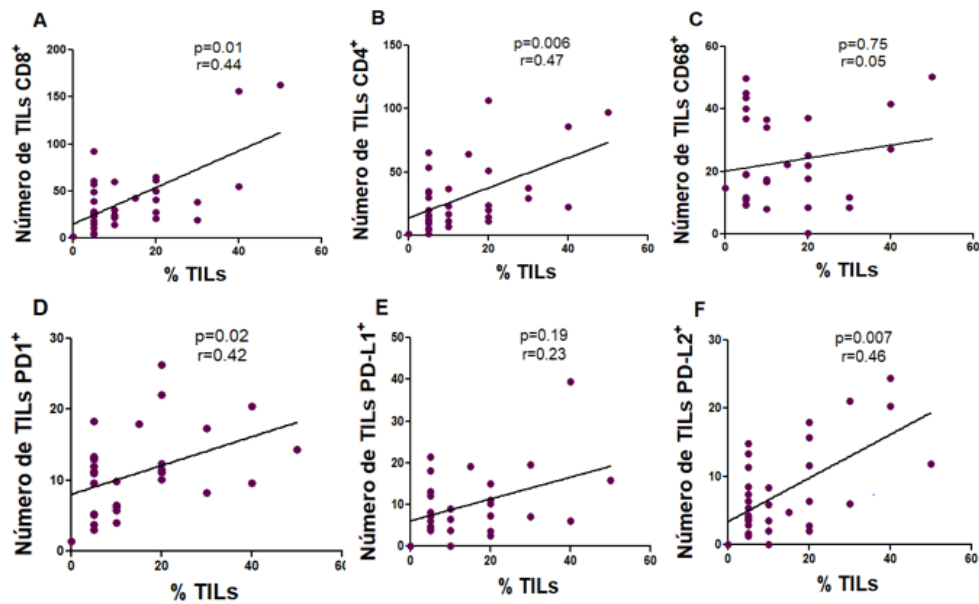
Além da análise quantitativa realizada entre os grupos de estadiamento, foram comparados mais dois grupos: pacientes não portadoras de metástase a distância (N=27) e pacientes portadoras de metástase a distância (N=5). Não foi observado diferença significativa na quantificação de todos os marcadores apresentados, porém, o que pode ter relação com o resultado obtido na análise é que o grupo de portadoras de metástase é bem menor que outro grupo sem metástase a distância (Gráfico 2).



**Gráfico 2. Quantificação de marcadores em pacientes portadoras de metástase a distância e não portadoras de metástase a distância.** Nos gráficos estão representadas as análises morfológicas dos marcadores CD8, CD4, CD68, PD1, PD-L1 e PD-L2, no tumor mamário de pacientes não portadoras de metástase e portadoras de metástase. Não foram observados em nenhum dos marcadores apresentaram resultado significativo (Considerado  $p < 0,05$ ).

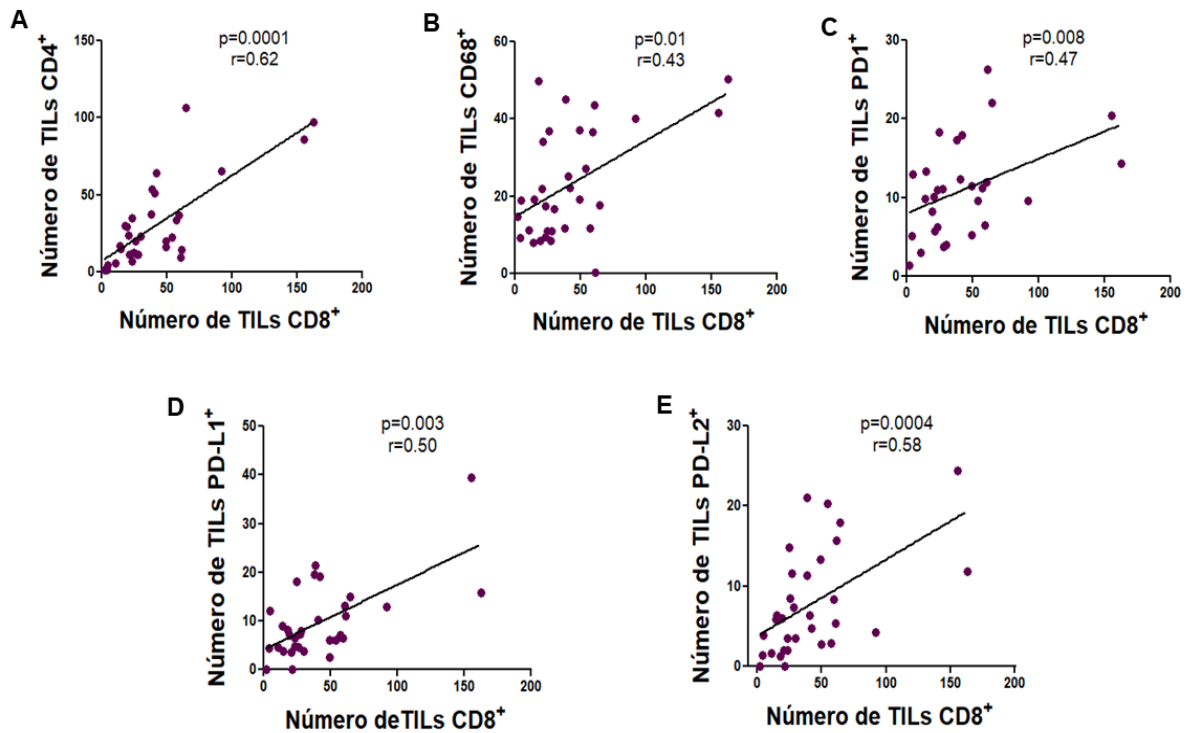
Foi avaliado também se a % de TILs totais possui relação com os marcadores imunológicos estudados. Se observou uma correlação positiva entre % de TILs e os marcadores imunológicos CD8 ( $r=0,44$  e  $p=0,01$ ); CD4 ( $r=0,44$  e  $p=0,0062$ ); PD1 ( $r=0,42$  e  $p=0,02$ ) e PD-L2 ( $r=0,46$  e  $p=0,007$ ), enquanto não foi observada correlação entre % de TILs e os marcadores imunológicos CD68 ( $r=0,05$  e  $p=0,75$ ) e PD-L1 ( $r=0,23$  e  $p=0,19$ ) (Gráfico 3). Para a análise de correlação entre % de TILs e os marcadores foi usado o teste estatístico de *Spearman*, para análise de dados não paramétricos, considerado o valor de  $p > 0,05$ .





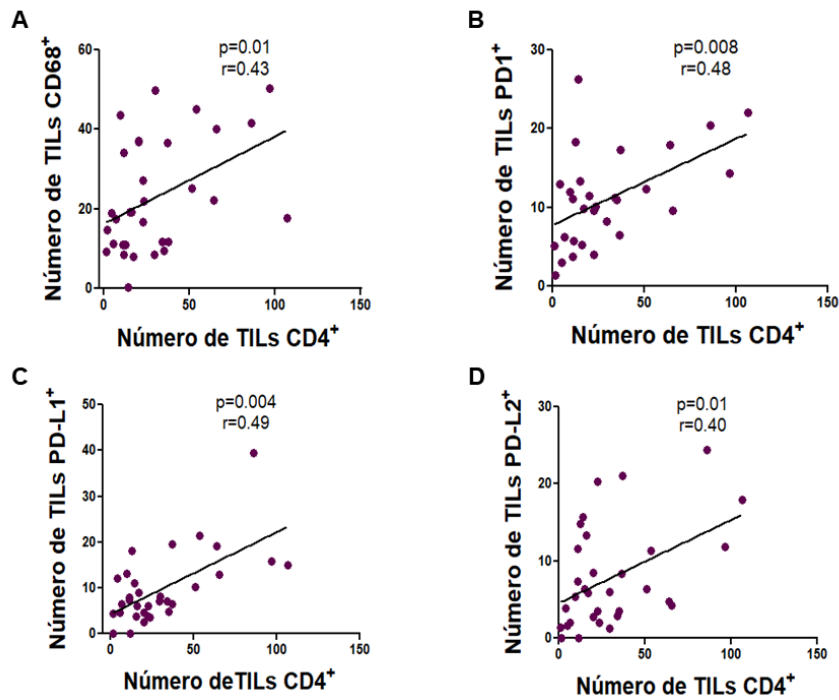
**Gráfico 3. Análise de correlação entre % TILs e marcadores imunológicos.** Nos gráficos estão representadas as análises de correlação entre % TILs e marcadores imunológicos. Nos gráficos A, B, D e F observa-se correlação positiva entre %TILs e os marcadores imunológicos CD8, CD4, PD1 e PD-L2. Enquanto nos gráficos C e E não foi observado correlação significativa entre % TILs e os marcadores CD68, PD-L1. Foi considerado como valor significativo ( $p<0,05$ ).

Para uma análise mais abrangente, foram avaliadas também as relações dos marcadores imunológicos e *imunocheckpoints* estudados, entre si. Quando se realizou a análise de relação entre o marcador imunológico TCD8 e os demais marcadores, foi observado que houve uma correlação positiva entre CD8 e os marcadores, PD1 ( $r=0,47$  e  $p=0,008$ ), e correlação positiva moderada com CD4, PD-L1 e PD-L2 ( $r=0,62$  e  $p=0,0001$ ), ( $r=0,50$  e  $p=0,003$ ) e ( $r=0,58$  e  $p=0,0004$ ) respectivamente, porém, não se observou correlação entre CD8XCD68 ( $r=0,43$  e  $p=0,41$ ), (Gráfico 4). Para os testes de correlação entre CD8 e os marcadores foi usado o teste estatístico de *Spearman*, para análise de dados não paramétricos, utilizado para testes paramétricos foi considerado valor de  $p>0,05$ .



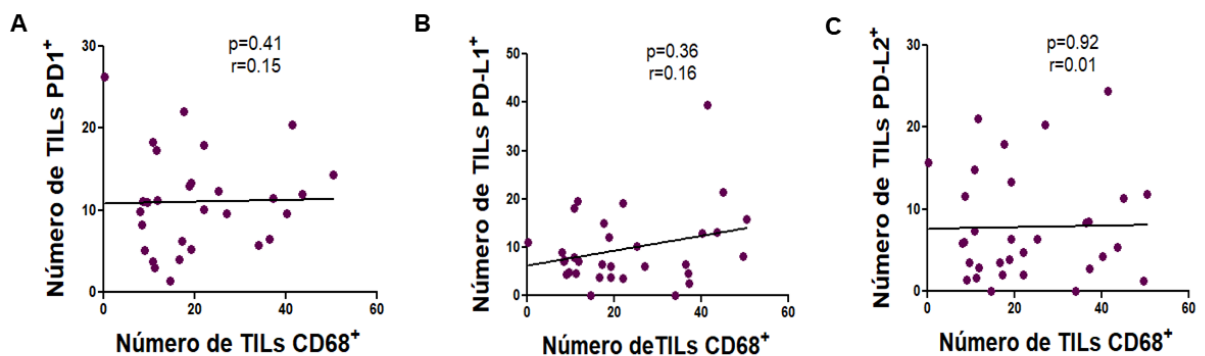
**Gráfico 4. Análise de correlação entre CD8 e demais marcadores imunológicos.** Nos gráficos estão representadas as análises de correlação entre CD8 e marcadores imunológicos. Nos gráficos A, B, D e E, observa-se correlação positiva entre CD8 e os marcadores imunológicos, CD4, PD1, PD-L1 e PD-L2. No gráfico C não foi observada correlação CD8XCD68. Foi considerado como valor significativo ( $p < 0,05$ ).

Para análise de relação do marcador imunológico CD4 e os marcadores CD68, PD1, PD-L1 e PD-L2, foi observado que houve uma correlação moderada entre CD4 e os marcadores PD1, PD-L1, com ( $r=0,48$  e  $p=0,008$ ), ( $r=0,49$  e  $p=0,004$ ) respectivamente, e PD-L2 ( $r=0,40$  e  $p=0,01$ ). Não foi observada correlação com o marcador CD68 ( $r=0,43$  e  $p=0,01$ ) (Gráfico 5). Para os testes de correlação entre CD4 e os demais marcadores, foi usado o teste estatístico de *Spearman*, para análise de dados não paramétricos, foi considerado valor de  $p > 0,05$ .



**Gráfico 5. Análise de correlação entre CD4 e marcadores imunológicos.** Nos gráficos estão representadas as análises de correlação entre CD4 e marcadores imunológicos. Nos gráficos, B, C e D, observa-se correlação positiva entre CD4 e os marcadores imunológicos, PD1, PD-L1 e PD-L2. No gráfico A, não foi observada correlação entre os marcadores CD4xCD68. Foi considerado como valor significativo ( $p < 0,05$ ).

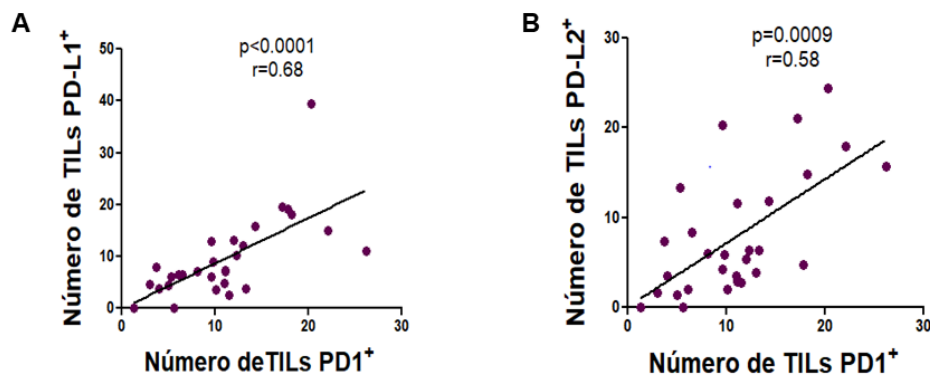
Na análise de relação de CD68 com os marcadores PD1, PD-L1 e PD-L2, não foi observada correlação com os marcadores PD1 ( $r = 0,15$  e  $p = 0,41$ ), PD-L1 ( $r = 0,16$  e  $p = 0,36$ ) e PD-L2, ( $r = 0,01$  e  $p = 0,92$ ) (Gráfico 6). Para os testes de correlação entre CD68 e os marcadores PD1, PD-L1 e PD-L2 foi usado o teste estatístico de *Spearman*, para análise de dados não paramétricos, foi considerado valor de  $p > 0,05$ .



**Gráfico 6. Análise de correlação entre CD68 e marcadores imunológicos.** Nos gráficos estão representadas as análises de correlação entre CD68 e marcadores imunológicos. Nos gráficos A, B e

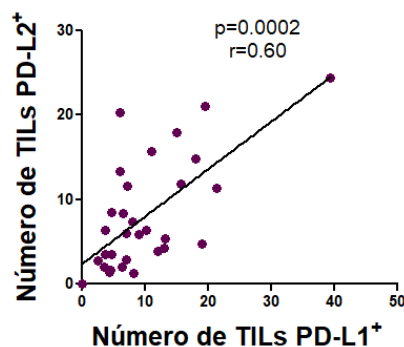
C, não se observou correlação positiva com os marcadores PD1, PD-L1 e PD-L2. Foi considerado como valor significativo ( $p < 0,05$ ).

Na análise de relação do *imunocheckpoint* PD1 com os marcadores PD-L1 e PD-L2, foi observado que houve uma correlação moderada entre PD1 e os marcadores PD-L1 ( $r=0,68$  e  $p < 0,0001$ ) e PD-L2, ( $r=0,58$  e  $p=0,0009$ ) (Gráfico 7). Para os testes de correlação entre PD1 e os marcadores PD-L1 e PD-L2, foi utilizado o teste estatístico de *Spearman*, para análise de dados não paramétricos. Foi considerado valor de  $p > 0,05$ .



**Gráfico 7. Análise de correlação entre o *imunocheckpoint* PD1 e demais marcadores imunológicos.** Nos gráficos estão representadas as análises de correlação entre PD1 e marcadores imunológicos. Nos gráficos A e B observa-se correlação positiva entre PD1 e os marcadores PD-L1 e PD-L2. Foi considerado como valor significativo ( $p < 0,05$ ).

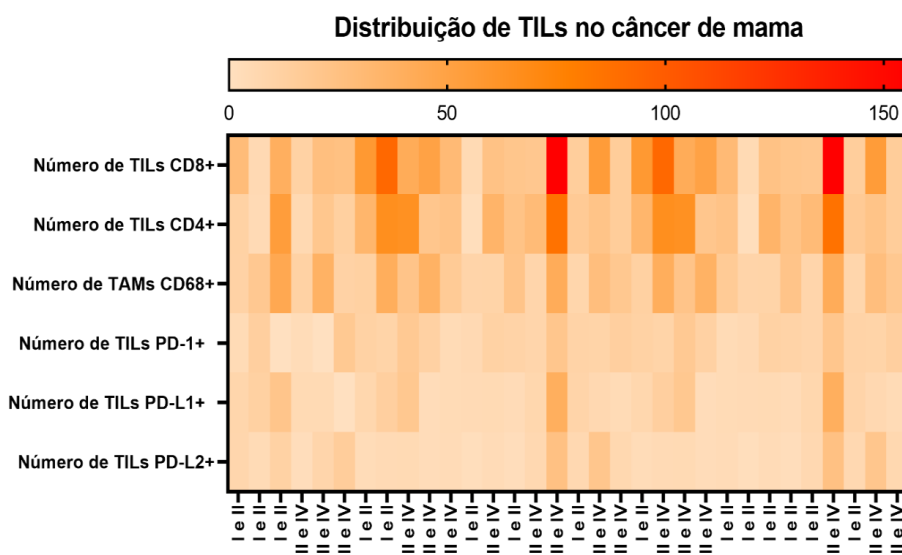
Na análise de relação entre os ligantes PD-L1 e PD-L2 foi observada correlação moderada com ( $r=0,60$  e  $p=0,0002$ ) (Gráfico 8). Para os testes de correlação entre PD-L1 e PD-L2 foi usado o teste estatístico de *Spearman*, para análise de dados não paramétricos. Foi considerado valor de  $p > 0,05$ .



**Gráfico 8. Análise de correlação entre os *imunocheckpoints* PD-L1 e PD-L2.** No gráfico está representada a análise de correlação entre PD-L1 e PD-L2. Foi observada correlação positiva entre os marcadores PD-L1 X PD-L2. Foi considerado como valor significativo ( $p < 0,05$ ).

Ainda foram realizadas análises de relação entre % de TILs e marcadores imunológicos de pacientes com linfonodo comprometido, sendo então observado somente a correlação entre %TILs e CD4 (Linfonodo comprometido) com ( $r=0,57$  e  $p=0,02$ ) e por se tratar de um N pequeno (15 pacientes), não foi considerado a inclusão nos resultados neste estudo. Também foi realizada a análise entre % de TILs e estadios, com o mesmo N da análise anterior. Nos estadios I e II, não se observou nenhuma correlação positiva para nenhum dos marcadores, diferente dos estadiamentos III e IV, que mesmo com um número amostral baixo, foram observadas correlações positivas entre % de TILs e os marcadores imunológicos CD8, CD4, PD1 e PD-L1, nos estadios mais elevados (III e IV).

Foram realizadas análises de distribuição de todos os marcadores TILs+ de acordo com os grupos de estadiamento, foi observado que as células mais expressas no microambiente tumoral, são CD8, CD4 e CD68, e que estas são mais expressas por pacientes dos estadios mais altos (III e IV) (Gráfico 9). Na distribuição de TILs e grupos moleculares pôde se observar que pacientes dos grupos triplo negativo e luminal B demonstram uma maior expressão de TILs (Gráfico 10).



**Gráfico 9. Distribuição de TILs nos grupos de estadiamento.** No heatmap está representada a distribuição de TILs nos grupos de estadios I e II, III e IV. Cores mais escuras demonstram maior expressão do marcador, enquanto as cores mais claras demonstram menor expressão de cada marcador.



## 6.0 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização clínica-patológica de amostras mamárias de pacientes em dois grupos de estadiamentos distintos (I e II) e, (III e IV), além de correlacionar com o perfil imunológico dessas pacientes, realizando a quantificação das células imunológicas CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD68<sup>+</sup> e *immune checkpoints* PD-1, PD-L1 e PD-L2, através da técnica de imuno-histoquímica.

Através da análise entre os grupos de estadios e variáveis clinico-histopatológicas foi visto associação significativa entre os estadios e tamanho do tumor, receptor de estrogênio, progesterona e %HER2 e associação de carcinoma *in situ*. Outros estudos observaram que uma maior densidade de TILs está associada a tumores maiores, grau histológico e índice de Ki67, e não foi visto associação com idade, assim como pudemos ver em nossa análise (HWANG et al., 2019; PUJANI et al., 2020).

Em nosso estudo, as pacientes nos estadios III e IV (com a exceção de uma paciente), foram tratadas com terapia neoadjuvante e apresentaram maior inflamação. Outros trabalhos também demonstraram que o aumento no número de TILs pré-tratamento possui forte relação preditiva com a resposta patológica completa (RPC) em pacientes tratadas em terapia neoadjuvante nos subgrupos HER2<sup>+</sup> e triplo negativo (mais estudados), e menos nos grupos luminais A e B (JEONG et al., 2019). Esses resultados demonstram que o maior número de TILs tem um potencial preditivo na resposta a quimioterapia em todos os grupos moleculares. Em outro estudo, foi investigada a presença da infiltração linfocitária antes e depois do tratamento neoadjuvante em tumores HER2<sup>+</sup>, mostrando que a RPC correlacionou com o alto grau de TILs nas amostras pré-tratadas, mas o número de TILs foi menor nas pacientes com resposta parcial. Assim o status de TILs em tumores primários pôde prever a RPC a quimioterapia neoadjuvante no CM HER2<sup>+</sup> (KUROZUMI et al., 2017).

