

**O PAPEL DOS MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO
TUMOR (TAM) NA PREDIÇÃO DE ACOMETIMENTO
METASTÁTICO DE LINFONODOS SENTINELAS EM
CÂNCER DE MAMA**

ALINE CARVALHO ROCHA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rocha, Aline Carvalho

**O papel dos macrófagos associados ao tumor (TAM) na
predição de acometimento metastático de linfonodos sentinelas
em câncer de mama** / Aline Carvalho Rocha – São
Paulo, 2018.

120p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2.
Macrófagos/Macrophages. 3. Linfonodo Sentinela/Sentinel Lymph Node.

DEDICATÓRIA

Dedico minha tese primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora de angústia.

À minha amada filha, Lara Carvalho Schoenherr, pelo constante sorriso tão acolhedor e meigo, pelo seu amor e para que ela cresça sabendo valorizar a pesquisa científica.

À minha mãe, Maria Lucia Castro de Carvalho, pelo amor incondicional, por dar-me a tranquilidade necessária para conduzir minha pesquisa e pelas muitas palavras de incentivo ao longo dessa caminhada.

Ao meu pai, Antônio Rodrigues de Carvalho, pelo exemplo de homem, pelos conselhos tão sábios e por sua capacidade de acreditar e investir em mim.

À minha tia, Maria de Lourdes de Castro, pela dedicação à minha família e pela pronta disponibilidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Victor Piana de Andrade, pela orientação, por acreditar nessa pesquisa e pela pronta disponibilidade. Obrigada pela tranquilidade e apoio diante das dificuldades.

À Doutora Monique Batista da Costa Lemos, patologista, pela realização dos exames imuno-histoquímicos em tempo hábil e pela grande ajuda diante de tantas dúvidas.

Ao Professor Doutor Paulo Goberlânio, professor do curso de odontologia da Universidade Christus, pelo grande conhecimento bioestatístico e pela pronta disponibilidade na execução dos resultados, não medindo esforços para concluir todas as análises estatísticas.

À Carlos Ferreira do Nascimento, do A.C.Camargo Cancer Center, pela ajuda na confecção dos blocos de TMA.

À José Ivanildo Neves, do Laboratório de Patologia do Hospital A.C.Camargo Cancer Center, pela contribuição nas reações de imuno-histoquímica.

À Marina França de Resende, do Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital A.C.Camargo Cancer Center, pela confecção de lâminas com os marcadores para os macrófagos e macrófagos proliferantes.

À Escola Cearense de Oncologia, especialmente ao Professor Doutor Manfredo Luiz Lins e Silva, superintendente executivo, à Luciana Silva da Costa, coordenadora acadêmica, e Priscila Bernardo, secretária executiva, pela oportunidade de através do Dinter ter a obtenção dos créditos necessários para a execução desse doutorado.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, pelo pioneirismo científico e contribuição na formação de novos pesquisadores além de suas fronteiras.

Ao Instituto do Câncer do Ceará, pela iniciativa de formar novos doutores no Ceará.

À Fabiana Vieira, médica gastroenterologista e minha grande amiga, pela calorosa acolhida em sua residência em São Paulo.

À Cristhian Mark Schoenherr, pai de minha filha, pelo conhecimento em informática, conseguindo resgatar todos os dados perdidos da minha pesquisa ao eliminar um vírus conhecido como cavalo de Tróia dos meus arquivos.

À Larisse Macedo de Almeida e à Suely Francisco, bibliotecárias do ICC e do A.C.Camargo Cancer Center, respectivamente, pela ajuda na aquisição dos artigos científicos e na organização das referências bibliográficas.

À Cynthia Rocha Brasil, bibliotecária, pela ajuda na formatação e normatização dessa tese.

À Ana Lucia Moreira de Carvalho Sousa, licenciada em Letras, especialista em Língua Portuguesa e Psicopedagogia e tia querida, pela grandiosa ajuda na revisão do português.

Às minhas pacientes, mulheres portadoras de câncer de mama, que compreenderam alguns momentos de minha ausência para a condução dessa pesquisa.