Os diferentes tipos moleculares de CM possuem comportamentos e respostas distintas a doença e ao tratamento, o que demonstra o quão heterogeneo é esse tipo de carcinoma. Uma revisão sistemática avaliou uma observou que o valor médio de TILs no infiltrado inflamatório foi de 20% no subtipo triplo negativo (STANTON; ADAMS; DISIS, 2016). Assim como outro estudo retrospectivo com 897 pacientes que identificou a mesma porcentagem média de (21,9%) de TILs entre as pacientes triplo

negativo (PRUNERI et al., 2016). Em investigação também em pacientes com CM tipo triplo negativo foi observado que as pacientes ao serem submetidas a quimioterapia, apresentaram um aumento de 10% de TILs. Essa redução levou por sua vez a redução no risco de recorrência da doença em 15 a 17% e redução no risco de morte em 17 a 27% das pacientes (HE et al., 2020). Denkert e cols, (2010) observaram que a RPC traduziu-se em benefício de sobrevida em pacientes com CM triplo negativo e HER2 positivo, o que não foi visto no CM luminal, com HER2 negativo. Em pacientes com tumores luminais, um baixo nível de TILs foi associado a melhor sobrevida global, sinalizando que os TILs podem estar ligados a uma reduzida resposta à terapia endócrina (DENKERT et al., 2010). Apesar dos estudos ressaltarem o valor prognóstico e preditivo da avaliação da intensidade de TILs nos tumores da mama, esta avaliação ainda não é parte da rotina diagnóstica (RAVELLI et al., 2017).

A investigação de TILs em 980 pacientes com CM tipo luminal, revelou que os maiores níveis de TILs possuem associação desfavorável com parâmetros clínicos-patológicos. Foi observado alta expressão de TILs, associado a baixa expressão de RE e altos níveis de Ki67. Em contrapartida, naqueles pacientes luminais B-like que apresentaram um bom prognóstico, com altos níveis de Ki67 ( $\geq 20\%$ ), o contrário dos luminais que apresentam baixos níveis de Ki67 (CRISCITIELLO et al., 2020). Além disso, altas taxas de TILs foram correlacionadas ao aumento da RPC nos CM luminal. No entanto a análise de sobrevivência demonstrou uma associação entre TILs mais altos e menor sobrevida no subtipo Luminal B-like (DENKERT et al., 2018). Nesse caso, se observa uma divergência nos dados obtidos no CM do tipo Luminal, que pode ter relação com a diferença entre seus fenótipos. Os resultados demonstram uma necessidade de mais estudos sobre a infiltração linfocitária nesse subgrupo (DIECI et al., 2016).

TAKADA e cols, em seu estudo (2018), avaliaram biópsias de linfonodos axilares pré-tratamento. Nos casos com menor número de TILs, a expressão de estrogênio foi maior, enquanto a expressão de HER2 foi relativamente baixa. A densidade de TILs também foi significativamente menor nos subtipos de CM com receptores hormonais positivos. Também foi observado que linfonodos que apresentaram metástase são mais comuns aos casos HER2 negativos e com baixo número de TILs (TAKADA et al., 2018).

Neste trabalho, foi avaliada a intensidade do infiltrado inflamatório, através da porcentagem de TILs intratumorais. Foi demonstrado que pacientes com estádios III



e IV apresentaram maior porcentagem de TILs, enquanto, as pacientes com os estádios I e II, apresentaram menor número de TILs. As pacientes com estádios mais avançados apresentaram maior infiltração linfocitária. Corroborando com esses dados, a literatura tem descrito pacientes com CM em estádios avançados, conseqüentemente, apresentando tumores maiores de vários tipos moleculares, sendo tumores mais agressivos, no entanto, faltam estudos que investigaram a associação de TILs com estadiamentos mais avançados (GAO et al., 2020).

Investigamos nesse estudo a presença de TILs CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> em diversos estádios. As pacientes que pertenciam aos estádios III e IV, apresentaram maior infiltração celular. Muitos fatores podem estar associados ao maior recrutamento linfocitário nessas pacientes. Dados de ensaios clínicos apontam para o papel de TILs CD8<sup>+</sup> na eficácia terapêutica do tratamento de tumores (ANICHINI et. al, 1996). Estudos realizados por Verma et. al, (2020), descreveram que linfócitos CD4<sup>+</sup> foram o subtipo mais prevalente no estroma tumoral, enquanto os linfócitos CD8<sup>+</sup> foram os mais prevalentes nos ninhos tumorais.

Os linfócitos CD8<sup>+</sup> são um componente citotóxico crucial da imunidade mediada por células, pois matam a célula tumoral, controlando o microambiente tumoral. Portanto, a presença dessas células, especialmente TILs, em contato com células tumorais em seus ninhos, podem ser associados a uma melhor sobrevida clínica e RPC (LUEN et al., 2017). Já os linfócitos CD4<sup>+</sup>, se dividem em subpopulações, com atividades pró ou antitumorais (AHN et al., 2020). Destes, os fenótipos que possuem resposta Th1, juntamente com as recém-descobertas Tfh (células auxiliares foliculares T) possuem respostas favoráveis nos tratamentos adjuvante e neoadjuvante. Já aquelas de resposta Th2, possuem atividade reguladora (FOXP3), estabelecendo um ambiente imunossupressor e sendo assim, associadas a um pior prognóstico (ZEPPELLINI et al., 2021). Mesmo no carcinoma metaplásico da mama, um tipo histológico raro de câncer de mama, que comumente apresenta resistência às terapias padrão e está associado a mau prognóstico, apresenta TILs infiltrantes, no entanto, as pacientes que apresentam mais TILs CD8<sup>+</sup> apresentam melhor prognóstico do que as demais pacientes (CHAO et al., 2020).

Além de TILs CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, também observamos o aumento de TAMs CD68<sup>+</sup> nas pacientes pertencentes aos estádios III e IV. A literatura descreve o aumento de TAMs, como um marcador de pior prognóstico em vários tipos de tumores, pois macrófagos que polarizam no tipo M2, produzem uma série de citocinas que

promovem o escape da célula tumoral e propicia formação de metástases (JUBB et al., 2010). No CM foi observado que a taxa de sobrevida de 5 anos das pacientes é significativamente menor no grupo com alta densidade de TAMs no tumor primário, quando comparado ao grupo com baixa infiltração (YANG et al., 2015) . Em modelos animais de CM luminal RE positivo, a progressão para carcinoma invasivo é acompanhada por uma resposta estromal e imunológica local, composta predominantemente por células T e macrófagos. Em cultura os tumores secretam tanto fatores quimioatrativos quanto quimioinibidores. O resultado parece ser o recrutamento da reação imune para a periferia do tumor, com exclusão da infiltração de células imunes no tumor (SEGOVIA-MENDOZA; MORALES-MONTOR, 2019).

DENARDO e cols (2011) observaram que o infiltrado inflamatório composto por linfócitos T CD4 e CD8 além de macrófagos CD68 se correlacionava com aspectos do sistema regulatório no CM. Para validar essa questão, analisaram a densidade de CD4, CD8 e CD68 em amostras de tecido tumoral de 179 pacientes sem tratamento. Foi observado que a alta densidade de células T CD4 e baixa densidade de células T CD8 se correlacionava com redução da sobrevida global, enquanto que a densidade celular de CD68 não demonstrou associação. Além disso, os autores descreveram uma associação inversa entre CD68 e CD8 assim como descrevemos, através da análise de correlação realizada entre esses marcadores.

Neste trabalho, através da caracterização imuno-histoquímica dos *immune checkpoints* foi observado o aumento do número de TILs expressando PD-1, PD-L1 e PD-L2 nas pacientes dos estadios III e IV. Aqui todas as amostras de mama foram reativas aos marcadores e apresentaram algum grau de expressão. A expressão de PD-1 nos linfócitos do infiltrado tumoral foi investigado em 660 casos de CM Foi observada a presença de TILs em 15,8% dos casos, e a presença foi associada com o tamanho do tumor, grau histológico e acometimento linfonodal. A presença de TILs expressando PD-1 também foi associada à pior sobrevida global, notadamente nos subtipos luminal B (HER2+ e HER2-) e triplo-negativo(MUENST et al., 2013) .

A análise do score da expressão de PD-L1 em células tumorais mostrou que todas as amostras apresentaram algum grau de expressão de 1 a 3, sendo que a grande maioria das pacientes apresentaram expressão 2 ou 3 no score. No entanto, a literatura descreve que no CM a expressão de PD-L1 é considerada baixa, em média de 10 a 30% quando são comparadas a outros tipos de tumores, como o câncer de pulmão de não pequenas células (70%)(AGGARWAL et al., 2016) . Essa expressão

se dá de acordo com estadio e subtipo molecular do CM, sendo que os subtipos negativos e HER2+ são os que apresentam maior expressão. No presente trabalho, não foi possível uma análise dos marcadores de acordo com os subtipos moleculares e existe uma falta de trabalhos que demonstrem dados concisos a respeito da expressão de PD-L1 em tumores iniciais vs. avançados como analisado no nosso trabalho. De fato, existe uma discordância dos dados desse trabalho com os apresentados na literatura já que as menores expressões de PD-L1 foram encontradas no CM avançado, porém foi do subtipo molecular com receptor de hormônio positivo (0 a 10%), seguido por CM inicial com receptor de hormônio positivo (9 a 45%). Já no CM HER2+ não metastático, a expressão se mostrou entre 30 à 35%, diminuindo para 9 a 15% quando o tumor HER2+ for avançado. No CM triplo negativo metastático, a expressão de PD-L1 foi vista em 30 a 40 % dos pacientes, chegando à média de 35 a 60% quando o CM triplo negativo está em fase inicial (ALLISON, 2015)(OHAEBULAM et al., 2015). Baptista e colaboradores, em estudo publicado em 2016, avaliaram a expressão de PD-L1 em 196 casos de CM, desses, 56,6% dos casos foi encontrada a expressão do marcador, porém bem menor em pacientes com CM positivos para RE. Além disso, a maior expressão de PD-L1 foi significativamente associada a melhor sobrevida, apesar da associação ruim com características clínicas e patológicas (BAPTISTA et al., 2016). Assim, acreditamos que análises futuras da marcação de PD-L1 nos CM de acordo com o subtipo molecular pode resolver essa questão.

Nesse sentido, uma meta-análise avaliou nove estudos com um total de 8.583 casos de CM, com o objetivo de descobrir o valor prognóstico de PD-L1. Observou-se grande heterogeneidade entre os pacientes incluídos nos diversos estudos, com relação aos estadios da doença, tipos de anticorpos utilizados e avaliação do escore do marcador utilizado. Não foi observado um impacto significativo da superexpressão de PD-L1 na sobrevida livre de doença e metástase das pacientes, porém, a expressão de PD-L1 foi significativamente correlacionada a redução de sobrevida global (WANG et al., 2017). Em um estudo mais recente, foram examinadas 1.318 amostras de CM para a análise da expressão de PD-L1, utilizando um mesmo clone (anticorpo SP263, corte de  $\geq 1\%$ ). Foi observada expressão positiva de PD-L1 em quase 74% das células imunes e em 60% dos tumores mamários. Em tumores triplo negativo, os TILs PD-L1+ foram associados a sobrevida livre de doença. A densidade de TILs foi significativamente associada à expressão de PD-1 e PD-L1 em células

imunes e PD-L1 em células tumorais (NOSKE et al., 2019). Corroborando em parte com os dados vistos na análise de correlação realizada por este estudo. A densidade de TILs foi correlacionada com PD-1, porém não houve correlação com PD-L1. Já nas outras análises de correlação realizadas entre os marcadores imunológicos e *immune checkpoints*, entre si, podemos observar que houve correlação entre os marcadores CD8, CD4, PD1, PD-L1 e PD-L2, porém, não foi observada correlação desses marcadores com CD68.

Foram realizadas por este estudo, análise de associação, entre os grupos de estadios estudados e variáveis clinico-patológicas. Embora não tenham sido realizados de acordo com a expressão de PD-L1 como no estudo abaixo relacionado, algumas das associações também foram observados nesta análise. Kim e *co/s.* em 2017 avaliaram a significância clínico-patológica e prognóstica da expressão de PD-L1 no CM. Os resultados demonstraram que o maior grau histopatológico e metástase linfonodal estão associados com maior expressão de PD-L1 tanto no tumor, quanto em células imunológicas. E a maior expressão de PD-L1 está associada ao maior tamanho do tumor, maior grau histológico, receptores hormonais negativos e HER2-. Estudos anteriores a este, se referiram a relação entre maior grau histológico, metástase linfonodal, maior tamanho de tumor e positividade de PD-L1, como sendo relacionados ao fenômeno de “escape imunológico”, em que as células tumorais são capazes de se tornarem “invisíveis”, expressando antígenos que não são identificados pelo sistema imune. Sendo assim, pode-se sugerir que a presença de TILs é um fator prognóstico favorável no CM e os TILs podem agir em consonância com quimioterapia e terapia com inibidores de *immuno checkpoints* para uma melhor resposta dessas pacientes. O uso dos níveis de TILs em CM se torna importante, uma vez que estes auxiliam na descoberta de tumores mais susceptíveis à imunomodulação, o que pode indicar estratégias adicionais para ao tratamento (KUZNAR et al. 2017).

Neste estudo, foi observada a presença de maior infiltrado inflamatório nas pacientes dos estadios III e IV e correlação entre linfócitosT (CD8+ e CD4+) e os marcadores de *immuno checkpoints*, demonstrando que essas pacientes poderiam possivelmente se beneficiar de tratamentos com inibidores de PD-1 ou PD-L1. Além disso, macrófagos e linfócitos T regulatórios representam provavelmente mecanismos contra-regulatórios importantes que o tumor recruta no intuito de permitir um escape da resposta imune adaptativa (PLESCA et al., 2020). O entendimento mais apurado de como atuam as células imunológicas no desenvolvimento do tumor, especialmente

em uma doença com uma diversidade de grupos moleculares e tipos histológicos como o CM ainda se faz necessário.

## **7.0 CONCLUSÃO:**

Neste trabalho, pode-se observar que pacientes com estadios III e IV possuem um infiltrado inflamatório mais intenso do que pacientes com estadios I e II, formado de linfócitos CD8, CD4 e TAMsCD68+. Os TILs têm se mostrado importantes como valor prognóstico, principalmente no câncer de mama HER2+ e triplo negativo. Mais estudos sobre os diferentes papéis das subclasses de TILs, nos diversos subtipos moleculares de CM se fazem importantes, podendo auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos, trazendo melhores evidências que possam ser utilizadas na imunoterapia. Além disso, os subgrupos luminais são menos estudados e seus valores preditivos e prognósticos ainda permanecem controversos.

## REFERÊNCIAS

- ABAD, M. N. et al. **Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) as Immunotherapy Biomarker in Breast Cancer**. *CancersMDPI*, , 1 jan. 2022.
- AGGARWAL, C. et al. Prevalence of PD-L1 expression in patients with non-small cell lung cancer screened for enrollment in KEYNOTE-001, -010, and -024. *Annals of Oncology*, v. 27, p. vi363, out. 2016.
- AHN, S. et al. Changes and prognostic values of tumor-infiltrating lymphocyte subsets after primary systemic therapy in breast cancer. *PLoS ONE*, v. 15, n. 5, 1 maio 2020.
- ALLISON, J. P. **Immune checkpoint blockade in cancer therapy the 2015 Lasker-Debakey clinical medical research award**. *JAMA - Journal of the American Medical Association*American Medical Association, , 15 set. 2015.
- BAPTISTA, M. Z. et al. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Human Pathology*, v. 47, n. 1, p. 78–84, 1 jan. 2016.
- CHAO, X. et al. Immune parameters associated with survival in metaplastic breast cancer. *Breast Cancer Research*, v. 22, n. 1, 18 ago. 2020.
- CRISCITIELLO, C. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2– breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 183, n. 2, p. 347–354, 1 set. 2020.
- CUNHA, S. et al. **Progesterone receptor targeting with radiolabelled steroids: An approach in predicting breast cancer response to therapy**. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2013.
- DENKERT, C. et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 1, p. 105–113, 1 jan. 2010.
- DENKERT, C. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology*, v. 19, n. 1, p. 40–50, 1 jan. 2018.
- DIECI, M. V. et al. **The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end?** *Cancer Treatment Reviews*W.B. Saunders Ltd, , 1 maio 2016.
- DIECI, M. V.; MIGLIETTA, F.; GUARNERI, V. **Immune infiltrates in breast cancer: Recent updates and clinical implications**. *CellsMDPI*, , 1 fev. 2021.
- DOS SANTOS, T. B. et al. Prevalence and factors associated to advanced stage breast cancer diagnosis. *Ciencia e Saude Coletiva*, v. 27, n. 2, p. 471–482, 2022.
- DUFFY, M. J. et al. **Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM)**. *European Journal of Cancer*Elsevier Ltd, , 1 abr. 2017.

FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: An update. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 55, n. 3, p. 327–332, 2019.

GAO, Z. HUA et al. Predictive and prognostic role of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2020.

GODOY-ORTIZ, A. et al. Deciphering her2 breast cancer disease: Biological and clinical implications. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. OCT, 2019.

GONÇALVES ROSA ROSA, K. et al. **A IMPORTÂNCIA DA CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR NO PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA: PERSPECTIVAS ATUAIS THE IMPORTANCE OF MOLECULAR CLASSIFICATION IN THE BREAST CANCER PROGNOSIS: CURRENT PERSPECTIVES**. [s.l.: s.n.].

HALIM, F. et al. **Programmed death ligand-1 protein expression difference in basal like and non-basal like triple negative breast cancer and its association with disease free survival and overall survival: A systematic review**. **Oncology Reviews**Page Press Publications, , 21 set. 2021.

HE, L. et al. Association between levels of tumor-infiltrating lymphocytes in different subtypes of primary breast tumors and prognostic outcomes: A meta-analysis. **BMC Women's Health**, v. 20, n. 1, 5 set. 2020.

HWANG, H. W. et al. **A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients**. **Breast Cancer Research and Treatment**Springer New York LLC, , 30 jan. 2019.

IWAI, Y. et al. **Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade**.1 de ago.2002.

JEONG, H. et al. Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 22, n. 1, p. 38–51, 1 mar. 2019.

JUBB, A. M. et al. Expression of vascular Notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer. **American Journal of Pathology**, v. 176, n. 4, p. 2019–2028, 2010.

KAVARTHAPU, R.; ANBAZHAGAN, R.; DUFAU, M. L. **Crosstalk between PRLR and EGFR/HER2 signaling pathways in breast cancer**. **Cancers**MDPI, , 2 set. 2021.

KUROZUMI, S. et al. **Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer**. **Medical Molecular Morphology**Springer Tokyo, , 1 dez. 2017.

LIGIBEL, J. A.; WINER, E. P. Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 3 Suppl 11, p. 38–43, jun. 2002.

LIMA, E. DE O. L.; SILVA, M. M. DA. Quality of life of women with locally advanced or metastatic breast cancer. **Revista gaucha de enfermagem**, v. 41, p. e20190292, 2020.

LUEN, S. J. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 141–155, 1 fev. 2017.

MARTINS, P. R. et al. Cervical cancer patients that respond to chemoradiation therapy display an intense tumor infiltrating immune profile before treatment. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 111, 1 dez. 2019.

MUENST, S. et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 139, n. 3, p. 667–676, jun. 2013.

NOSKE, A. et al. Relevance of tumour-infiltrating lymphocytes, PD-1 and PD-L1 in patients with high-risk, nodal-metastasised breast cancer of the German Adjuvant Intergroup Node–positive study. **European Journal of Cancer**, v. 114, p. 76–88, 1 jun. 2019.

OHAEBGULAM, K. C. et al. **Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. Trends in Molecular Medicine** Elsevier Ltd, , 2015.

OHL, I. C. B. et al. **Public actions for control of breast cancer in Brazil: integrative review. Revista brasileira de enfermagem**, 1 jul. 2016.

PLESCA, I. et al. **Characteristics of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Prior to and During Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 4 mar. 2020.

PRUNERI, G. et al. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 2, p. 249–256, 1 fev. 2016.

PUJANI, M. et al. Evaluation of Tumor infiltrating lymphocytes in breast carcinoma and their correlation with molecular subtypes, tumor grade and stage. **Breast disease**, v. 39, n. 2, p. 61–69, 2020.

RAVELLI, A. et al. **Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. Tumor Biology** SAGE Publications Ltd, , 1 abr. 2017.

SALEMME, V. et al. **The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. Frontiers in Oncology** Frontiers Media S.A., , 11 mar. 2021.

SAWAKI, M.; SHIEN, T.; IWATA, H. **TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). Japanese Journal of Clinical Oncology** Oxford University Press, , 1 mar. 2019.

SEGOVIA-MENDOZA, M.; MORALES-MONTOR, J. **Immune tumor microenvironment in breast cancer and the participation of estrogens and its receptors into cancer physiopathology. Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 2019.

STANTON, S. E.; ADAMS, S.; DISIS, M. L. **Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. JAMA oncology**, 1 out. 2016.



SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

TAKADA, K. et al. Possibility of avoiding axillary lymph node dissection by immune microenvironment monitoring in preoperative chemotherapy for breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, 19 nov. 2018.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. **Molecular Classification of Breast Cancer**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.anatomicpathology.com](http://www.anatomicpathology.com)>.

ULANER, G. A. et al. Molecular imaging of biomarkers in breast cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, p. 53S-59S, 1 fev. 2016.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. **Breast Cancer Treatment: A Review**. **JAMA - Journal of the American Medical Association**American Medical Association, , 22 jan. 2019.

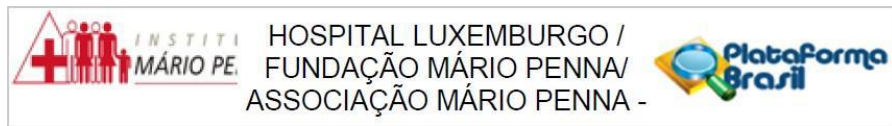
WANG, C. et al. Prognostic Value of PD-L1 in Breast Cancer: A Meta-Analysis. **Breast Journal**, v. 23, n. 4, p. 436–443, 1 jul. 2017.

YANG, J. et al. **The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis***Int J Clin Exp Pathol*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.ijcep.com/](http://www.ijcep.com/)>.

ZEPPELLINI, A. et al. Comparison of tumor microenvironment in primary and paired metastatic ER+/HER2- breast cancers: results of a pilot study. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

ZEVALLLOS, A. et al. **The hispanic landscape of triple negative breast cancer**. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**Elsevier Ireland Ltd, , 1 nov. 2020.

## ANEXO 1

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE PAINÉIS DE BIOMARCADORES COMO INSTRUMENTOS PREDITIVOS DE PROGNÓSTICO E RESPOSTA CLÍNICA AO TRATAMENTO DO CÂNCER DO COLO UTERINO, OVÁRIO E MAMA: ESTRATÉGIA PARA UMA ONCOLOGIA PERSONALIZADA

**Pesquisador:** PAULO GUILHERME DE OLIVEIRA SALLES

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 82703418.8.0000.5121

**Instituição Proponente:** ASSOCIACAO MARIO PENNA

**Patrocinador Principal:** ASSOCIACAO MARIO PENNA

## ANEXO 2



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa "Desenvolvimento de painéis de biomarcadores como instrumentos preditivos de prognóstico e resposta clínica ao tratamento do câncer do colo uterino, endométrio e mama: estratégia para uma oncologia personalizada". Neste estudo, pretendemos entender porque algumas mulheres com câncer de colo do útero, câncer de ovário ou câncer de mama respondem bem ao tratamento de quimioterapia e radioterapia, enquanto outras não respondem tão bem ao mesmo tratamento.

Para isso, estamos pedindo a sua autorização para que possamos utilizar nessa pesquisa, parte do material do tumor com o qual você foi diagnosticada (originado da biópsia ou cirurgia) além de duas amostras de sangue (dois tubos de 8 mL – equivalente a 1 colher de sopa).

Todas as amostras e informações do seu prontuário hospitalar serão utilizadas para um estudo científico detalhado, que tem como objetivo avaliar a resposta que você terá ao tratamento indicado pelo seu médico. O pesquisador (a pessoa que realizará os estudos) irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste projeto. Este estudo não acrescenta nenhum risco a mais com relação aos procedimentos que você realizaria para fazer o seu tratamento no Hospital.

Para participar deste estudo você não terá nenhum prejuízo ou benefício financeiro. A sua participação é voluntária e caso você não queira participar, isso não acarretará nenhum prejuízo ou modificação na forma em que você será atendida ou receberá seu tratamento pelo médico ou médica. Sempre que desejar, você será esclarecida sobre qualquer dúvida que tiver e estará livre para se recusar ou se retirar do estudo no momento em que desejar, sem nenhum prejuízo ao seu tratamento.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O material biológico e os dados utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de cinco anos, e após esse tempo, serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Qualquer dúvida sobre o projeto, por favor, entre em contato com:

**Pesquisador Principal: Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Sales**

**Telefone: 3299-9528**

**Endereço: Rua Gentios, nº 1.420 – 3º andar Bairro Conjunto Santa Maria – 30380-472 – Belo Horizonte/Minas Gerais**

O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão institucional que tem por objetivo proteger o bem-estar dos participantes da pesquisa. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um participante de pesquisa, pode entrar em contato com:

**Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Mário Penna Hospital Luxemburgo/MS – Associação Mário Penna**

**Telefone: 31 3299 9980**

**Endereço: Rua Gentios, nº 1.420 – 3º andar Bairro Conjunto Santa Maria – 30380-472 – Belo Horizonte/MS**

Eu, \_\_\_\_\_, portadora do documento de Identidade \_\_\_\_\_ declaro que concordo em participar desse estudo, tendo sido informada dos objetivos de maneira clara e detalhada. Esclareci todas as minhas dúvidas e estou ciente de que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

Assinatura da participante ou responsável

Assinatura do Pesquisador Principal  
Dr. Paulo Guilherme de Oliveira Sales  
CRMMS-29376

## ANEXO 1

### **Perfil clínico-histopatológico e imunológico do carcinoma invasor de mama em diferentes estadiamentos**

Adriana Jacauna<sup>1</sup>, Sofia Godinho<sup>1</sup>, Leticia Braga<sup>1</sup>, Paulo Salles<sup>1</sup>, Patrícia Rocha Martins<sup>2</sup> e Cristiana Buzzelin<sup>3</sup>

- 1- Núcleo de Ensino e Pesquisa – Instituto Mário Penna
- 2- Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais.
- 3- Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais

#### **Resumo**

O câncer de mama (CM) continua sendo o tipo mais frequente de neoplasia entre as mulheres. No Brasil foram estimados em 2022, aproximadamente, 43,74 novos casos a cada 100 mil indivíduos. Estratégias que proporcionem maior rastreamento e fatores preditivos de resposta certamente aumentarão a sobrevida dessas pacientes. Nesse contexto, a caracterização dos diferentes tipos celulares do microambiente tumoral é crucial para a identificação de potenciais alvos preditivos de resposta ao tratamento. Esse estudo visa caracterizar o perfil clínico-anatomopatológicos e imunológicos de carcinomas invasores em pacientes com CM, em diferentes estadiamentos. Aqui, investigamos os linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, os macrófagos CD68<sup>+</sup> associados a tumores (TAMs) que participam do controle da resposta imune e estão relacionados a sobrevida de pacientes com CM. Realizamos também a caracterização dos *immunecheckpoints* PD-1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> e PD-L2<sup>+</sup> moléculas envolvidas na supressão da resposta anti-tumoral. Secções de amostras de trinta e duas pacientes portadoras de CM, foram submetidas a técnica de imuno-histoquímica para os marcadores CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD68<sup>+</sup>, PD1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> e PD-L2<sup>+</sup>, em seguida foram avaliadas a expressão destas células na região intratumoral. Na análise entre grupos de estadios e variáveis clínico-histopatológicos foi visto associação entre os estadios e tamanho do tumor, receptor de estrogênio e progesterona e carcinoma *in situ*. Os resultados demonstraram que as pacientes com estadios III e IV possuem maior quantidade de TILs e TAMs nas amostras antes do tratamento. Também foi observado a correlação entre linfócitos T (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>) e os marcadores de *immune checkpoints*. Associações significativas entre TILs e alguns fatores clínicos e patológicos, tornam sua avaliação uma ferramenta para uso futuro na prática clínica.

Palavras-chave: TILs, câncer de mama, imunologia tumoral, pontos de verificação imunes, estádios.

## 1.0 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas configuram um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. O câncer de mama (CM) é o tipo mais frequente de neoplasia entre as mulheres com 2,3 milhões de novos casos em 2020 e 685.000 mortes, estando entre a quinta causa de morte pela doença em todo mundo (SUNG et al., 2021). No Brasil foram estimados 66.280 novos casos de CM em 2021, com aproximadamente 62 novos casos a cada 100 mil indivíduos (INCA 2021).

Sendo uma doença altamente complexa e heterogênea, o comportamento tumoral, o potencial de recidiva e a sobrevida global podem ser parcialmente estimados, através de características clínico-patológicas, como o tamanho do tumor, o grau histológico e o comprometimento de linfonodos. Tais características determinam o estadiamento tumoral (TNM) de acordo com o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019). Após o diagnóstico clínico é necessária uma avaliação histopatológica do tumor primário, através de imuno-histoquímica, realiza-se a determinação do perfil molecular do CM, que serão classificados como luminal A, B, basal like, Her2<sup>+</sup> ou triplo negativo (GODOY-ORTIZ et al., 2019).

Além da classificação do perfil molecular, o grau de resposta imunológica também pode refletir no melhor prognóstico das pacientes (KUROZUMI et al., 2017). O maior número de células imunes se correlaciona com um resultado clínico favorável em várias neoplasias, como melanoma, câncer colorretal, pulmão e mama (FRIDMAN et al., 2012). É essencial identificar o status funcional e os diferentes fenótipos das células imunes no microambiente tumoral, uma vez que essas células podem atuar como fatores anti ou pró-tumorais. As células T citotóxicas, células T auxiliares, células natural killer (NK) e células dendríticas (DC) contribuem para a resposta antitumoral, enquanto que células T reguladoras FOXP3 (*Treg*) e células supressoras derivadas das células mielóides (MDSC) têm um efeito pró-tumoral que promove o crescimento e a invasão do câncer, produzindo fatores que sustentam a angiogênese e promovem a proliferação de células cancerígenas e metástases

(DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010).

No CM, estudos cada vez mais recentes, confirmam os papéis preditivos e prognósticos dos linfócitos infiltrantes tumorais (TILs). Os tumores HER-2 positivo e triplo negativo destacam-se dentre os demais tipos moleculares, com abundantes infiltrados linfocitários (KIM; KOO, 2020). Os TILs são compostos principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. O maior número de TILs CD8<sup>+</sup>, células efetoras do tipo citotóxicas que controlam o crescimento tumoral, se correlaciona com melhor resposta ao tratamento e maior sobrevida. Já os linfócitos CD4<sup>+</sup>, se dividem em subpopulações, com atividades pró ou antitumorais, e não tem uma relação com sobrevida bem estabelecida (AHN et al., 2020). Os macrófagos associados a tumores (TAMs), são outro grupo celular bem estudado atualmente. TAMs podem ser classificados em subtipos M1 e M2 (RETECKI et al., 2021). No tipo M1, são ativados através do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e expressam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, assim, adquirem a capacidade de inibir patógenos e indução de respostas antitumorais. Enquanto os que se diferenciam em M2 regulam a expressão do MHC classe II, além de induzir a expressão de citocinas anti-inflamatórias (FIGUEIREDO, 2019)

Os *immune checkpoints* apresentam efeito regulador da resposta imune (IWAJ et al., 2002). PD-1 (programmed-death 1) é considerada uma molécula coestimuladora que ajuda a manter as respostas imunes do corpo sob controle. As células imunes que expressam PD-1 tem como principais ligantes as proteínas PD-L1 e PD-L2, que são moléculas expressas na superfície de células tumorais e células imunes infiltrantes de tumor sob indução de diversas citocinas, sendo a mais comum interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Durante a interação com PD-1, PD-L1 através de diversas vias de sinalização, promove a diminuição da expressão de marcadores de superfície celular que culminam com a supressão de linfócitos T citotóxicos que são responsáveis por combater o desenvolvimento tumoral (HALIM et al., 2021).

Nesse cenário, são necessários estudos prospectivos para a investigação dos fenótipos de TILs e sua localização no microambiente tumoral nos diversos tipos moleculares e histológicos de CM, contribuindo para a melhoria das futuras abordagens terapêuticas das pacientes. Aqui, caracterizamos TILs CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, TAMs CD68<sup>+</sup> e os *immune checkpoints* PD-1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> e PD-L2<sup>+</sup> no CM em diferentes estadiamentos.

## **2.0 METODOLOGIA**

### **2.1 Grupo de estudo**

O grupo amostral foi composto por 32 casos de pacientes com carcinoma mamário invasivo, em tratamento nos ambulatórios de mastologia e oncologia do Instituto Mário Penna (IMP). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Mário Penna, nº 2.481.975. Os casos foram divididos em dois braços que receberam a mesma análise. Um dos braços foi formado por 15 pacientes que pertencem aos estádios I e II. O outro braço formado por 17 pacientes pertencentes aos estádios III e IV.

### **2.2 Dados clínicos e anátomo-patológicos**

Os dados clínico-patológicos das pacientes recrutadas foram coletados de prontuários no sistema do Hospital Luxemburgo do IMP. Os blocos de parafina e as lâminas histológicas coradas em Hematoxilina & Eosina foram cedidas pelo Laboratório de Anatomia patológica do IMP. Todas as lâminas foram revisadas por um segundo patologista com experiência em patologia mamária e demais pesquisadores do estudo. Os casos selecionados foram analisados seguindo as recomendações diagnósticas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019). Os seguintes dados foram coletados: tamanho do tumor, tipo e grau histológico, comprometimento linfonodal, metástase, invasão perineural, invasão vascular e estadiamento patológico e clínico. A classificação molecular foi estabelecida, através da expressão imuno-histoquímica para os receptores de estrógeno, progesterona, HER-2 e Ki67 realizados em laboratório parceiro do IMP e classificados em luminal A-like, luminal B-like, basal-like, triplo negativo e HER2<sup>+</sup>.

### **2.3 Análise do infiltrado inflamatório tumoral**

Os cortes histológicos dos blocos de parafina contendo amostras dos CM corados em Hematoxilina & Eosina foram analisados semiquantitativamente, em

microscópio óptico sob aumento de 10X e 40X, considerando o infiltrado inflamatório intratumoral das amostras de core biopsy e infiltrado intratumoral das amostras oriundas de peças de cirurgia. Foram considerados infiltrado baixo (0 a 10%), infiltrado médio (>10 a 40%) e infiltrado alto (>40 a 90%). Essa análise foi realizada seguindo os critérios padronizados pelo *International TILs group* indicados no *guia de Avanços em Anatomia Patológica* (HENDRY et al., 2017).

## 2.4 Imuno-histoquímica

A investigação dos marcadores imunológicos foi realizada por imuno-histoquímica utilizando-se os seguintes anticorpos primários monoclonais/policlonais de coelho/camundongo anti-humano: anti-CD68, marcador de macrófagos; e marcadores de subpopulação de linfócitos T anti-CD8 e anti-CD4 e *imunocheckpoints* PD1, PD-L1 e PD-L2 padronizados previamente pelo nosso grupo (MARTINS et al., 2019). Blocos de parafina contendo as amostras dos CM foram submetidos a microtomia em cortes de 4µm de espessura. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados sob imersão em três banhos de xilol e, hidratados na sequência de álcoois a 100%, 90%, 80% e 70%. As lâminas foram submetidas à reativação antigênica em banho-maria, utilizando-se as soluções de tris-edta pH 8,0 para CD4, CD8 e PD1, e citrato pH 6,0 para CD68, PD-L1 e PD-L2, sob temperatura de 92°C por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de metanol e peróxido (2%) e seguido por lavagem em solução tampão de PBS (*Phosphate buffer solution*) pH 7,2 – 7,4. O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado por incubação das lâminas por 30 minutos em solução de albumina bovina a 2%. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de BSA 2% e incubados à 4°C (overnight). Posteriormente, foi adicionado o sistema de detecção Hides Detection HRP Polymer System (Cell Marque, Rocklin, CA, EUA) em duas sessões de 10 minutos cada, com lavagens em PBS nos intervalos. Após essa etapa, as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e contra-corados em hematoxilina por 50 segundos. Seguiu-se a desidratação realizada em banhos de álcool nas graduações 70%, 80%, 90%, 100% e diafanização em três banhos de xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas utilizando-se entelan e prosseguiram para análise em microscopia de luz.



## 2.5 Análise morfométrica

Para a análise de TILs CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, macrófagos CD68<sup>+</sup> e *imunocheckpoints* PD1, PD-L1 e PD-L2 nas amostras de CM, foram quantificados o número total de cada tipo celular nos cortes submetidos à imunohistoquímica. A contagem do número de células foi realizada em microscópio óptico (NIKON eclipse E200), com ampliação de 400x, em 10 campos aleatórios, nas regiões do estroma intratumoral (*International TILs group*, Hendry, 2019). Os dados foram representados graficamente pela média do número de células de 10 campos no estroma intratumoral para cada CM.

## 2.6 Análise estatística

As variáveis clínicas e patológicas foram testadas quanto ao tipo de tratamento, utilizando qui quadrado ( $X^2$ ) para teste de associação através do programa Jamovi, 2021 (Version 1.8) *Jamovi.org*. A análise de variância foi realizada utilizando-se o *Graphpad Prism* (*Graphpad Software Inc.*, San Diego, CA). Todos os dados foram testados para normalidade utilizando o *Komogorov-Smirnov test*. Os dados foram submetidos ao *Teste T* para aqueles com distribuição normal e para os dados que não apresentaram distribuição normal, foram realizados testes não paramétricos de *Mann-Whitney* e *Wilcoxon signed rank test* para análises pareadas. Os dados foram expressos graficamente como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 3.0 RESULTADOS

### 3.1 Análise clínico-patológica

Entre as pacientes em estádios I e II, 60% dos CM apresentaram grau histológico III e 73,3% apresentaram tumores variando entre 2 e 5 cm. Nas pacientes em estádios III e IV, 58,8% dos CM apresentaram grau histológico II e 55,5% dos tumores mediram de 2 a 5 cm. O tipo histológico Ductal SOE foi o mais prevalente entre os dois grupos de estádios, com 93,3% nos estádios I e II e 94,1% para o estádios III e IV, corroborando com o tipo que é mais prevalente. A identificação de carcinoma "*in situ*" associado foi mais frequente nos tumores das pacientes em estádios I e II (86,07%). A porcentagem de expressão do receptor de estrogênio foi

considerada alta na maioria das pacientes, em ambos os grupos de estadiamento, predominando nos estádios I e II. A maioria destas pacientes (93,3%), receberam hormonioterapia, já a porcentagem de alta expressão de receptores de progesterona predominou nos tumores das pacientes em estádios I e II. No entanto, nas pacientes em estádios III e IV, 47,1% dos tumores não apresentaram expressão de receptores de estrogênio, com uma associação significativa de  $p=0,004$ . A expressão de Ki67 foi acima de 10% em ambos os grupos, 88,2% nos estádios III e IV e 73,3% nos estádios I e II (Tabela 1).

Quanto aos dados clínicos representados na tabela 2, foi observado que a média de idade das pacientes nos estádios III e IV é inferior a 50 anos (58,8%), enquanto as pacientes nos estádios I e II tem média de idade > 50 anos a 68 anos (53,3%). Nos dois grupos de estádios foi observado que o histórico familiar de câncer está presente em 57,1% nos estádios I e II e 58,8% dos estádios III e IV. E com relação ao histórico de familiar de câncer de mama, a maioria das pacientes dos estádios III e IV, 60% não tem apresentam casos de câncer de mama entre seus familiares.

**TABELA 1: Teste de associação entre os grupos de estadiamento e variáveis histopatológicas.**

<i>Tabela 1 - Análise Histopatológica</i>			
	<i>Estadiamento</i>		
<i>Variáveis</i>	<i>I e II</i>	<i>III e IV</i>	<i>Valor de p</i>
<b><i>Tamanho do tumor (cm)</i></b>	<b><i>N(%)</i></b>	<b><i>N(%)</i></b>	
<i>Até 2 cm</i>	4(26,7)	0	
<i>2 a 5 cm</i>	11(73,3)	5(55,5)	
<i>&gt;5cm</i>	0(0)	4(44,5)	<b>0,009</b>
<b><i>Total</i></b>	<b>15</b>	<b>9</b>	
<b><i>Tipo histológico</i></b>			
<i>Ductal SOE</i>	14(93,3)	16(94,1)	
<i>Lobular</i>	1(6,7)	0(0)	<b>0,365</b>
<i>Medular</i>	0(0)	1(5,9)	
<b><i>Total</i></b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b><i>Grau Histopatológico</i></b>			

I	0(0)	1(5,8)	
II	6(40)	10(58,8)	0,289
III	9(60)	6(35,4)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Receptor estrogênio (%)</b>			
Negativo	0(0)	5(29,4)	
Baixo	0(0)	2(11,8)	
Médio	0(0)	3(17,6)	
Alto	15(100,0)	7(41,2)	<b>0,005</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Receptor progesterona (%)</b>			
Negativo	2(13,3)	8(47,1)	
Baixo(Até 30)	3(20,0)	0(0)	
Médio(40-70)	1(6,7)	6(35,3)	
Alto(>80)	9(60,0)	3(17,6)	<b>0,004</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>% de Her</b>			
0	10(66,7)	14(82,3)	
1+	1(6,7)	0(0)	
2+	2(13,3)	1(5,9)	
3+	2(13,3)	2(11,8)	0,597
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Ki67</b>			
Abaixo de 10%	4(26,7)	2(11,8)	
Acima de 10%	11(73,3)	15(88,2)	0,281
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Diagnóstico molecular</b>			
Luminal A	3(20,0)	2(11,8)	
Luminal B	9(60,0)	8(47,0)	
Triplo Negativo	0(0)	5(29,4)	

Her2+	3(20,0)	2(11,8)	0,148
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Carcinoma "in situ" associado</b>			
Ausente	2(13,3)	8(53,3)	<b>0,002</b>
Presente	13(86,7)	7(46,7)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