RESUMO

Rocha AC. **O papel dos macrófagos associados ao tumor (TAM) na predição de acometimento metastático de linfonodos sentinelas em câncer de mama.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: Os macrófagos associados ao tumor (TAM) constituem até 50% da massa tumoral do câncer de mama, sendo vitais na resposta imune inata. Essas células são dotadas de uma plasticidade a qual lhes permitem a mudança de seu fenótipo de acordo com os sinais do microambiente tumoral. Há estudos relacionando o aumento da densidade dos TAM com metástases linfonodais axilares. **OBJETIVO:** Avaliar a associação entre a densidade dos TAM no estroma tumoral e o acometimento metastático em linfonodos sentinelas. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo transversal em pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de mama invasivo e estadiamento clínico inicial que se submeteram à cirurgia (quadrantectomia ou mastectomia) e pesquisa do linfonodo sentinela entre janeiro/2007 a dezembro/2012 no A.C. Camargo Cancer Center. Em blocos de Tissue microarray (TMA) de 101 tumores foram analisados por imunohistoquímica os marcadores para macrófagos totais (CD68), macrófagos M2 (CD163), macrófagos M1 (HLA-DR) e macrófagos proliferantes (PROMACS) (dupla marcação com CD68 e Ki67). **RESULTADOS:** O ponto de corte para os marcadores dos macrófagos foram: CD68 (110 céls/mm²), CD163 (25 céls/mm²) e HLA-DR (80 céls/mm²). Não houve associação entre a densidade dos TAM no estroma tumoral e o acometimento de linfonodos sentinelas em câncer de mama. O baixo número de células expressando CD68 e CD163 associou-se com tumores luminais, enquanto a alta expressão de CD68 e CD163 associou-se com tumores Receptores Hormonais (RH) negativos, grau histológico III e alto índice mitótico. HLA-DR não obteve nenhuma associação com status do RH, HER 2 e variáveis anatomopatológicas. A maioria dos macrófagos não apresentaram nenhum grau de proliferação. **CONCLUSÃO:** TAM no estroma tumoral não é um preditor de acometimento axilar em tumores de bom prognóstico.

SUMMARY

Rocha AC. **[The role of tumor-associated macrophages in the prediction of sentinel lymph node involvement in breast cancer]**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: Accounting for up to 50% of the tumor mass in breast cancer, tumor-associated macrophages (TAM) are a vital part of the innate immune system. TAMs may change phenotype according to cues from the tumor microenvironment. Some authors have reported an association between increased TAM density and axillary lymph node metastasis. **PURPOSE:** The purpose of this study was to evaluate the association between the TAM density of breast tumor stroma and sentinel lymph node involvement. **MATERIAL AND METHODS:** The cohort consisted of patients with histopathological diagnosis of early-stage invasive breast cancer submitted to mastectomy or quadrantectomy and sentinel lymph node biopsy between January 2007 and December 2012 at a Brazilian referral hospital (AC Camargo Cancer Center). Using tissue microarrays, 101 tumors were submitted to immunohistochemistry for total macrophages (CD68), M2 macrophages (CD163), M1 macrophages (HLA-DR), and proliferating macrophages (double staining for CD68 and Ki67). **RESULTS:** The cut-off for the macrophages markers were CD68 (110 céls/mm²), CD163 (25 céls/mm²) e HLA-DR (80 céls/mm²). No association was observed between the TAM density of breast tumor stroma and sentinel and lymph node involvement. Low CD68 and CD163 expression was associated with luminal tumors, while high CD68 and CD163 expression was associated with hormone receptor-negative tumors, histological grade III, and high mitotic indices. HLA-DR was not correlated with hormone receptor status, HER 2 or anatomopathological variables. Most macrophages displayed no proliferation. **CONCLUSION:** Stromal TAMs not predictive of axillary involvement in tumors of good prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imunoedição do câncer de mama.	22
Figura 2	Representação esquemática mostrando o papel das células estromais no microambiente tumoral e a progressão do câncer de mama	26
Figura 3	Polarização dos macrófagos.....	32
Figura 4	Progressão do câncer de mama e mediadores inflamatórios secretados por TAM.....	34
Figura 5	Confecção do TMA	43
Figura 6	Caso com campo vazio no TMA.....	45
Figura 7	Caso com tecido gorduroso no TMA	45
Figura 8	Seleção dos casos no TMA e repetição no espelho (TMA 31).	48
Figura 9	Fluxograma evidenciando como foi composta a amostra final da pesquisa.....	54
Figura 10	Alta imunoexpressão de CD68 (>110 Células/mm ²). Menor aumento e maior aumento	62
Figura 11	Alta imunoexpressão de CD163 (> 25 Células/mm ²). Menor aumento e maior aumento	63
Figura 12	Alta imunoexpressão de HLA-DR (>80 células coradas/mm ²). Menor e maior aumento.....	64