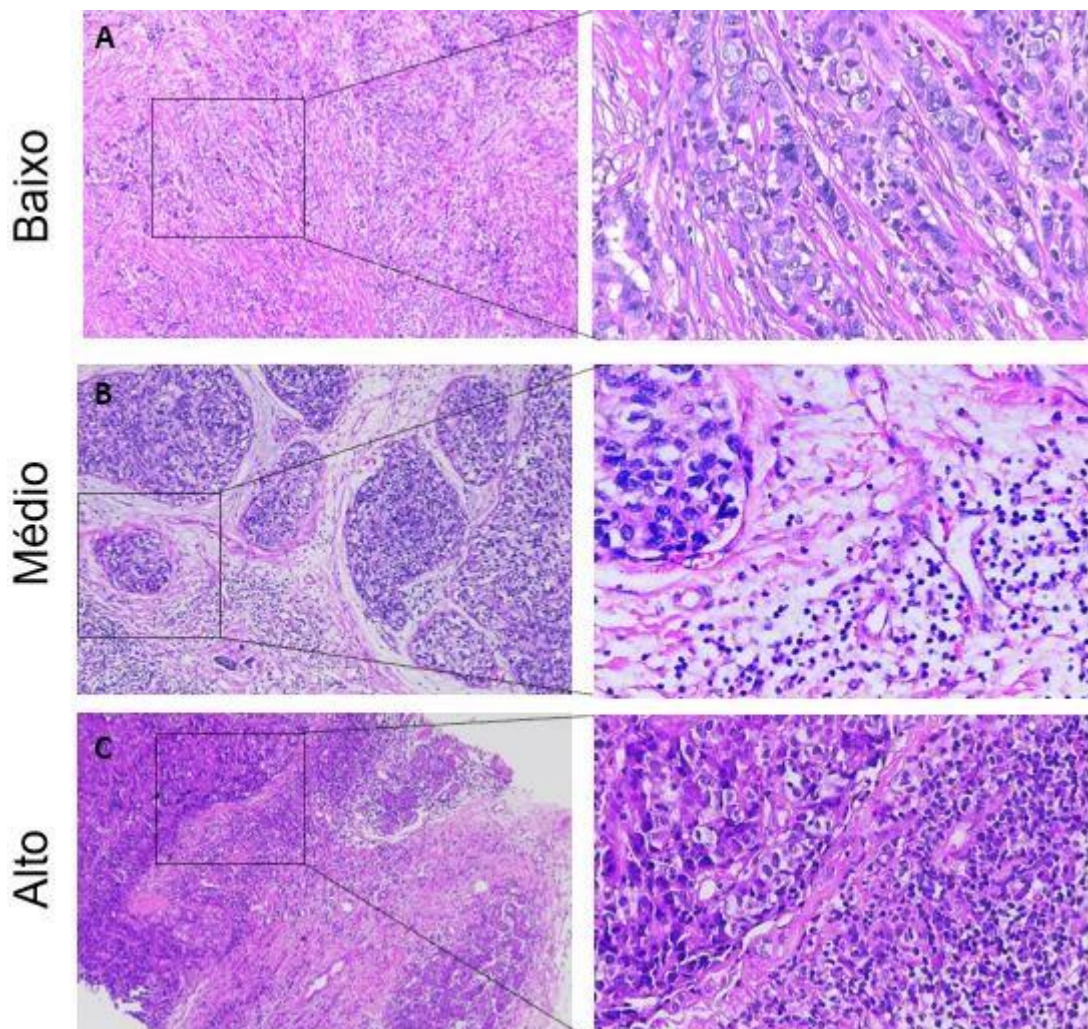
**TABELA 2: Teste de associação entre os grupos de estadiamento e variáveis clínicas.**

<b>Tabela 2 - Análise Clínica</b>			
	<b>Estadiamento</b>		
<b>Variáveis</b>	<b>I e II</b>	<b>III e IV</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Idade</b>	<b>N(%)</b>	<b>N(%)</b>	
Abaixo de 50 anos	5(33,3)	10(58,8)	
> de 50 a 68 anos	8(53,3)	5(29,4)	0,326
Acima de 68 anos	2(13,4)	2(11,8)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Histórico familiar de câncer</b>			
Ausente	6(42,9)	7(41,2)	
Presente	8(57,1)	10(58,8)	0,925
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	
<b>Histórico familiar de câncer de mama</b>			
Ausente	4(50,0)	6(60,0)	
Presente	4(50,0)	4(40,0)	0,671
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	
<b>Uso de tamoxifeno (hormonioterapia)</b>			
Não	1(6,7)	8(47,1)	
Sim	14(93,3)	9(52,9)	<b>0,005</b>

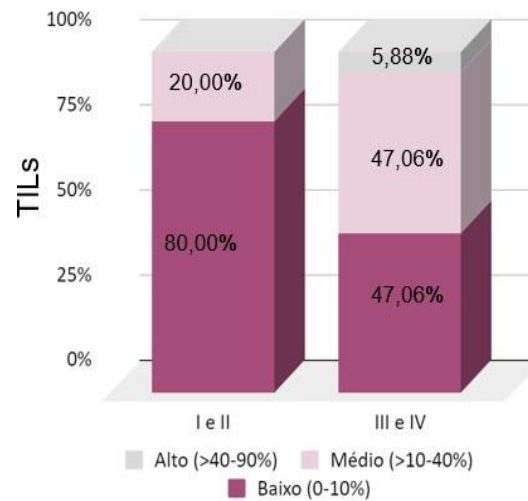
<i>Total</i>	15	17
--------------	----	----

### 3.2 Análise do infiltrado inflamatório tumoral

As análises morfométricas indicaram que as pacientes com estadios III e IV possuem maior quantidade de TILs. Dessas, 47,06% apresentam baixo número de TILs (0 a 10%) e somente 5,88% das pacientes apresentaram alto número de TILs (>40% a 90%). Enquanto que 80% das pacientes nos estadios I e II, apresentaram baixo número de TILs, e os 20% restantes apresentaram médio número de TILs (Fig.2).



**Figura 1. Fotomicrografias de secções coradas em Hematoxilina & Eosina, indicando a porcentagem de Linfócitos Infiltrantes Tumoraes (TILs) em lesões de câncer de mama. As imagens representam secções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama em aumentos de 10X e 40X. Em A, B e C foram demonstrados os números de TILs baixo, médio e alto, respectivamente.**



**Figura 2. Representação da análise morfométrica da porcentagem TILs.** Pacientes com estadios III e IV apresentaram maior número de TILs em relação as pacientes com estadios I e II.

### 3.3 Marcadores imunológicos no câncer de mama (CM)

O perfil das células imunológicas do microambiente tumoral apresentou grande quantidade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, bem como, macrófagos CD68<sup>+</sup> nos dois grupos de estadiamento, assim como as moléculas de *imunocheckpoints* PD1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup> e PD-L2<sup>+</sup>. Análises morfométricas revelaram maior número de linfócitos CD8<sup>+</sup> nas pacientes com estadios III e IV (55,9±44,3), comparado as pacientes do grupo com estadios I e II (26,3±17,4).

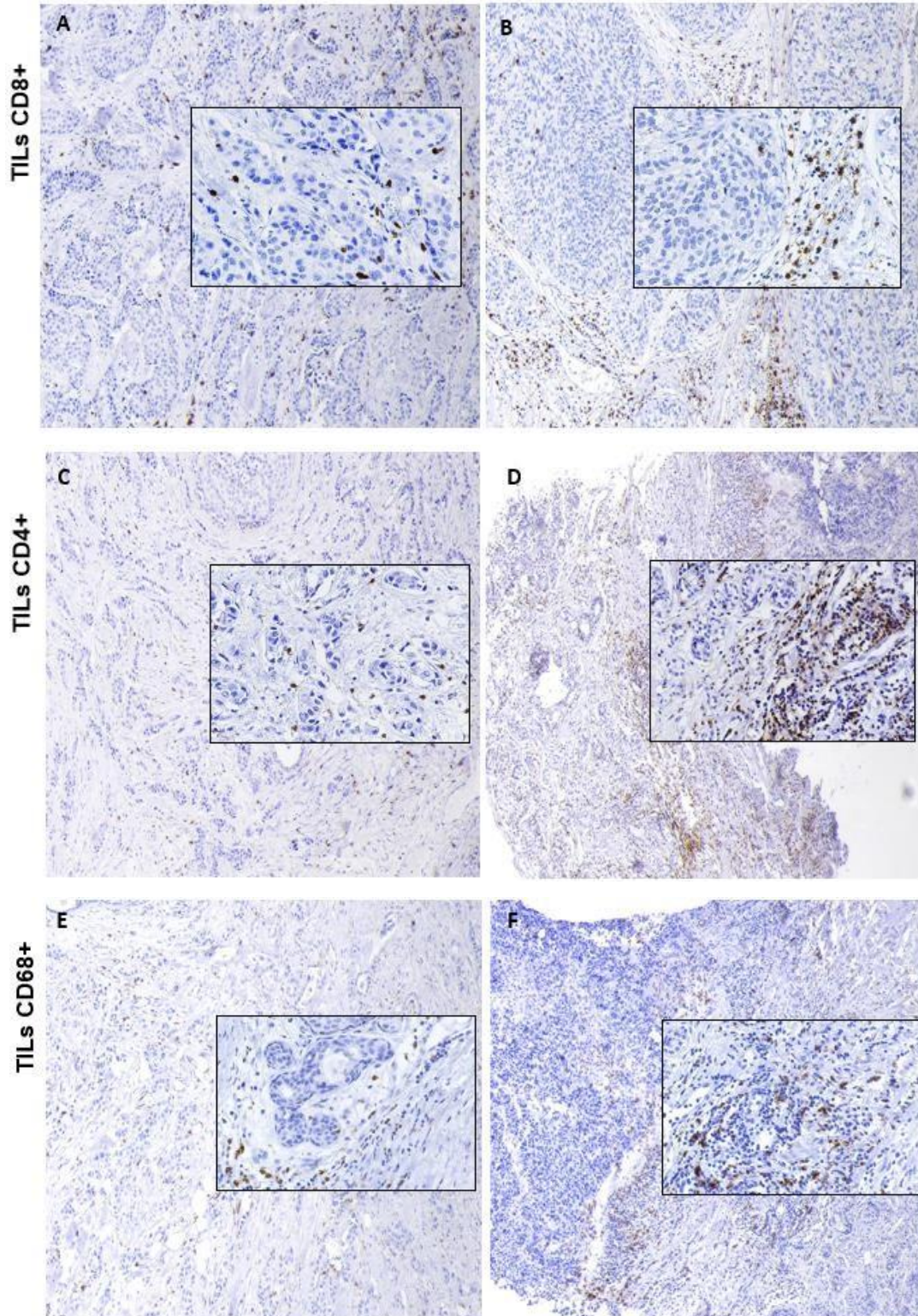
Um grande número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram observados distribuídos tanto na região estromal, como intratumoral dos tumores de mama. Foi observado aumento do número de TILs CD4<sup>+</sup> nas pacientes do grupo de estadios III e IV (43,3±31,2) vs grupo de estadios I e II (15,8±11,4).

Os macrófagos associados aos tumores (TAMs) são células importantes na apresentação de antígenos na resposta imune. Nesse trabalho, observamos ampla distribuição de TAMs nos tumores mamários. O número de TAMs CD68<sup>+</sup> foi maior entre as pacientes com estadios III e IV (28,8±14,7) vs estadios I e II (16,3±10,2).

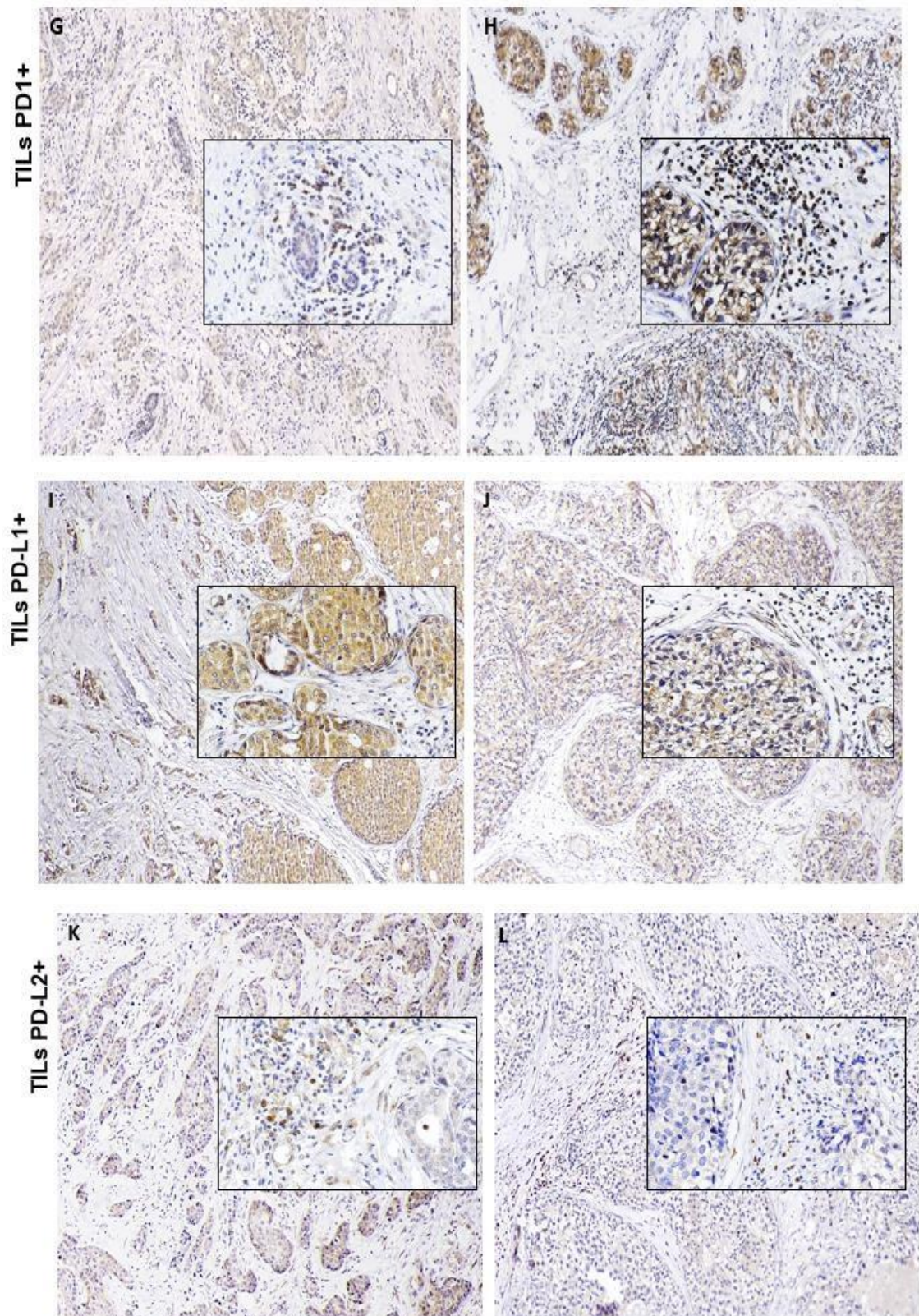
A superexpressão de moléculas inibidoras, os chamados *imunes checkpoints*, tais como PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 constitui um dos principais mecanismos de resistência imunológica a tumores nos tecidos periféricos. Em pacientes com estadios III e IV foi observado aumento significativo de TILs PD1 (15,1±5,4 p<0,0001) em relação as pacientes de estadios I e II (7,1±3,4).



Foi avaliado um score de expressão do marcador PD-L1 nas células tumorais das amostras de CM. Foi observado maior expressão de PD-L1 nos estadios III-IV (47,0%) do que nas pacientes nos estadios I- II (40,0%). As expressões baixa e média foram 17,7% e 35,3% para os estadios III- IV e 13,3% e 46,7% nos estadios I- II, respectivamente (Tab.3).







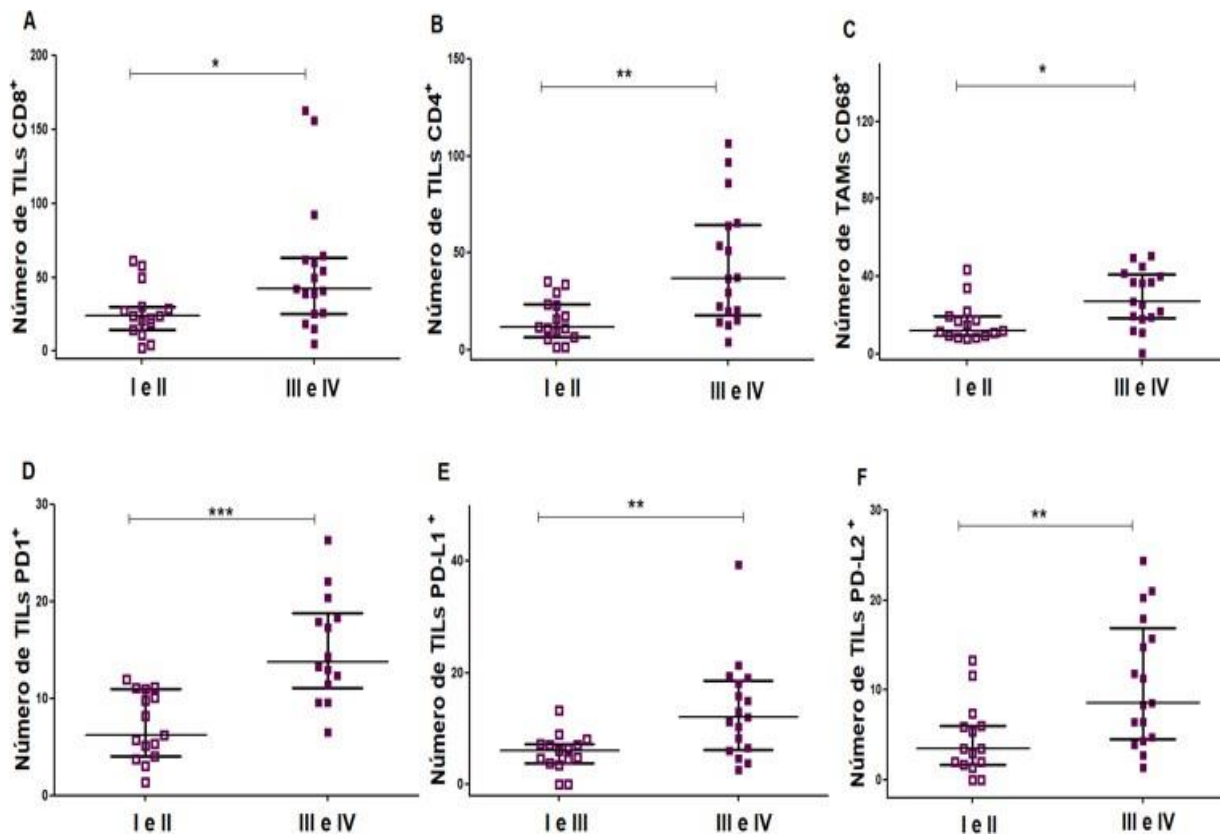
**Figura 3. Fotomicrografias de seções, indicando a marcação de TILs, através de imunohistoquímica em tumores mamários com estadios I-II e III e IV.** As imagens representam seções em tecidos de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas a imunohistoquímica na ampliação de 100X e 400X (recorte). A coloração marrom (+) indica expressão proteica de CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, PD1<sup>+</sup>, PD-L1<sup>+</sup>, PD-L2<sup>+</sup> em tumor mamário. Em A, C, E, G, I, K pacientes com estadios I e II. Em B, D, F, H, J, L pacientes com estadios III e IV.



TABELA 3: Expressão tumoral do *immune checkpoint* PD-L1.

EXPRESSÃO DE PD-L1				
	BAIXA	MÉDIA	ALTA	TOTAL(N)
<b>ESTADIO</b>				
<b>I, III</b>	13,30%	46,70%	40,00%	15
<b>ESTADIOS</b>				
<b>III, IV</b>	17,70%	35,30%	47,00%	17

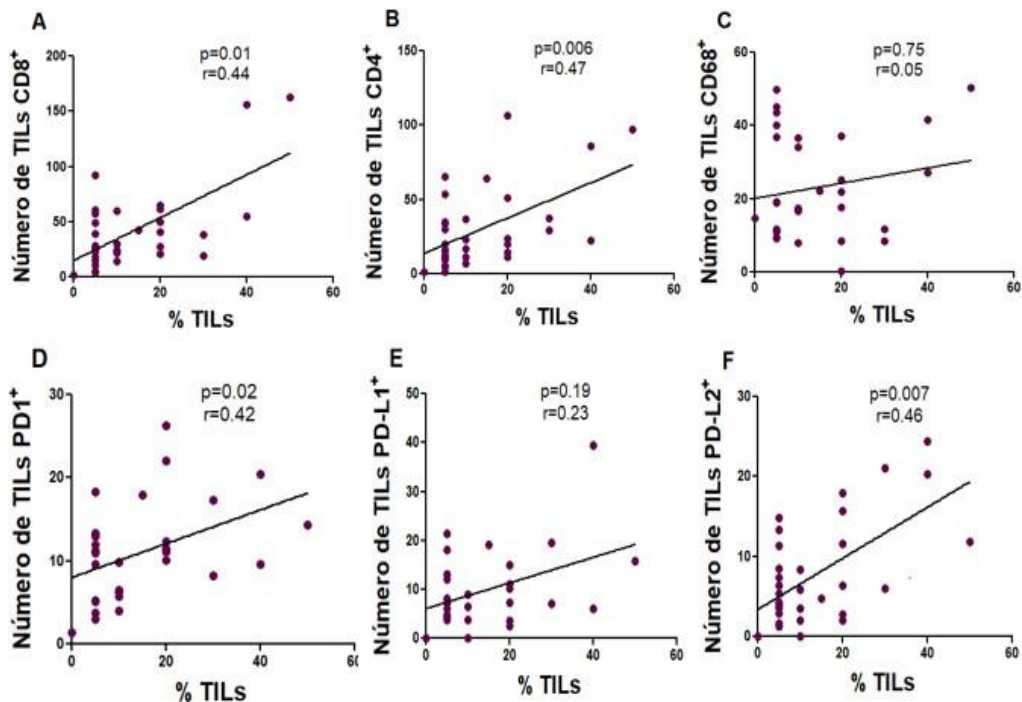
Os ligantes PD-L1 e PD-L2 também demonstraram maior expressão em TILs nos estadiamentos III e IV ( $13,3\pm 8,9$ ) e ( $10,8\pm 7,9$ ) com relação aos estadiamentos I e II ( $5,6\pm 3,3$ ) e ( $4,4\pm 3,9$ ) respectivamente (Fig.4).



**Figura 4. Caracterização de células imunológicas em tumores mamários com estadios I -II e III -IV.** Em A está representada a análise morfométrica de CD8<sup>+</sup> no tumor, em que pacientes com estadios mais avançados apresentaram maior número de TILs CD8<sup>+</sup> em relação aos menores estadios. (\*) representa p<0,05. Em B está representada a análise morfométrica de CD4<sup>+</sup> no tumor, em que pacientes com estadios mais avançados apresentaram maior número de TILs CD4<sup>+</sup> em relação aos menores estadios. (\*\*)

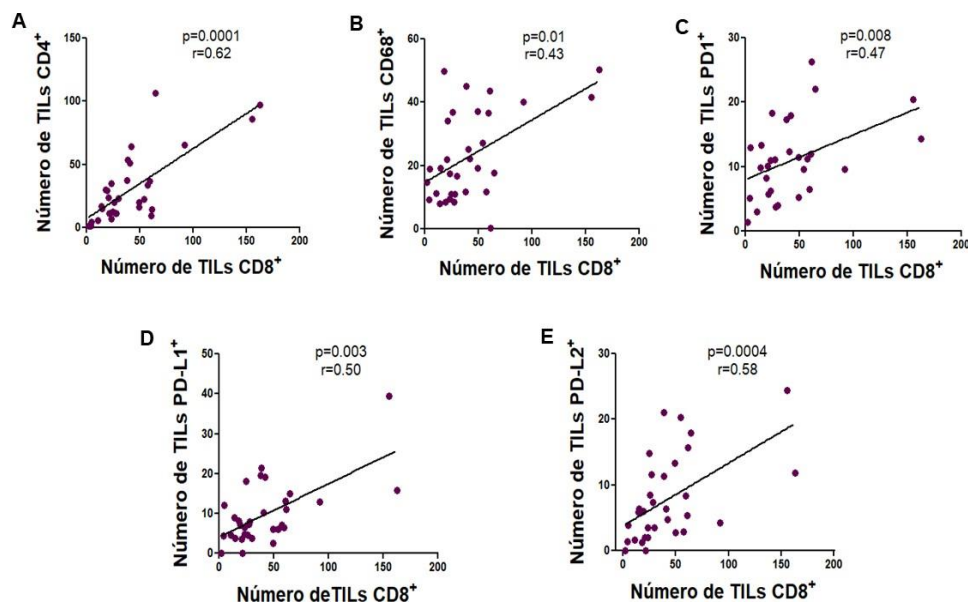
$p=0,0089$ . Em C está representada a análise morfométrica de  $CD68^+$  no tumor, em que pacientes com estadios mais avançados apresentaram maior número de TILs  $CD68^+$  em relação aos menores estadios. (\*) representa  $p<0,05$ . Em D está representada a análise morfométrica de  $PD1^+$  no tumor, em que pacientes com estadios mais avançados apresentaram maior número de TILs  $PD1^+$  em relação aos menores estadios. (\*\*) representa  $p<0,0001$ . Em E está representada a análise morfométrica de  $PD-L1^+$  no tumor, em que pacientes com estadios mais avançados apresentaram maior número de TILs  $PD-L1^+$  em relação aos menores estadios. (\*\*) representa  $p=0,003$ . Em F está representada a análise morfométrica de  $PD-L2^+$  no tumor, em que pacientes com estadios mais avançados apresentaram maior número de TILs  $PD-L2^+$  em relação aos menores estadios. (\*\*) representa  $p=0,004$ .

Foi avaliado também se a porcentagem total de TILs possui relação com os marcadores imunológicos estudados. Observamos uma correlação positiva entre % de TILs e os marcadores imunológicos CD8 ( $r=0,44$  e  $p=0,01$ ); CD4 ( $r=0,44$  e  $p=0,0062$ ); PD-1 ( $r=0,42$  e  $p=0,02$ ) e PD-L2 ( $r=0,46$  e  $p=0,007$ ), enquanto não foi observada correlação entre % de TILs e os marcadores imunológicos CD68 ( $r=0,05$  e  $p=0,75$ ) e PD-L1 ( $r=0,23$  e  $p=0,19$ ) (Fig.5).



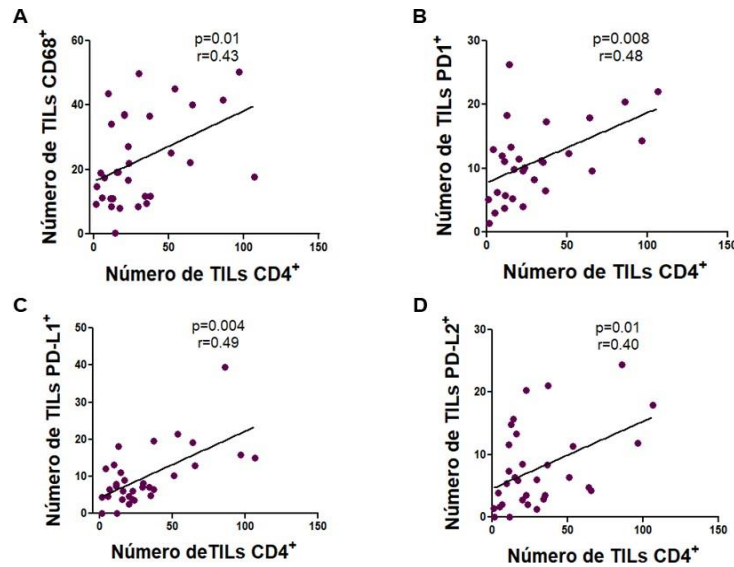
**Figura 5. Análise de correlação entre % TILs e marcadores imunológicos.** Análise de correlação entre % TILs e marcadores imunológicos. Em A, B, D e F observa-se correlação positiva entre %TILs e os marcadores imunológicos CD8, CD4, PD-1 e PD-L2. Em C e E não foi observado correlação significativa entre % TILs e os marcadores CD68, PD-L1. Foi utilizado teste estatístico *Spearman*, considerando o valor de  $p>0,05$ .

Para uma análise mais abrangente, foram avaliadas também as relações dos marcadores imunológicos e *imunocheckpoints* estudados, entre si. Quando se realizou a análise de relação entre o marcador imunológico TCD8 e os demais marcadores, foi observado que houve uma correlação positiva entre CD8 e os marcadores, PD-1 ( $r=0,47$  e  $p=0,008$ ), e correlação positiva moderada com CD4, PD-L1 e PD-L2 ( $r=0,62$  e  $p=0,0001$ ), ( $r=0,50$  e  $p=0,003$ ) e ( $r=0,58$  e  $p=0,0004$ ) respectivamente, porém, não se observou correlação entre CD8 vs. CD68 ( $r=0,43$  e  $p=0,41$ ), (Fig.6).



**Figura 6. Análise de correlação entre CD8 e demais marcadores imunológicos.** Análises de correlação entre CD8 e marcadores imunológicos. Em A, B, D e E, observa-se correlação positiva entre CD8 e os marcadores imunológicos, CD4, PD1, PD-L1 e PD-L2. Em C não foi observada correlação CD8 vs. CD68. Foi utilizado teste estatístico *Spearman*, considerando o valor de  $p>0,05$ .

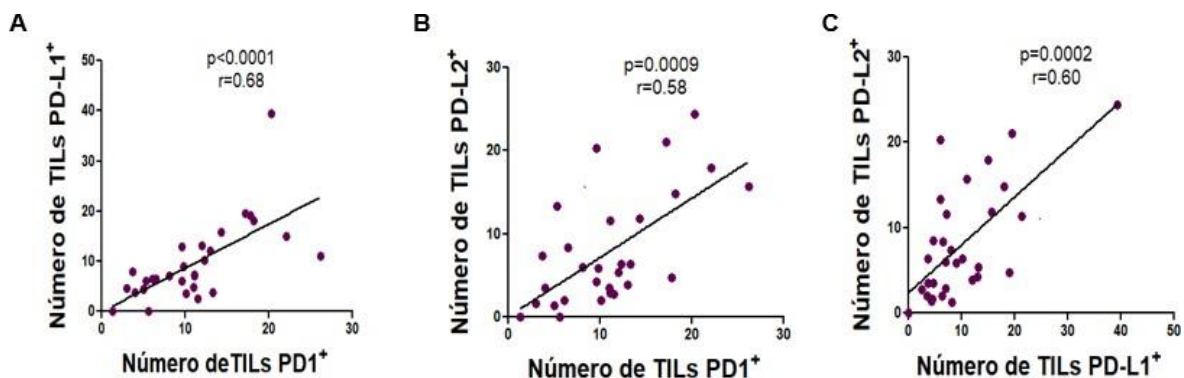
Para análise de relação do marcador imunológico CD4 e os marcadores CD68, PD-1, PD-L1 e PD-L2, foi observado que houve uma correlação moderada entre CD4 e os marcadores PD-1, PD-L1, com ( $r=0,48$  e  $p=0,008$ ), ( $r=0,49$  e  $p=0,004$ ) respectivamente, e PD-L2 ( $r=0,40$  e  $p=0,01$ ). Não foi observada correlação com o marcador CD68 ( $r=0,43$  e  $p=0,01$ , Fig.7).



**Figura 7. Análise de correlação entre CD4 e marcadores imunológicos.** Análise de correlação entre CD4 e marcadores imunológicos. Em B, C e D, observa-se correlação positiva entre CD4 e os marcadores imunológicos, PD=1, PD-L1 e PD-L2. Em A, não foi observada correlação entre os marcadores CD4 vs CD68. Foi utilizado teste estatístico *Spearman*, considerando o valor de  $p > 0,05$ .

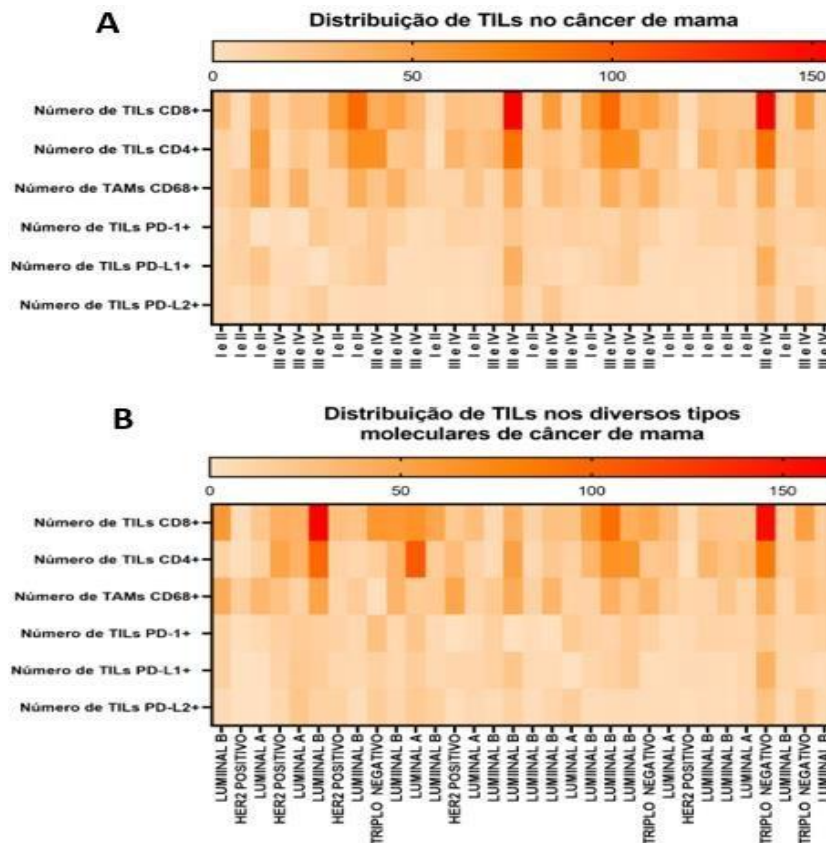
Na análise de correlação de CD68 com os marcadores PD-1, PD-L1 e PD-L2, não foi observada diferença significativa PD-1 ( $r=0,15$  e  $p=0,41$ ), PD-L1 ( $r=0,16$  e  $p=0,36$ ) e PD-L2, ( $r=0,01$  e  $p=0,92$ ). Gráficos não apresentados.

Na análise de relação do *imunocheckpoint* PD-1 com os marcadores PD-L1 e PD-L2, foi observado que houve uma correlação moderada entre PD-1 e os marcadores PD-L1 ( $r=0,68$  e  $p < 0,0001$ ) e PD-L2, ( $r=0,58$  e  $p=0,0009$ ). Na análise de correlação entre os ligantes PD-L1 e PD-L2 foi observada correlação moderada com ( $r=0,60$  e  $p=0,0002$ , Fig. 8).



**Figura 8. Análise de correlação entre o *imunocheckpoint* PD-1 e PD-L1 e demais marcadores imunológicos.** Análises de correlação entre PD-1 e marcadores imunológicos. Em A e B observa-se correlação positiva entre PD-1 e os marcadores PD-L1 e PD-L2. Em C. Análise de correlação entre PD-L1 e PD-L2. Foi observada correlação positiva entre os marcadores PD-L1 X PD-L2. Foi utilizado teste estatístico *Spearman*, considerando o valor de  $p > 0,05$ .

Ainda foram realizadas análises de relação entre % de TILs e marcadores imunológicos de pacientes com linfonodo comprometido, sendo então observado correlação entre %TILs e CD4 ( $r=0,57$  e  $p=0,02$ ). Também foi realizada a análise entre % de TILs e estadios. Nos estadios I e II, não se observou nenhuma correlação entre os marcadores. Diferente do que observamos nos estadiamentos III e IV, em que correlações positivas entre % de TILs e os marcadores imunológicos CD8, CD4, PD-1 e PD-L1, foi observada nos estadios mais elevados (III e IV). Gráficos não apresentados. Foram realizadas análises de distribuição de todos os marcadores TILs de acordo com os grupos de estadiamento, foi observado que as células mais expressas no microambiente tumoral, são CD8, CD4 e CD68, e que estas são mais expressas por pacientes dos estadios mais altos (III e IV). Na distribuição de TILs e



grupos moleculares pôde se observar que pacientes dos grupos triplo negativo e luminal B demonstram uma maior expressão de TILs (Fig.9)

**Figura 9. Distribuição de TILs nos grupos de estadiamento e nos grupos moleculares de câncer de mama.** No heatmap A está representada a distribuição de TILs nos grupos de estadios I e II, III e IV. No heatmap B está representada a distribuição de TILs nos grupos

moleculares. Cores mais escuras demonstram maior expressão do marcador, enquanto as cores mais claras demonstram menor expressão de cada marcador.

#### 4.0 DISCUSSÃO

Nesse trabalho investigamos a expressão de TILs, TAMs e marcadores imunológicos de supressão da resposta anti-tumoral, denominados como *immuno checkpoints*. Os dados apresentados aqui evidenciaram maior inflamação nas pacientes com estadios mais avançados, permitindo traçar uma associação entre marcadores imunológicos e as variáveis clínicas.

Na análise entre grupos de estadios e variáveis clinico-histopatológicas foi visto associação entre os estadios e tamanho do tumor, receptor de estrogênio, progesterona e associação de carcinoma *in situ*. Outros estudos observaram que uma maior densidade de TILs está associada a tumores maiores, grau histológico e índice de Ki67, e não foi visto associação com idade, assim como pudemos ver em nossa análise (HWANG et al., 2019; PUJANI et al., 2020).

Neste estudo, pacientes nos estadios III e IV (com a exceção de uma paciente), apresentaram maior inflamação. Outros trabalhos também demonstraram que o aumento no número de TILs possui forte relação preditiva com a resposta patológica completa (RPC) em pacientes dos subgrupos HER2<sup>+</sup> e triplo negativo (mais estudados), e menos nos luminais A e B (JEONG et al., 2019). Em outro estudo, o número de TILs foi menor nas pacientes com resposta parcial. Assim o status de TILs em tumores primários pôde prever a RPC a quimioterapia neoadjuvante no CM HER2<sup>+</sup> (KUROZUMI et al., 2017).

Entretanto, a investigação de TILs em CM tipo luminal, revelou que os maiores níveis de TILs possuem associação desfavorável com os parâmetros clínicos-patológicos (CRISCITIELLO et al., 2020). Apesar das altas taxas de TILs serem correlacionadas ao aumento da RPC nos CM luminal. A análise de sobrevivência demonstrou uma associação entre TILs mais altos e menor sobrevida no subtipo Luminal B-like (DENKERT et al., 2018), evidenciando uma divergência nos dados obtidos no CM do tipo Luminal. Os resultados demonstram uma necessidade de mais estudos sobre a infiltração linfocitária nesse subgrupo (DIECI et al., 2016). Além disso, os tipos moleculares de CM possuem comportamentos e respostas distintas a doença e ao tratamento, o que demonstra o quão heterogeneo é esse tipo de carcinoma.

Nesse estudo, as pacientes que pertenciam aos estadios III e IV, apresentaram maior infiltração celular TILs CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e TAMs CD68. Dados de ensaios clínicos apontam para o papel de TILs CD8<sup>+</sup> na eficácia terapêutica do tratamento de tumores (ANICHINI et. al, 1996). Outros estudos apresentaram que os linfócitos CD4<sup>+</sup> são o subtipo mais prevalente no estroma tumoral, enquanto os linfócitos CD8<sup>+</sup> são os mais prevalentes nos ninhos tumorais (VERMA et al., 2020). (DENARDO et al., 2011) Foi observado que a alta densidade de células T CD4 e baixa densidade de células T CD8 se correlaciona com redução da sobrevida global, enquanto que a densidade celular de CD68 não demonstrou associação. Além disso, uma associação inversa entre CD68 e CD8 foi observada (DENARDO et al., 2011), corroborando com os nossos dados.

Através da caracterização dos *immune checkpoints* foi observado o aumento do número de TILs expressando PD-1, PD-L1 e PD-L2 nas pacientes com CM dos estadios III e IV. A expressão de PD-1 em TILs foi associada com o tamanho do tumor, grau histológico e acometimento linfonodal e pior sobrevida global nos subtipos luminal B (HER2<sup>+</sup> e HER2<sup>-</sup>) e triplo-negativo (MUENST et al., 2013). A análise do score da expressão de PD-L1 em células tumorais mostrou que todas as amostras apresentaram algum grau de expressão de 1 a 3. A literatura apresenta que essa expressão se dá de acordo com estadio e subtipo molecular do CM, sendo que os subtipos negativos e HER2<sup>+</sup> são os que apresentam maior expressão. No presente trabalho, não foi possível uma análise dos marcadores de acordo com os subtipos moleculares e existe uma falta de trabalhos que demonstrem dados concisos a respeito da expressão de PD-L1 em tumores iniciais vs. avançados.

O significado clínico-patológico e prognóstico da expressão de PD-L1 no CM tem sido avaliado em outros trabalhos (KIM; LEE; KOO, 2017). O maior grau histopatológico e metástase linfonodal estão associados com maior expressão de PD-L1 tanto no tumor, quanto em células imunológicas. A maior expressão de PD-L1 também está associada ao maior tamanho do tumor, receptores hormonais negativos e HER2<sup>-</sup>. A relação entre pior prognóstico e maior expressão de PD-L1, é justificada pelo fenômeno de “escape imunológico”, em que as células tumorais são capazes de se tornarem “invisíveis”, expressando antígenos que não são identificados pelo sistema imune. Sendo assim, sugere-se que a presença de TILs é um fator prognóstico favorável no CM e que os TILs atuam em consonância com a quimioterapia e terapia com inibidores de *immuno checkpoints* para uma melhor resposta dessas pacientes.



O uso dos níveis de TILs em CM se torna importante, uma vez que estes auxiliam na descoberta de tumores mais susceptíveis à imunomodulação, o que pode indicar estratégias adicionais para o tratamento (KUZNAR et al. 2017).

Neste estudo, foi observada a presença de maior infiltrado inflamatório nas pacientes dos estadios III e IV e correlação entre linfócitos T (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>) e os marcadores de *imuno checkpoints*, demonstrando que essas pacientes poderiam possivelmente se beneficiar de tratamentos com inibidores de PD-1 ou PD-L1. Além disso, macrófagos e linfócitos T regulatórios representam provavelmente mecanismos contra-regulatórios importantes que o tumor recruta no intuito de permitir um escape da resposta imune adaptativa (PLESCA et al., 2020). O entendimento mais apurado de como atuam as células imunológicas no desenvolvimento do tumor, especialmente em uma doença com uma diversidade de grupos moleculares e tipos histológicos como o CM ainda se faz necessário.

## 5.0 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi observado que os níveis mais altos de TILs possuem associação com características clinico-patológicas de tumores mais avançados e portanto mais agressivos. Os TILs têm se mostrado importantes como fator prognóstico nos CM dos subtipos triplo negativo e HER2<sup>+</sup>. Devido a sua importância, mais estudos sobre os diferentes papéis das subclasses de TILs, nos diversos subtipos moleculares de CM se fazem necessários, podendo auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos, trazendo melhores evidências que possam ser utilizadas na imunoterapia. Além disso, os subgrupos luminais são menos estudados e seus valores preditivos e prognósticos ainda permanecem controversos. Mais estudos podem tornar a caracterização de TILs, uma boa ferramenta de auxílio na prática clínica.



## REFERÊNCIAS

ANICHINI, A et al. "Cytotoxic T cells directed to tumor antigens not expressed on normal melanocytes dominate HLA-A2.1-restricted immune repertoire to melanoma." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* v. 156, n.1, 1 janeiro 1996.

AGGARWAL, C. et al. Prevalence of PD-L1 expression in patients with non-small cell lung cancer screened for enrollment in KEYNOTE-001, -010, and -024. *Annals of Oncology*, v. 27, p. vi363, out. 2016.

AHN, S. et al. Changes and prognostic values of tumor-infiltrating lymphocyte subsets after primary systemic therapy in breast cancer. *PLoS ONE*, v. 15, n. 5, 1 maio 2020.

CRISCITIELLO, C. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer.

*Breast Cancer Research and Treatment*, v. 183, n. 2, p. 347–354, 1 set. 2020.

DENARDO, D. G. et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery*, v. 1, n. 1, p. 54–67, 2011.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity *Cancer and Metastasis Reviews*, jun. 2010.

DENKERT, C. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology*, v. 19, n. 1, p. 40–50, 1 jan. 2018.

DIECI, M. V. et al. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? *Cancer Treatment Reviews* W.B. Saunders Ltd, , 1 maio 2016.

FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: An update

*Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 55, n. 3, p. 327–332, 2019.

FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome *Nature Reviews Cancer*, abr. 2012.

GODOY-ORTIZ, A. et al. Deciphering her2 breast cancer disease: Biological and clinical implications. *Frontiers in Oncology*, v. 9, n. OCT, 2019.

HALIM, F. et al. Programmed death ligand-1 protein expression difference in basal like and non- basal like triple negative breast cancer and its association with disease free survival and overall survival: A systematic review *Oncology Reviews* Page Press Publications, , 21 set. 2021.

HENDRY, S. et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma in Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research *Advances in Anatomic Pathology* Lippincott Williams and Wilkins, , 2017.