Figura 13	Baixa imunexpressão de CD68 (<110 células coradas/mm ²). Menor e maior aumento.....	65
Figura 14	Baixa imunexpressão de CD163 (<25 células coradas/mm ²). Menor e maior aumento.....	66
Figura 15	Baixa imunexpressão de HLA-DR (<80 células/mm ²). Menor e maior aumento	67
Figura 16	Reação de imunohistoquímica - dupla marcação (CD68 e Ki67) Menor aumento.....	73
Figura 17	Reação de imunohistoquímica -dupla marcação (CD68 e Ki67) Maior aumento	73
Figura 18	Clusters por perfil CD68*CD163*HLA-DR*PROMAC.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas-histológicas e moleculares por IHQ e relação com acometimento metastático do linfonodo sentinela	58
Tabela 2	A média de células/mm ² coradas com os marcadores CD68, CD163 e HLA-DR em relação ao acometimento do linfonodo sentinela	61
Tabela 3	Associação entre acometimento do linfonodo sentinela e biomarcadores para os macrófagos.....	68
Tabela 4	Associação entre o CD68 e outros marcadores tumorais	69
Tabela 5	Associação entre os CD163 e outros marcadores tumorais.....	70
Tabela 6	Associação entre HLA-DR e outros marcadores tumorais	71
Tabela 7	Relação entre PROMACS e linfonodo sentinela	74
Tabela 8	Características clínico-patológicas e TAM.....	76
Tabela 9	Clusterização hierárquica não supervisionada e supervisionada	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Subtipos moleculares de câncer de mama classificados por Imuno-histoquímica.....	7
Quadro 2	Biomarcadores prognósticos e preditivos para decisão de terapias em câncer de mama	11
Quadro 3	Associação entre aumento da densidade dos TAM e envolvimento linfonodal	36
Quadro 4	Banco de dados AC Camargo e distribuição por TMA.....	41
Quadro 5	Amostra estimada da pesquisa (141 casos).....	42
Quadro 6	Anticorpos utilizados na pesquisa.....	47
Quadro 7	Gradação dos PROMACS de acordo com a reação de Imuno-histoquímica	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACOSOG	<i>American College of Surgeons Oncology Group</i>
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
ASCO	<i>American Society of clinical Oncology</i>
BLS	Biópsia do linfonodo sentinela
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
CSF	<i>colony stimulantig factor</i>
DAB	diaminobenzidine
DNA	ácido desoxirribonucleico
EA	Esvaziamento axilar
EEC	extravasamento extra-capsular
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por imunofluorescência
HA	hyaluronan
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IBCSG	<i>International Breast Cancer Study Group</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de geografia e estatística
IHQ	imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF	Interferon gama
Ki67	Antígeno Ki67
LS	Linfonodo sentinela
M1	macrófagos classicamente ativados
M2	macrófagos alternativamente ativados
MEC	matriz extracelular
mi-RNA	micro RNA
PCNA	antígeno nuclear celular proliferante

PH	potencial hidrogeniônico
PROMACS	macrófagos proliferantes
q-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
RS	<i>Recurrence Score</i>
RT	Radioterapia
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SISH	<i>Silver in situ Hybridization</i>
TAF	<i>tumor-associated fibroblastos</i>
TAM	Macrófagos associados ao tumor
T-DM1	Trastuzumab emtansine
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TH1	T Helper tipo 1
TH2	T Helper tipo 2
TIL	<i>tumour-infiltrating lymphocytes</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNF	<i>tumor necrosis fator</i>
T-regs	Linfócitos T reguladores
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama.....	2
1.2	Linfonodo sentinela	11
1.3	Sistema imune e inflamação em câncer de mama	20
1.4	Microambiente Tumoral.....	22
1.5	Macrófagos associados ao tumor (TAM).....	26
1.6	TAM e acometimento linfonodal axilar.....	36
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo principal	39
3.2	Objetivos secundários	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Tipo de estudo.....	40
4.2	População do estudo	40
4.3	Crterios de elegibilidade	40
4.3.1	Crterios de Exclusão.....	40
4.4	Coleta dos dados.....	41
4.5	Bloco de TMA (tissue microarray)	42
4.6	Imuno-histoquímica	46
4.6.1	Preparo das lâminas para imuno-histoquímica.....	46
4.6.2	Biomarcadores para macrófagos selecionados para o estudo	48
4.6.3	Receptores hormonais	48
4.6.4	HER-2.....	49
4.6.5	Ki67	49
4.6.6	Macrófagos proliferantes	50