HWANG, H. W. et al. A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients *Breast Cancer Research and Treatment* Springer New York LLC, , 30 jan. 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019a.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019b.

IWAI, Y. et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. [s.l: s.n.]. Disponível em: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192461099](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192461099).

JEONG, H. et al. Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer. *Journal of Breast Cancer*, v. 22, n. 1, p. 38–51, 1 mar. 2019.

KIM, H. M.; KOO, J. S. Clinicopathologic characteristics of breast cancer according to the infiltrating immune cell subtypes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 12, p. 1–14, 1 jun. 2020.

KIM, H. M.; LEE, J.; KOO, J. S. Clinicopathological and prognostic significance of programmed death ligand-1 expression in breast cancer: A meta-analysis. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, 17 out. 2017.

KUROZUMI, S. et al. Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer *Medical Molecular Morphology* Springer Tokyo, , 1 dez. 2017.

MARTINS, P. R. et al. Cervical cancer patients that respond to chemoradiation therapy display an intense tumor infiltrating immune profile before treatment. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 111, 1 dez. 2019.

MUENST, S. et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 139, n. 3, p. 667–676, jun. 2013.

PLESCA, I. et al. Characteristics of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Prior to and During Immune Checkpoint Inhibitor Therapy *Frontiers in Immunology* *Frontiers Media S.A.*, , 4 mar. 2020.

PUJANI, M. et al. Evaluation of Tumor infiltrating lymphocytes in breast carcinoma and their correlation with molecular subtypes, tumor grade and stage. *Breast disease*, v. 39, n. 2, p. 61–69, 2020.

RETECKI, K. et al. The immune landscape of breast cancer: Strategies for overcoming immunotherapy resistance *Cancers* *MDPI*, , 1 dez. 2021.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

The jamovi project (2021). *jamovi*. (Version 1.8) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>. R Core Team (2021). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0)

TILs group – International Immuno-Oncology Working Group (TILs Group) – 2021.

VERMA, R. et al. Levels of different subtypes of tumour-infiltrating lymphocytes correlate with each other, with matched circulating lymphocytes, and with survival in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 183, n. 1, p. 49–59, 1 ago. 2020.

WHO, World Health Organization. Constitution of the World Health Organization (WHO/WHO) –2019.

## **Clinico-histopathological and immunological profile of invasive breast carcinoma at different stages**

Adriana Jacauna<sup>1</sup>, Sofia Godinho<sup>1</sup>, Leticia Braga<sup>1</sup>, Paulo Salles<sup>1</sup>, Patrícia Rocha Martins<sup>2</sup> e Cristiana Buzzelin<sup>3</sup>

1- Núcleo de Ensino e Pesquisa – Instituto Mário Penna

2- Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais

3 - Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais

### **Summary**

Breast cancer (BC) remains the most frequent type of neoplasm among women. In Brazil, approximately 43.74 new cases per 100,000 individuals were estimated in 2022. Strategies that provide greater screening and response predictive factors will certainly increase the survival of these patients. In this context, the characterization of the different cell types in the tumor microenvironment is crucial for the identification of potential predictive targets of treatment response. This study aims to characterize the clinical, anatomopathological and immunological profile of invasive carcinomas in patients with BC, in different stages. Here, we investigated CD8+ and CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), CD68+ tumor-associated macrophages (TAMs) that participate in the control of the immune response and are related to the survival of patients with BC. We also performed the characterization of the PD-1+, PD-L1+ and PD-L2+ immune checkpoints molecules involved in the suppression of the antitumor response. Sections of samples from thirty-two patients with BC were submitted to immunohistochemistry for the markers CD8+, CD4+ and CD68+, PD1+, PD-L1+ and PD-L2+, then the expression of these cells in the intratumoral region was evaluated. In the analysis between groups of stages and clinico-histopathological variables, an association between stages and tumor size, estrogen and progesterone receptor and carcinoma in situ was observed. The results showed that patients with stages III and IV have a higher amount of TILs and TAMs in the samples before treatment. The correlation between T lymphocytes (CD8+ and CD4+) and immuncheckpoint markers was also observed. Significant associations between TILs and some clinical and pathological factors make their evaluation a tool for future use in clinical practice.

**Keywords:** TILs, breast cancer, tumor immunology, immune checkpoints, stages.

## 1.0 INTRODUCTION

Malignant neoplasms are a major public health problem in Brazil and worldwide. Breast cancer (BC) is the most frequent type of cancer among women, with 2.3 million new cases in 2020 and 685,000 deaths, being among the fifth leading cause of death from the disease worldwide (SUNG et al., 2021). In Brazil, 66,280 new cases of BC were estimated in 2021, with approximately 62 new cases per 100,000 individuals (INCA 2021). Being a highly complex and heterogeneous disease, tumor behavior, recurrence potential and overall survival can be partially estimated through clinicopathological characteristics, such as tumor size, histological grade and lymph node involvement. Such characteristics determine tumor staging (TNM) according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019). After the clinical diagnosis, a histopathological evaluation of the primary tumor is necessary, through immunohistochemistry, the determination of the molecular profile of the CM is carried out, which will be classified as luminal A, B, basal like, Her2+ or triple negative (GODOY-ORTIZ et al., 2019).

In addition to the classification of the molecular profile, the degree of immune response can also reflect the better prognosis of patients (KUROZUMI et al., 2017). The higher number of immune cells correlates with a favorable clinical outcome in various neoplasms, such as melanoma, colorectal, lung and breast cancer (FRIDMAN et al., 2012). It is essential to identify the functional status and the different phenotypes of immune cells in the tumor microenvironment, since these cells can act as anti- or pro-tumor factors. Cytotoxic T cells, helper T cells, natural killer (NK) cells and dendritic cells (DC) contribute to the antitumor response, while FOXP3 regulatory T cells (Treg) and myeloid cell-derived suppressor cells (MDSC) have a pro-inflammatory effect. -tumor that promotes the growth and invasion of cancer, producing factors that support angiogenesis and promote the proliferation of cancer cells and metastases (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010).

In CM, increasingly recent studies confirm the predictive and prognostic roles of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). HER-2 positive and triple negative tumors stand out among the other molecular types, with abundant lymphocytic infiltrates (KIM; KOO, 2020). TILs are mainly composed of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. The greater number of CD8+ TILs, cytotoxic-type effector cells that control tumor growth, correlates with better response to treatment and longer survival. CD4+ lymphocytes,

on the other hand, divide into subpopulations, with pro- or antitumor activities, and do not have a well-established relationship with survival (AHN et al., 2020). Tumor-associated macrophages (TAMs) are another well-studied cell group today. TAMs can be classified into M1 and M2 subtypes (RETECKI et al., 2021). In the M1 type, they are activated through interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and express high levels of pro-inflammatory cytokines, thus acquiring the ability to inhibit pathogens and induce antitumor responses. While those that differentiate into M2 regulate the expression of MHC class II, in addition to inducing the expression of anti-inflammatory cytokines (FIGUEIREDO, 2019).

Immune checkpoints have a regulatory effect on the immune response (IWAJ et al., 2002). PD-1 (programmed-death 1) is considered a costimulatory molecule that helps keep the body's immune responses in check. Immune cells that express PD-1 have as main ligands the proteins PD-L1 and PD-L2, which are molecules expressed on the surface of tumor cells and tumor-infiltrating immune cells under the induction of several cytokines, the most common being interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). During the interaction with PD-1, PD-L1, through several signaling pathways, promotes a decrease in the expression of cell surface markers that culminate in the suppression of cytotoxic T lymphocytes that are responsible for fighting tumor development (HALIM et al. , 2021).

In this scenario, prospective studies are needed to investigate the TILs phenotypes and their location in the tumor microenvironment in the different molecular and histological types of BC, contributing to the improvement of future therapeutic approaches for patients. Here, we characterized CD8+ and CD4+ TILs, CD68+ TAMs and the PD-1+, PD-L1+ and PD-L2+ immune checkpoints in CM at different staging.

## **2.0 METHODOLOGY**

### **2.1 Study group**

The sample group consisted of 32 cases of patients with invasive breast carcinoma undergoing treatment at the mastology and oncology outpatient clinics of the Instituto Mário Penna (IMP). This project was approved by the Research Ethics Committee of Instituto Mário Penna, n° 2,481,975. The cases were divided into two arms that received the same analysis. One of the arms was formed by 15 patients

belonging to stages I and II. The other arm consisted of 17 patients belonging to stages III and IV.

## **2.2 Clinical and anatomopathological data**

The clinicopathological data of the recruited patients were collected from medical records in the Hospital Luxemburgo system of the IMP. The paraffin blocks and histological slides stained with Hematoxylin & Eosin were provided by the Pathological Anatomy Laboratory of the IMP. All slides were reviewed by a second pathologist with experience in breast pathology and other investigators in the study. The selected cases were analyzed following the diagnostic recommendations of the World Health Organization (WHO, 2019). The following data were collected: tumor size, histological type and grade, lymph node involvement, metastasis, perineural invasion, vascular invasion, and pathological and clinical staging. The molecular classification was established through immunohistochemical expression for estrogen, progesterone, HER-2 and Ki67 receptors performed in a partner laboratory of the IMP and classified as luminal A-like, luminal B-like, basal-like, triple negative. and HER2+.

## **2.3 Analysis of the tumor inflammatory infiltrate**

The histological sections of the paraffin blocks containing samples of MC stained with Hematoxylin & Eosin were analyzed semiquantitatively, under an optical microscope under 10X and 40X magnification, considering the intratumoral inflammatory infiltrate of core biopsy samples and intratumoral infiltrate of samples from surgical specimens. Low infiltrate (0 to 10%), medium infiltrate (>10 to 40%) and high infiltrate (>40 to 90%) were considered. This analysis was performed following the criteria standardized by the International TILs group indicated in the Advances in Pathological Anatomy guide (HENDRY et al., 2017). The histological sections of the paraffin blocks containing samples of MC stained with Hematoxylin & Eosin were analyzed semiquantitatively, under an optical microscope under 10X and 40X magnification, considering the intratumoral inflammatory infiltrate of core biopsy samples and intratumoral infiltrate of samples from surgical specimens. Low infiltrate (0 to 10%), medium infiltrate (>10 to 40%) and high infiltrate (>40 to 90%) were

considered. This analysis was performed following the criteria standardized by the International TILs group indicated in the Advances in Pathological Anatomy guide (HENDRY et al., 2017).

## **2.4 Immunohistochemistry**

Investigation of immunological markers was performed by immunohistochemistry using the following primary monoclonal/polyclonal rabbit/mouse anti-human antibodies: anti-CD68, macrophage marker; and anti-CD8 and anti-CD4 T lymphocyte subpopulation markers and PD1, PD-L1 and PD-L2 immunocheckpoints previously standardized by our group (MARTINS et al., 2019). Paraffin blocks containing the CM samples were submitted to microtomy in 4µm-thick sections. Subsequently, the sections were deparaffinized under immersion in three xylene baths and hydrated in the sequence of 100%, 90%, 80% and 70% alcohols. The slides were submitted to antigenic reactivation in a water bath, using solutions of tris-edta pH 8.0 for CD4, CD8 and PD1, and citrate pH 6.0 for CD68, PD-L1 and PD-L2, under temperature of 92°C for 30 minutes. Blocking of endogenous peroxidase was performed in methanol and peroxide solution (2%) and followed by washing in PBS buffer solution (Phosphate buffer solution) pH 7.2 – 7.4. Blocking of nonspecific binding was performed by incubating the slides for 30 minutes in a 2% bovine albumin solution. Primary antibodies were diluted in 2% BSA solution and incubated at 4°C (overnight). Later, the detection system Hides Detection HRP Polymer System (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) was added in two sessions of 10 minutes each, with washes in PBS at intervals. After this step, the reactions were revealed with diaminobenzidine (DAB) and counterstained in hematoxylin for 50 seconds. This was followed by dehydration carried out in alcohol baths at 70%, 80%, 90%, 100% and diaphanization in three xylene baths. The slides were mounted with coverslips using entelan and proceeded for analysis under light microscopy.

## **2.5 Morphometric analysis**

For the analysis of CD8+, CD4+ TILs, CD68+ macrophages and PD1, PD-L1 and PD-L2 immunocheckpoints in the MC samples, the total number of each cell type



in the sections submitted to immunohistochemistry was quantified. Counting the number of cells was performed under an optical microscope (NIKON eclips E200), with 400x magnification, in 10 random fields, in the intratumoral stromal regions (International TILs group, Hendry, 2019). Data were plotted as the average number of cells from 10 fields in the intratumoral stroma for each CM.

## **2.6 Statistical analysis**

Clinical and pathological variables were tested for the type of treatment, using chi square ( $X^2$ ) for association testing through the program Jamovi, 2021 (Version 1.8) Jamovi.org. Analysis of variance was performed using Graphpad Prism (Graphpad Software Inc., San Diego, CA). All data were tested for normality using the Komogorov-Smirnov test. Data were subjected to the T test for those with normal distribution and for data that did not show normal distribution, nonparametric Mann-Whitney and Wilcoxon signed rank test were performed for paired analyses. Data were expressed graphically as mean  $\pm$  standard deviation. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## **3.0 RESULTS**

### **3.1 Clinical-pathological analysis**

Among the patients in stages I and II, 60% of the BC had histological grade III and 73.3% had tumors ranging from 2 to 5 cm. In patients in stages III and IV, 58.8% of the BC had histological grade II and 55.5% of the tumors measured from 2 to 5 cm. The Ductal SOE histological type was the most prevalent among the two groups of stages, with 93.3% in stages I and II and 94.1% for stages III and IV, corroborating the type that is more prevalent. The identification of associated "in situ" carcinoma was more frequent in the tumors of patients in stages I and II (86.07%). The percentage of estrogen receptor expression was considered high in most patients, in both staging groups, predominantly in stages I and II. Most of these patients (93.3%) received hormone therapy, whereas the percentage of high expression of progesterone receptors predominated in the tumors of patients in stages I and II. However, in stage III and IV patients, 47.1% of the tumors did not show estrogen receptor expression, with a significant association of  $p=0.004$ . Ki67 expression was above 10% in both

groups, 88.2% in stages III and IV and 73.3% in stages I and II (Table 1). As for the clinical data represented in Table 2, it was observed that the mean age of patients in stages III and IV is less than 50 years old (58.8%), while patients in stages I and II have a mean age of > 50 years to 68 years (53.3%). In both groups of stages, it was observed that a family history of cancer is present in 57.1% in stages I and II and 58.8% in stages III and IV. And with regard to family history of breast cancer, most patients in stages III and IV, 60% have no cases of breast cancer among their family members.

**TABLE 1: Test of association between staging groups and histopathological variables.**

Table 1 - Histopathological Analysis			
Variables	Staging		P value
	I e II	III e IV	
<b>Tumor size (cm)</b>	<b>N(%)</b>	<b>N(%)</b>	
up to 2 cm	4(26,7)	0	
2 to 5 cm	11(73,3)	5(55,5)	
>5cm	0(0)	4(44,5)	<b>0,009</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	
<b>Histological type</b>			
Ductal SOE	14(93,3)	16(94,1)	
Lobular	1(6,7)	0(0)	0,365
Medullary	0(0)	1(5,9)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Histopathological Grade</b>			
I	0(0)	1(5,8)	
II	6(40)	10(58,8)	0,289
III	9(60)	6(35,4)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Estrogen receptor (%)</b>			
Negative	0(0)	5(29,4)	
Low(up to 30)	0(0)	2(11,8)	
Mediumo(40-70)	0(0)	3(17,6)	
Higho(>80)	15(100,0)	7(41,2)	<b>0,005</b>

<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Progesterone receptor (%)</b>			
Negative	2(13,3)	8(47,1)	
Low(up to 30)	3(20,0)	0(0)	
Medium(40-70)	1(6,7)	6(35,3)	
High(>80)	9(60,0)	3(17,6)	<b>0,004</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>HER2%</b>	10(66,7)	14(82,3)	
1+	1(6,7)	0(0)	
2+	2(13,3)	1(5,9)	
3+	2(13,3)	2(11,8)	0,597
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Ki67</b>			
Below 10%	4(26,7)	2(11,8)	
Above 10%	11(73,3)	15(88,2)	0,281
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Molecular diagnosis</b>			
Luminal A	3(20,0)	2(11,8)	
Luminal B	9(60,0)	8(47,0)	
Triple Negative	0(0)	5(29,4)	
Her2+	3(20,0)	2(11,8)	0,148
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Associated "in situ"carcinoma</b>			
Absent	2(13,3)	8(53,3)	<b>0,002</b>
Present	13(86,7)	7(46,7)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	

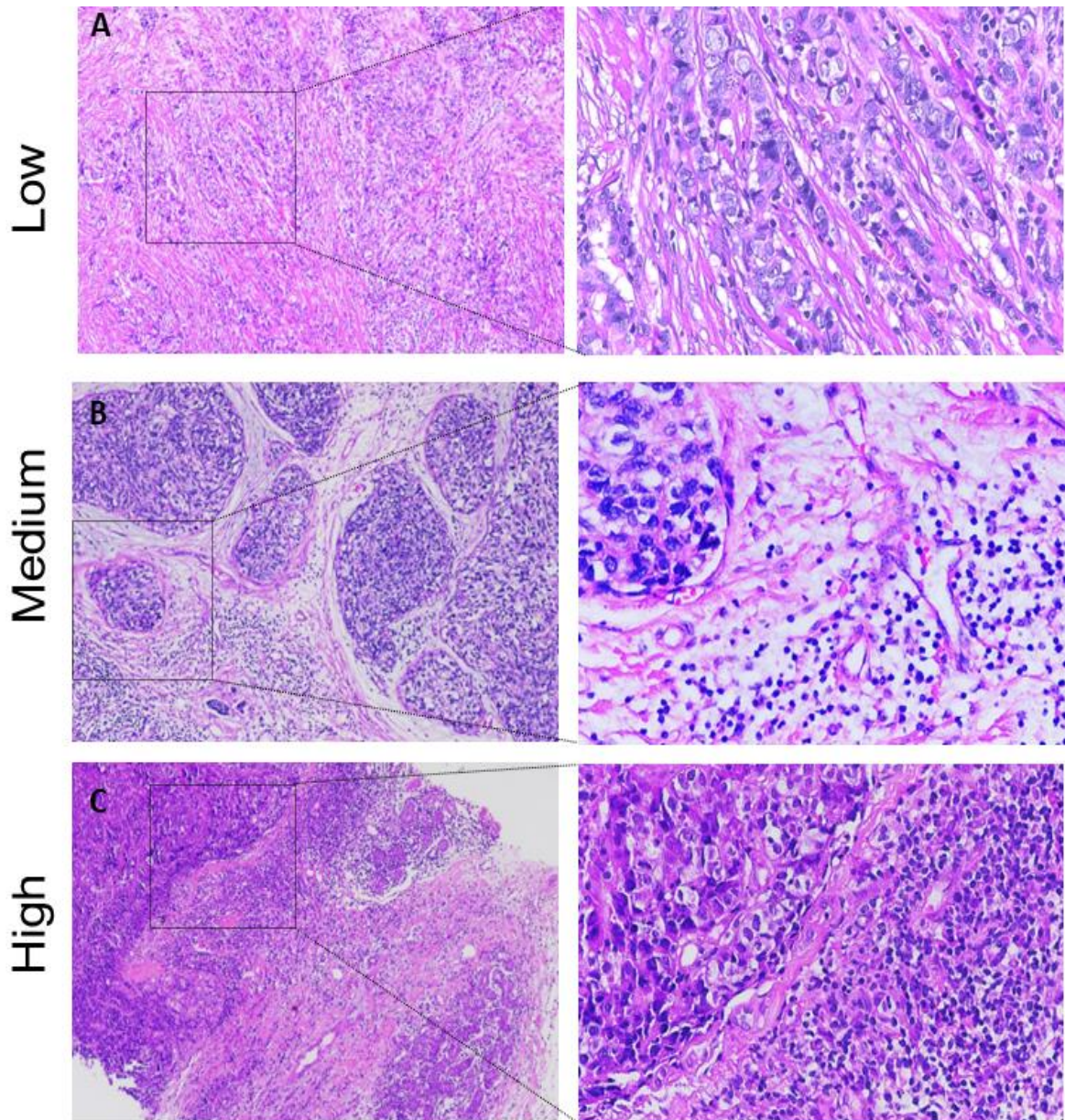
**TABLE 2: Test of association between staging groups and clinical variables.**

<b>Table 2 - Clinical Analysis</b>			
<b>Variables</b>	<b>Staging</b>		<b>P value</b>
	<b>I e II</b>	<b>III e IV</b>	
<b>Age</b>	<b>N(%)</b>	<b>N(%)</b>	
under 50 years	5(33,3)	10(58,8)	
> from 50 to 68 years old	8(53,3)	5(29,4)	0,326

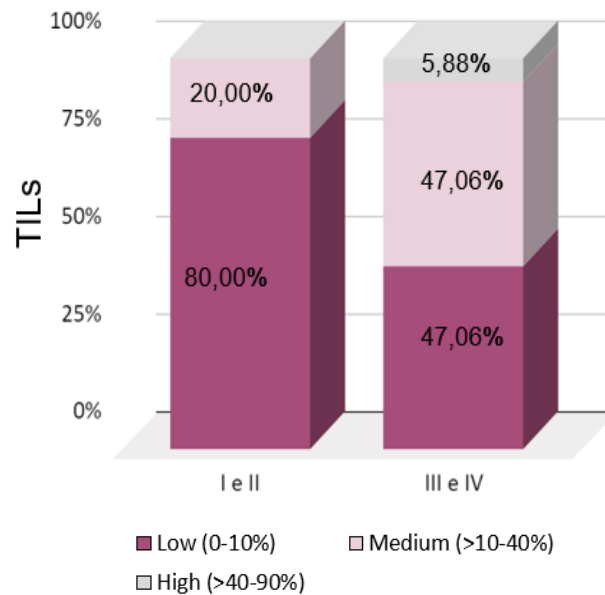
over 68 years	2(13,4)	2(11,8)	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	
<b>Family history of cancer</b>			
Absent	6(42,9)	7(41,2)	
Present	8(57,1)	10(58,8)	0,925
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	
<b>Family history of breast cancer</b>			
Absent	4(50,0)	6(60,0)	
Present	4(50,0)	4(40,0)	0,671
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	
<b>Use of tamoxifen (hormone therapy)</b>			
No	1(6,7)	8(47,1)	
Yes	14(93,3)	9(52,9)	<b>0,005</b>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	

### 3.2 Analysis of the tumor inflammatory infiltrate

Morphometric analyzes indicated that patients with stages III and IV have a greater amount of TILs. Of these, 47.06% had a low number of TILs (0 to 10%) and only 5.88% of patients had a high number of TILs (>40% to 90%). While 80% of patients in stages I and II had a low number of TILs, and the remaining 20% had a medium number of TILs (Fig.2).



**Figure 1. Photomicrographs of sections stained in Hematoxylin & Eosin, indicating the percentage of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) in breast cancer lesions.** The images represent tissue sections from breast cancer patients at 10X and 40X magnifications. In A, B and C, the numbers of low, medium and high TILs were shown, respectively.



**Figure 2. Representation of the morphometric analysis of the TILs percentagem.** Patients with stages III and IV had a higher number of TILs in relation to patients with stages I and II.

### 3.3 Immunological markers in breast cancer (CM)

The profile of immune cells from the tumor microenvironment showed a large amount of CD8+ and CD4+ T lymphocytes, as well as CD68+ macrophages in both staging groups, as well as PD1+, PD-L1+ and PD-L2+ immuncheckpoint molecules. Morphometric analyzes revealed a higher number of CD8+ lymphocytes in patients with stages III and IV ( $55.9 \pm 44.3$ ), compared to patients in the group with stages I and II ( $26.3 \pm 17.4$ ).

A large number of CD4+ T lymphocytes were observed distributed both in the stromal and intratumoral regions of breast tumors. An increase in the number of CD4+ TILs was observed in patients in the stage III and IV group ( $43.3 \pm 31.2$ ) vs. the stage I and II group ( $15.8 \pm 11.4$ ).

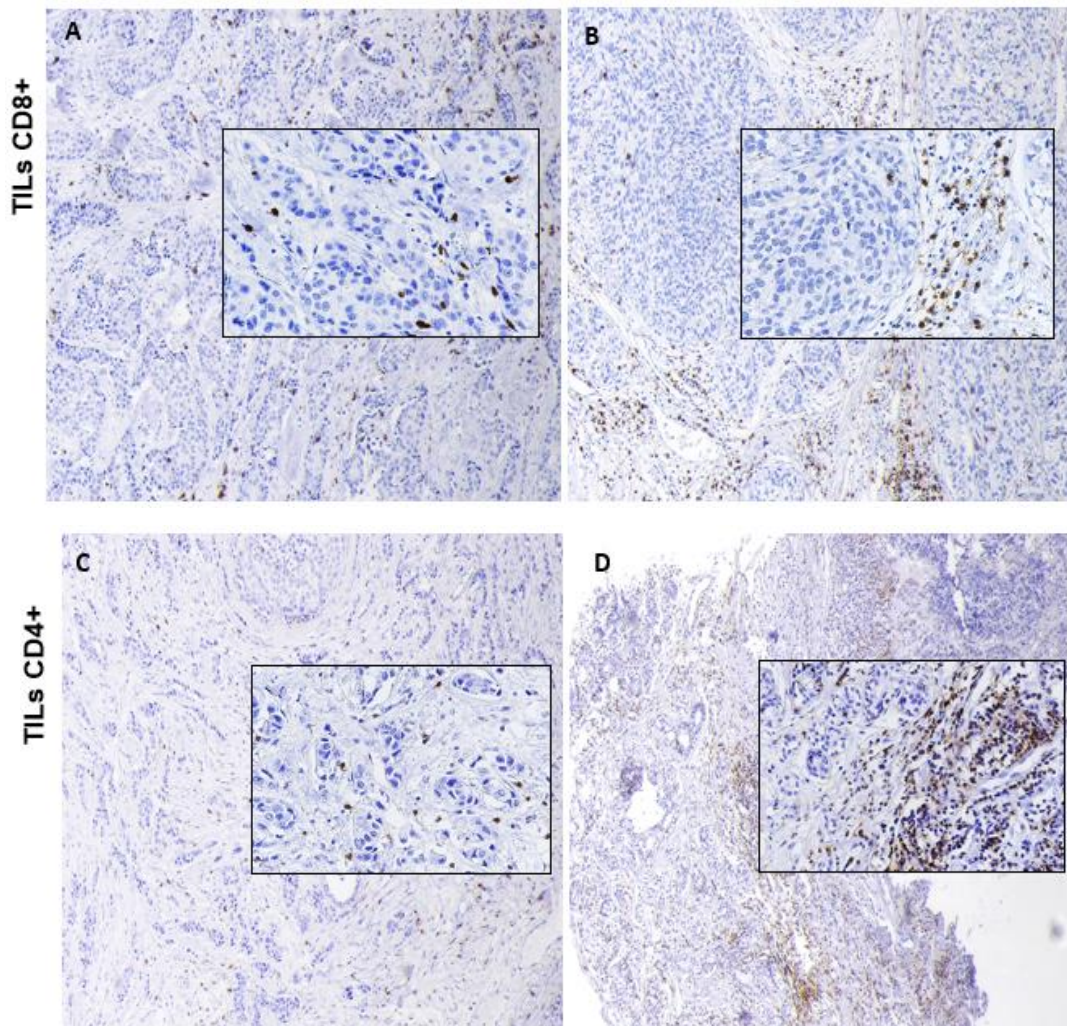
Tumor-associated macrophages (TAMs) are important cells in the presentation of antigens in the immune response. In this work, we observed a wide distribution of TAMs in breast tumors. The number of CD68+ TAMs was higher among patients with stages III and IV ( $28.8 \pm 14.7$ ) vs. stages I and II ( $16.3 \pm 10.2$ ).

The overexpression of inhibitory molecules, the so-called immune checkpoints, such as PD-1 and its ligands PD-L1 and PD-L2 constitutes one of the main mechanisms of immune resistance to tumors in peripheral tissues. In patients with

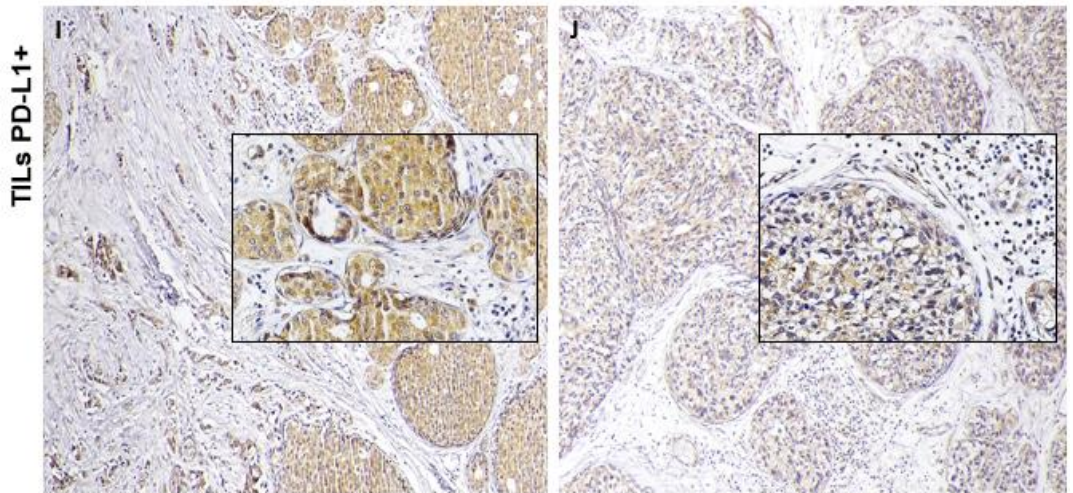
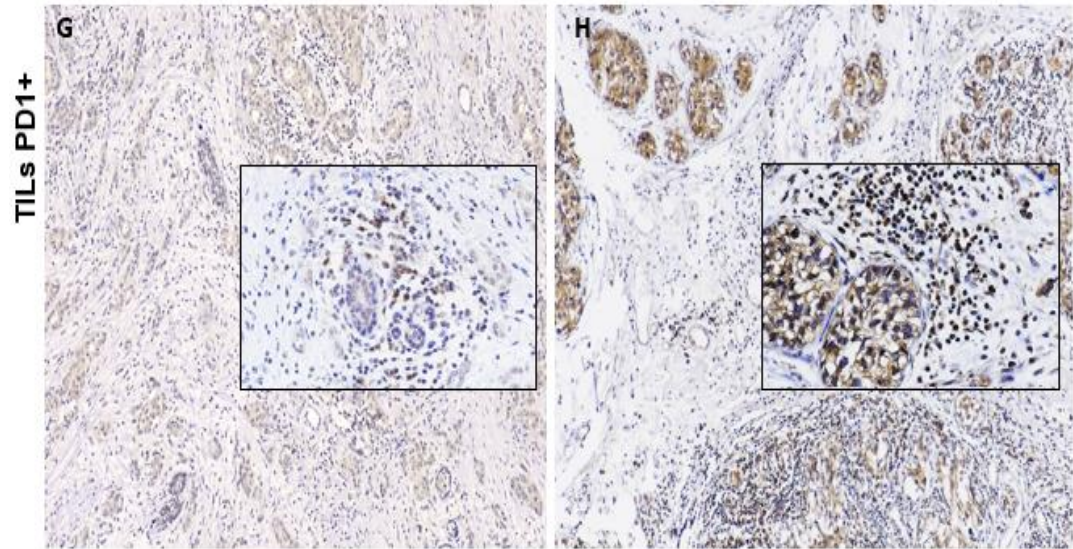
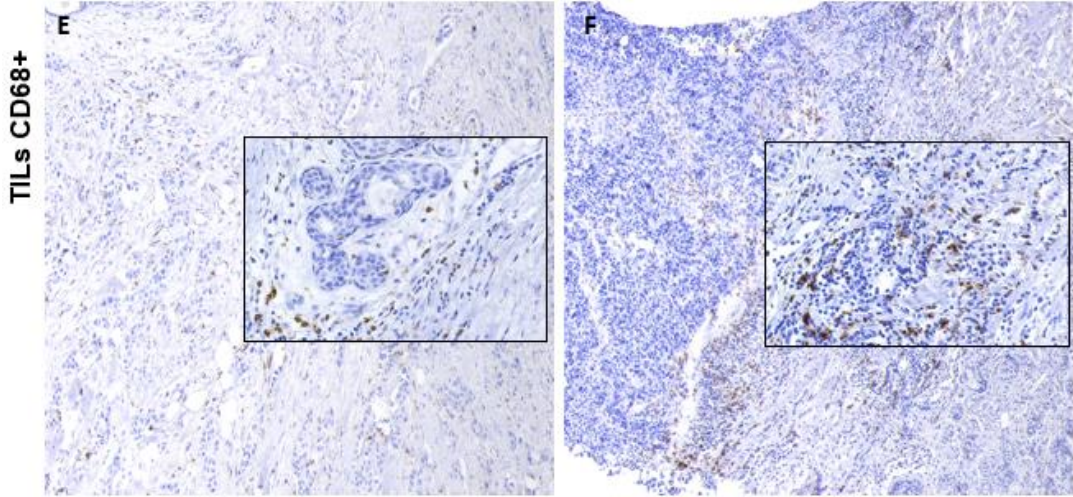


stages III and IV, a significant increase in PD1 TILs ( $15.1 \pm 5.4$   $p < 0.0001$ ) was observed in relation to patients with stages I and II ( $7.1 \pm 3.4$ ).

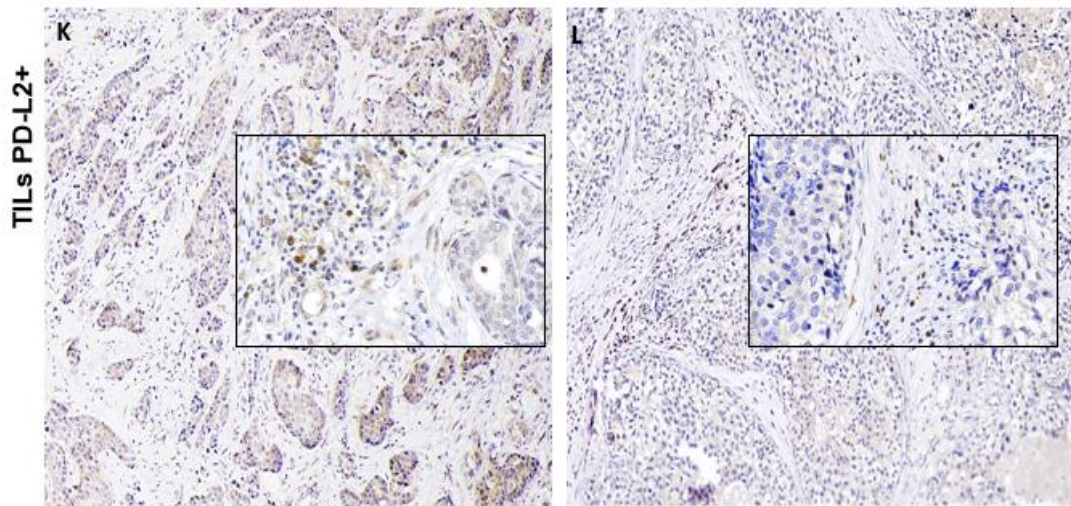
An expression score of the PD-L1 marker in the tumor cells of the CM samples was evaluated. Higher expression of PD-L1 was observed in stages III-IV (47.0%) than in patients in stages I-II (40.0%). The low and medium expressions were 17.7% and 35.3% for stages III - IV and 13.3% and 46.7% for stages I- II, respectively (Table 3).









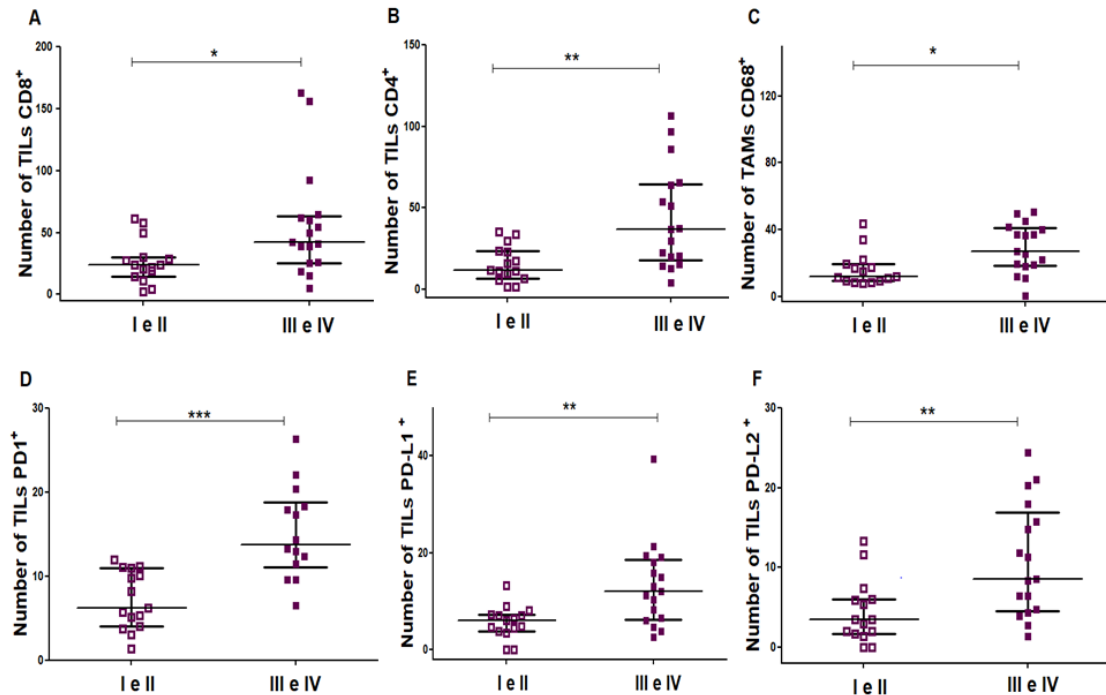


**Figure 3. Photomicrographs of sections, indicating the labeling of TILs, by immunohistochemistry in breast tumors with stages I-II and III and IV.** The images represent tissue sections from breast cancer patients submitted to immunohistochemistry at 100X and 400X magnification (crop). Brown staining (+) indicates protein expression of CD8+, CD4+, CD68+, PD1+, PD-L1+, PD-L2+ in mammary tumor. In A, C, E, G, I, K patients with stages I and II. In B, D, F, H, J, L patients with stages III and IV.

**TABLE 3: Tumor expression of the PD-L1 immune checkpoint.**

PD-L1 EXPRESSION				
	Low	Medium	High	Total(N)
<b>Stadium I, III</b>	13,30%	46,70%	40,00%	15
<b>Stadium III, IV</b>	17,70%	35,30%	47,00%	17

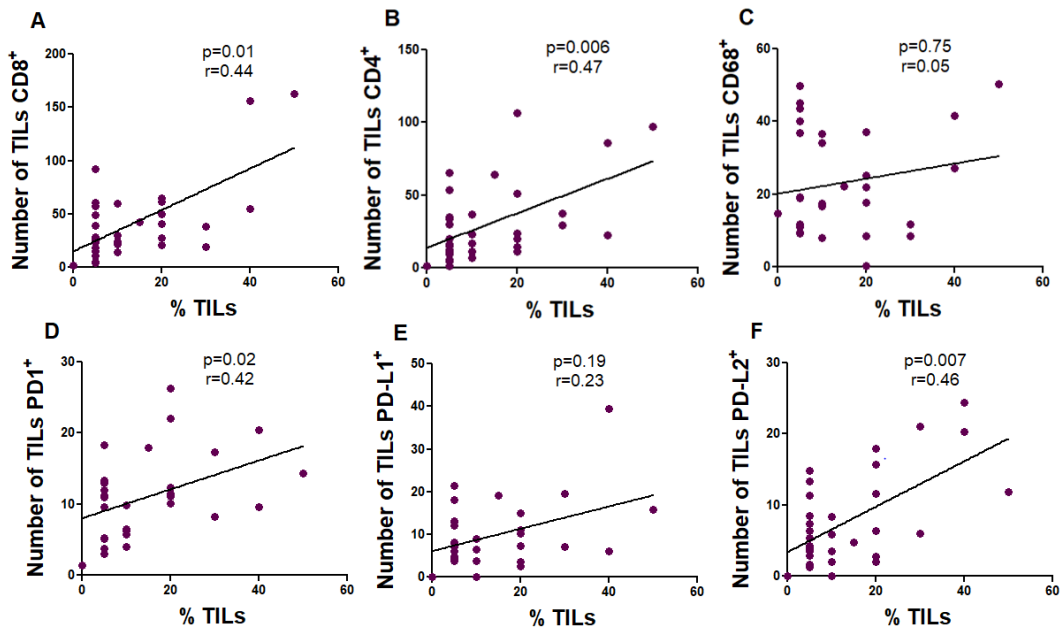
The PD-L1 and PD-L2 ligands also showed higher expression in TILs in stages III and IV ( $13.3 \pm 8.9$ ) and ( $10.8 \pm 7.9$ ) in relation to stages I and II ( $5.6 \pm 3.3$ ) and ( $4.4 \pm 3.9$ ) respectively (Fig.4).



**Figure 4. Characterization of immune cells in breast tumors with stages I -II and III -IV.**

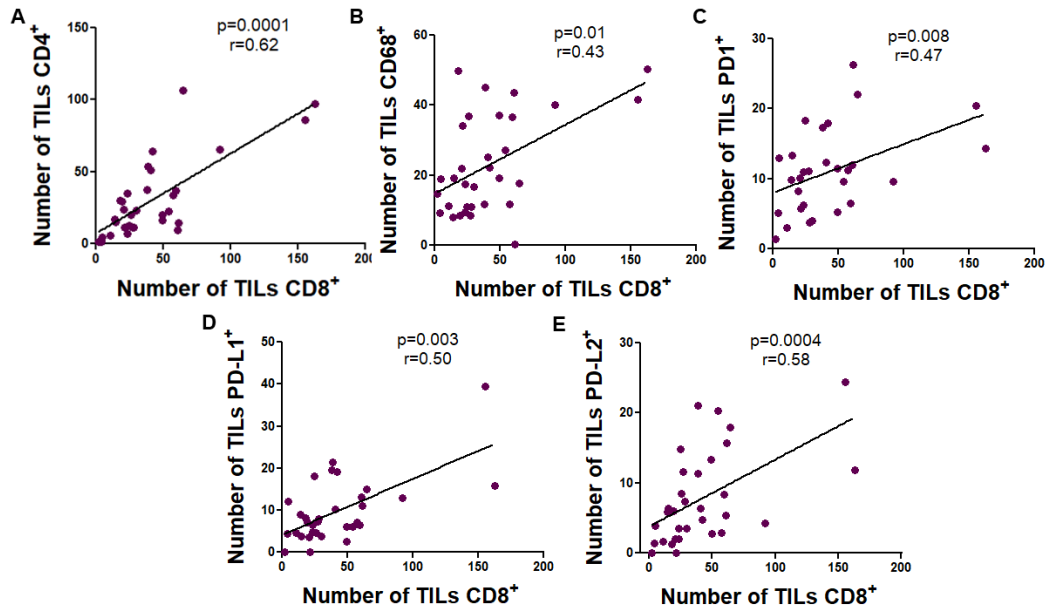
A shows the morphometric analysis of CD8<sup>+</sup> in the tumor, in which patients with more advanced stages had a greater number of CD8<sup>+</sup> TILs in relation to lower stages. (\*) represents  $p < 0.05$ . In B, the morphometric analysis of CD4<sup>+</sup> in the tumor is represented, in which patients with more advanced stages had a greater number of CD4<sup>+</sup> TILs in relation to the lower stages. (\*\*) represents  $p = 0.0089$ . In C, the morphometric analysis of CD68<sup>+</sup> in the tumor is represented, in which patients with more advanced stages had a greater number of CD68<sup>+</sup> TILs in relation to the lower stages. (\*) represents  $p < 0.05$ . In D, the morphometric analysis of PD1<sup>+</sup> in the tumor is represented, in which patients with more advanced stages had a greater number of PD1<sup>+</sup> TILs in relation to the lowest stages. (\*\*\*) represents  $p < 0.0001$ . In E, the morphometric analysis of PD-L1<sup>+</sup> in the tumor is represented, in which patients with more advanced stages had a greater number of PD-L1<sup>+</sup> TILs in relation to the smallest stadiums. (\*\*) represents  $p = 0.003$ . In F, the morphometric analysis of PD-L2<sup>+</sup> in the tumor is represented, in which patients with more advanced stages had a greater number of PD-L2<sup>+</sup> TILs in relation to the lowest stages. (\*\*) represents  $p = 0.004$ .

It was also evaluated whether the total percentage of TILs is related to the immunological markers studied. We observed a positive correlation between % of TILs and CD8 immunological markers ( $r = 0.44$  and  $p = 0.01$ ); CD4 ( $r = 0.44$  and  $p = 0.0062$ ); PD-1 ( $r = 0.42$  and  $p = 0.02$ ) and PD-L2 ( $r = 0.46$  and  $p = 0.007$ ), while no correlation was observed between % of TILs and immunological markers CD68 ( $r = 0.05$  and  $p = 0.75$ ) and PD-L1 ( $r = 0.23$  and  $p = 0.19$ ) (Fig.5).



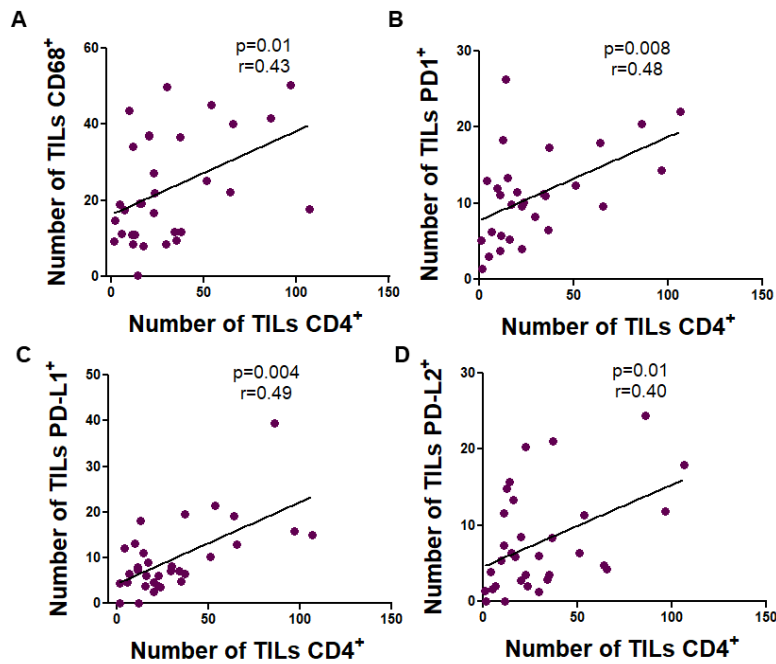
**Figure 5. Correlation analysis between % TILs and immunological markers.** Correlation analysis between % TILs and immunological markers. In A, B, D and F there is a positive correlation between %TILs and immunological markers CD8, CD4, PD-1 and PD-L2. In C and E, no significant correlation was observed between % TILs and CD68, PD-L1 markers. The Spearman statistical test was used, considering the value of  $p > 0.05$ .

For a more comprehensive analysis, the relationships between the immunological markers and immun checkpoints studied were also evaluated. When analyzing the relationship between the immunological marker TCD8 and the other markers, it was observed that there was a positive correlation between CD8 and the markers, PD-1 ( $r=0.47$  and  $p=0.008$ ), and moderate positive correlation with CD4, PD-L1 and PD-L2 ( $r=0.62$  and  $p=0.0001$ ), ( $r=0.50$  and  $p=0.003$ ) and ( $r=0.58$  and  $p=0.0004$ ) respectively, however, no correlation was observed between CD8 vs. CD68 ( $r=0.43$  and  $p=0.41$ ), (Fig.6).



**Figure 6. Correlation analysis between CD8 and other immunological markers.** Correlation analysis between CD8 and immunological markers. In A, B, D and E, there is a positive correlation between CD8 and the immunological markers, CD4, PD1, PD-L1 and PD-L2. In C, no CD8 vs. correlation was observed. CD68. The Spearman statistical test was used, considering the value of  $p > 0.05$ .

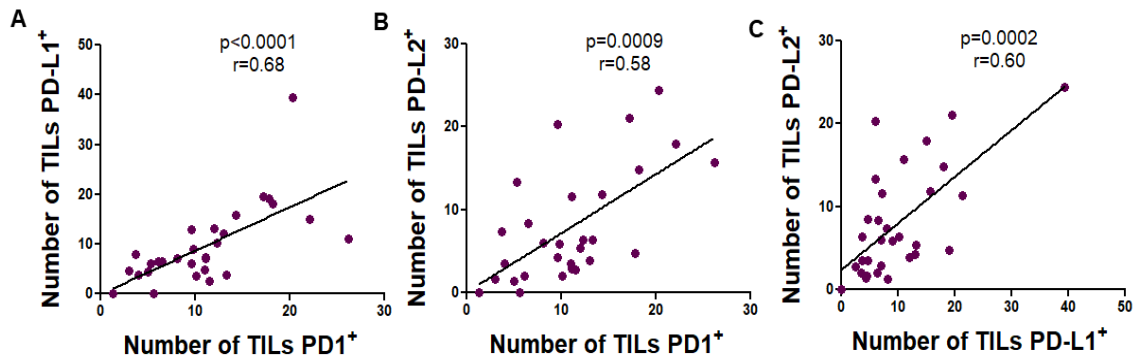
To analyze the relationship between the CD4 immunological marker and the CD68, PD-1, PD-L1 and PD-L2 markers, it was observed that there was a moderate correlation between CD4 and the PD-1, PD-L1 markers, with ( $r=0.48$  and  $p=0.008$ ), ( $r=0.49$  and  $p=0.004$ ) respectively, and PD-L2 ( $r=0.40$  and  $p=0.01$ ). No correlation was observed with the CD68 marker ( $r=0.43$  and  $p=0.01$ , Fig.7).



**Figure 7. Correlation analysis between CD4 and immunological markers.** Correlation analysis between CD4 and immunological markers. In B, C and D, there is a positive correlation between CD4 and the immunological markers, PD=1, PD-L1 and PD-L2. In A, no correlation was observed between CD4 vs CD68 markers. The Spearman statistical test was used, considering the value of  $p > 0.05$ .

In the analysis of CD68 correlation with the markers PD-1, PD-L1 and PD-L2, no significant difference was observed PD-1 ( $r=0.15$  and  $p=0.41$ ), PD-L1 ( $r=0.16$  and  $p=0.36$ ) and PD-L2, ( $r=0.01$  and  $p=0.92$ ). Graphics not shown.

In the analysis of the relationship between PD-1 immunocheckpoint and PD-L1 and PD-L2 markers, it was observed that there was a moderate correlation between PD-1 and PD-L1 markers ( $r=0.68$  and  $p < 0.0001$ ) and PD-L2, ( $r=0.58$  and  $p=0.0009$ ). In the correlation analysis between PD-L1 and PD-L2 ligands, a moderate correlation was observed with ( $r=0.60$  and  $p=0.0002$ , Fig. 8).



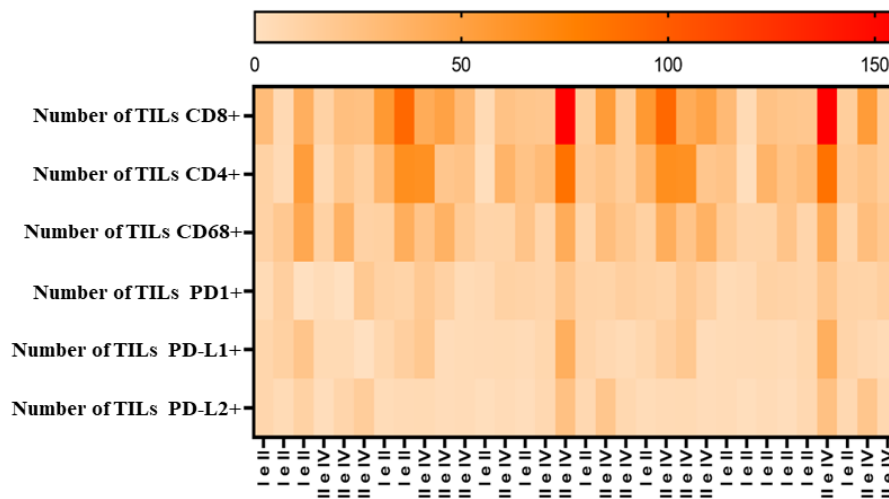
**Figure 8. Correlation analysis between the PD-1 and PD-L1 immunocheckpoint and other immunological markers.** Correlation analyzes between PD-1 and immunological

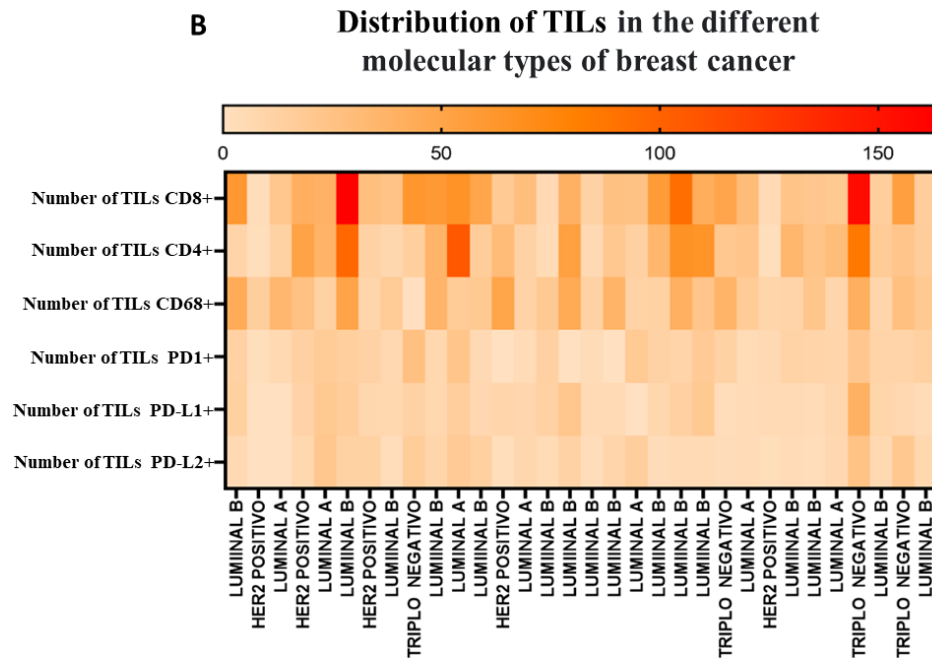
markers. In A and B there is a positive correlation between PD-1 and the markers PD-L1 and PD-L2. In C. Correlation analysis between PD-L1 and PD-L2. A positive correlation was observed between the PD-L1 X PD-L2 markers. The Spearman statistical test was used, considering the value of  $p > 0.05$ .

Analysis of the relationship between % TILs and immunological markers of patients with compromised lymph nodes was also performed, and a correlation between % TILs and CD4 was observed ( $r=0.57$  and  $p=0.02$ ). The analysis between % of TILs and stages was also performed. In stages I and II, no correlation was observed between the markers. Differently from what we observed in stages III and IV, in which positive correlations between % of TILs and immunological markers CD8, CD4, PD-1 and PD-L1, were observed in higher stages (III and IV). Graphics not shown.

Distribution analyzes of all TIL markers were performed according to the staging groups, it was observed that the most expressed cells in the tumor microenvironment are CD8, CD4 and CD68, and that these are more expressed by patients of the highest stages (III and IV). In the distribution of TILs and molecular groups, it was observed that patients in the triple negative and luminal B groups showed a higher expression of TILs (Fig.9).

### A Distribution of TILs in breast cancer





**Figure 9. Distribution of TILs across staging groups and breast cancer molecular groups. Heatmap.** A shows the distribution of TILs in groups of stages I and II, III and IV. Heatmap B shows the distribution of TILs in molecular groups. Darker colors demonstrate greater expression of the marker, while lighter colors demonstrate less expression of each marker.

#### 4.0 DISCUSSION

In this work we investigated the expression of TILs, TAMs and immunological markers of suppression of the antitumor response, called immun checkpoints. The data presented here showed greater inflammation in patients with more advanced stages, allowing an association between immunological markers and clinical variables to be traced.

In the analysis between groups of stages and clinico-histopathological variables, an association was seen between the stages and tumor size, estrogen receptor, progesterone and association of carcinoma in situ. Other studies have observed that a higher density of TILs is associated with larger tumors, histological grade and Ki67 index, and no association with age was seen, as we could see in our analysis (HWANG et al., 2019; PUJANI et al., 2020).

In this study, patients in stages III and IV (with the exception of one patient) had greater inflammation. Other studies have also shown that the increase in the number of TILs has a strong predictive relationship with pathological complete response (PCR) in patients in the HER2+ and triple negative subgroups (most studied), and less in

luminals A and B (JEONG et al., 2019). In another study, the number of TILs was lower in patients with partial response. Thus, the status of TILs in primary tumors could predict RPC to neoadjuvant chemotherapy in CM HER2+ (KUROZUMI et al., 2017).

However, the investigation of TILs in luminal-type CM revealed that the highest levels of TILs have an unfavorable association with clinical-pathological parameters (CRISCITIELLO et al., 2020). Despite the high rates of TILs being correlated with the increase in RPC in the luminal CM. Survival analysis demonstrated an association between higher TILs and lower survival in the Luminal B-like subtype (DENKERT et al., 2018), evidencing a divergence in the data obtained in the Luminal-type CM. The results demonstrate a need for further studies on lymphocyte infiltration in this subgroup (DIECI et al., 2016). In addition, the molecular types of CM have distinct behaviors and responses to disease and treatment, which demonstrates how heterogeneous this type of carcinoma is.

In this study, patients who belonged to stages III and IV had greater cellular infiltration of CD8+ TILs, CD4+ and CD68 TAMs. Clinical trial data point to the role of CD8+ TILs in the therapeutic efficacy of tumor treatment (ANICHINI et al, 1996). Other studies showed that CD4+ lymphocytes are the most prevalent subtype in tumor stroma, while CD8+ lymphocytes are the most prevalent in tumor nests (VERMA et al., 2020). (DENARDO et al., 2011) It was observed that the high density of CD4 T cells and low density of CD8 T cells correlates with reduced overall survival, while the CD68 cell density showed no association. Furthermore, an inverse association between CD68 and CD8 was observed (DENARDO et al., 2011), corroborating our data.

Through the characterization of immune checkpoints, an increase in the number of TILs expressing PD-1, PD-L1 and PD-L2 was observed in patients with stage III and IV CM. PD-1 expression in TILs was associated with tumor size, histological grade and lymph node involvement and worse overall survival in luminal B (HER2+ and HER2-) and triple-negative subtypes (MUENST et al., 2013). The analysis of the PD-L1 expression score in tumor cells showed that all samples showed some degree of expression from 1 to 3. The literature shows that this expression occurs according to the stage and molecular subtype of CM, and the subtypes negative and HER2+ are the ones with the highest expression. In the present work, an analysis of the markers according to molecular subtypes was not possible and there is a lack of studies that demonstrate concise data regarding the expression of PD-L1 in early tumors vs. advanced.



The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression in CM has been evaluated in other works (KIM; LEE; KOO, 2017). Higher histopathological grade and lymph node metastasis are associated with higher expression of PD-L1 in both tumor and immune cells. Higher PD-L1 expression is also associated with larger tumor size, hormone receptor negative, and HER2-. The relationship between worse prognosis and higher expression of PD-L1 is justified by the phenomenon of “immune escape”, in which tumor cells are able to become “invisible”, expressing antigens that are not identified by the immune system. Therefore, it is suggested that the presence of TILs is a favorable prognostic factor in MC and that TILs act in line with chemotherapy and immunotherapy for a better response in these patients. The use of TILs levels in CM becomes important, as they help in the discovery of tumors more susceptible to immunomodulation, which may indicate additional strategies for treatment (KUZNAR et al. 2017).

In this study, the presence of greater inflammatory infiltrate was observed in patients of stages III and IV and a correlation between T lymphocytes (CD8+ and CD4+) and immunotherapy markers was observed, demonstrating that these patients could possibly benefit from treatment with PD-1 or PD-L1. Furthermore, macrophages and regulatory T lymphocytes probably represent important counter-regulatory mechanisms that the tumor recruits in order to allow an escape from the adaptive immune response (PLESCA et al., 2020). A more accurate understanding of how immune cells act in tumor development, especially in a disease with a diversity of molecular groups and histological types such as CM is still necessary.

## **5.0 CONCLUSION**

In this study, it was observed that higher levels of TILs are associated with clinicopathological characteristics of more advanced and therefore more aggressive tumors. TILs have been shown to be important as a prognostic factor in CM of the triple negative and HER2+ subtypes. Due to its importance, further studies on the different roles of TILs subclasses in the different molecular subtypes of MC are necessary, which may help in the understanding of immunological mechanisms, bringing better evidence that can be used in immunotherapy. In addition, luminal subgroups are less studied and their predictive and prognostic values still remain controversial. More studies may make the characterization of TILs a good tool to aid in clinical practice.

## REFERENCES

ANICHINI, A et al. "Cytotoxic T cells directed to tumor antigens not expressed on normal melanocytes dominate HLA-A2.1-restricted immune repertoire to melanoma." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* v. 156, n.1, 1 janeiro 1996.

AGGARWAL, C. et al. Prevalence of PD-L1 expression in patients with non-small cell lung cancer screened for enrollment in KEYNOTE-001, -010, and -024. *Annals of Oncology*, v. 27, p. vi363, out. 2016.

AHN, S. et al. Changes and prognostic values of tumor-infiltrating lymphocyte subsets after primary systemic therapy in breast cancer. *PLoS ONE*, v. 15, n. 5, 1 maio 2020.

CRISCITIELLO, C. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/HER2- breast cancer.

*Breast Cancer Research and Treatment*, v. 183, n. 2, p. 347–354, 1 set. 2020.

DENARDO, D. G. et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery*, v. 1, n. 1, p. 54–67, 2011.

DENARDO, D. G.; ANDREU, P.; COUSSENS, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity *Cancer and Metastasis Reviews*, jun. 2010.

DENKERT, C. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *The Lancet Oncology*, v. 19, n. 1, p. 40–50, 1 jan. 2018.

DIECI, M. V. et al. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? *Cancer Treatment Reviews* W.B. Saunders Ltd, , 1 maio 2016.

FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: Na update. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 55, n. 3, p. 327–332, 2019.

FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome *Nature Reviews Cancer*, abr. 2012.

GODOY-ORTIZ, A. et al. Deciphering her2 breast cancer disease: Biological and clinical implications. *Frontiers in Oncology*, v. 9, n. OCT, 2019.

HALIM, F. et al. Programmed death ligand-1 protein expression difference in basal like and non- basal like triple negative breast cancer and its association with disease

free survival and overall survival: A systematic review *Oncology Reviews* Page Press Publications, , 21 set. 2021.

HENDRY, S. et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma in Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research *Advances in Anatomic Pathology* Lippincott Williams and Wilkins, , 2017.

HWANG, H. W. et al. A nomogram to predict pathologic complete response (pCR) and the value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer patients *Breast Cancer Research and Treatment* Springer New York LLC, , 30 jan. 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019a.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019b.

IWAI, Y. et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. [s.l: s.n.]. Disponível em: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192461099](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192461099).

JEONG, H. et al. Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer. *Journal of Breast Cancer*, v. 22, n. 1, p. 38–51, 1 mar. 2019.

KIM, H. M.; KOO, J. S. Clinicopathologic characteristics of breast cancer according to the infiltrating immune cell subtypes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 12, p. 1–14, 1 jun. 2020.

KIM, H. M.; LEE, J.; KOO, J. S. Clinicopathological and prognostic significance of programmed death ligand-1 expression in breast cancer: A meta-analysis. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, 17 out. 2017.

KUROZUMI, S. et al. Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer *Medical Molecular Morphology* Springer Tokyo, , 1 dez. 2017.

MARTINS, P. R. et al. Cervical cancer patients that respond to chemoradiation therapy display an intense tumor infiltrating immune profile before treatment. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 111, 1 dez. 2019.

MUENST, S. et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 139, n. 3, p. 667–676, jun. 2013.

PLESCA, I. et al. Characteristics of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Prior to and During Immune Checkpoint Inhibitor Therapy *Frontiers in Immunology* *Frontiers Media S.A.*, , 4 mar. 2020.

PUJANI, M. et al. Evaluation of Tumor infiltrating lymphocytes in breast carcinoma and their correlation with molecular subtypes, tumor grade and stage. *Breast disease*, v. 39, n. 2, p. 61–69, 2020.

RETECKI, K. et al. The immune landscape of breast cancer: Strategies for overcoming immunotherapy resistance *Cancers* *MDPI*, , 1 dez. 2021.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, maio 2021.

The jamovi project (2021). *jamovi*. (Version 1.8) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>. R Core Team (2021). *R: A Language and environment for statistical computing*. (Version 4.0)

TILs group – International Immuno-Oncology Working Group (TILs Group) – 2021.

VERMA, R. et al. Levels of different subtypes of tumour-infiltrating lymphocytes correlate with each other, with matched circulating lymphocytes, and with survival in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 183, n. 1, p. 49–59, 1 ago. 2020.

WHO, World Health Organization. Constitution of the World Health Organization (WHO/WHO) –2019.