4.6.7	Preparo das lâminas para pesquisa dos PROMACS-dupla marcação.....	50
4.6.8	Identificação e graduação dos TAM e PROMACS	51
4.7	Análise estatística.....	52
5	RESULTADOS.....	54
5.1	Amostra final da pesquisa	54
5.2	Perfil clínico-patológico e molecular por IHQ.....	54
5.3	Análise dos TAM	60
5.4	Correlação entre TAM e características clínicas e patológicas	74
5.5	Clusterização hierárquica	81
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÃO	106
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICE

Apêndice 1 Curvas ROC para avaliação do ponto de corte dos
marcadores para macrófagos

1 INTRODUÇÃO

O câncer da mama é a mais prevalente e incidente doença maligna a afetar mulheres em todo o mundo, excluindo os tumores de pele não-melanomas. Estima-se para o Brasil, que em 2018 surgirão 59.700 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. As regiões Sudeste e Nordeste do Brasil foram as que evidenciaram as maiores estimativas para esse período, sendo São Paulo o estado brasileiro a apresentar o maior número de casos novos (Ministério da Saúde 2018), bem como as maiores taxas de mortalidade do país (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE 2017).

Entretanto, após longos anos consecutivos de aumento de mortalidade, 0.4% anualmente de 1975 a 1990, observou-se um decréscimo de 2.2% ao ano nessas taxas entre 1990 e 2007. Isto foi evidenciado nos países desenvolvidos, como nos Estados Unidos da América (EUA), devido ao aperfeiçoamento do tratamento e ao diagnóstico precoce (TANG 2013). Contudo, nem todos os pacientes se beneficiam desses avanços, havendo uma parte da população com câncer de mama cujo tratamento falha, evoluindo para recidivas, metástases à distância e morte (YANG et al. 2015).

As taxas de mortalidade por câncer de mama, na população brasileira, têm apresentado variações geográficas em estudos nacionais, com tendência de estabilização na região Sudeste, declínio na região Sul e aumento nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Foi observado que

essas desigualdades estão associadas tanto ao índice de desenvolvimento humano quanto ao índice de exclusão social. Outros fatores que podem estar relacionados incluem as taxas de cobertura mamográfica, o acesso aos serviços de saúde e a qualidade do tratamento oncológico (SOARES et al. 2015).

A sobrevida em países latino-americanos em geral encontra-se, em média, 20% abaixo daquela em países europeus e nos EUA (GOSS et al. 2013). Segundo dados americanos obtidos do *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program* a sobrevida relativa em 5 anos encontra-se próxima a 100 % para os tumores iniciais (estádio 1). Já para tumores com disseminação regional e à distância a sobrevida está em torno de 85% e 40%, respectivamente (HOWLADER et al. 2016). Esses dados confirmam o grande impacto do diagnóstico precoce na redução da mortalidade pelo câncer de mama.

1.1 MARCADORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CÂNCER DE MAMA

Nos últimos anos, o câncer de mama apresentou uma importante evolução no tratamento. Modalidades terapêuticas incluindo cirurgia, quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e radioterapia são indicados baseados nos chamados biomarcadores prognósticos e preditivos.

Os marcadores prognósticos podem ser definidos como os fatores identificados no momento do diagnóstico e que predizem o resultado clínico

(LEONG e ZHUANG 2011), sendo indicadores de agressividade, invasividade e disseminação de tumores e, portanto, correlacionados com a sobrevida, independente da terapia sistêmica. Estes são utilizados para selecionar pacientes de risco (TANEJA et al. 2010). Em contrapartida, os marcadores preditivos são aqueles relacionados ao grau ou extensão da resposta à terapia administrada, permitindo aos clínicos esperar resultados terapêuticos e decidir planos de tratamento futuros (LEONG e ZHUANG 2011). Claramente, alguns marcadores em câncer de mama podem ser de natureza prognóstica e preditiva.

No final da década de 1980 e durante a década de 1990, observamos um papel crescente da patologia na identificação de biomarcadores no câncer de mama. Fatores prognósticos tradicionais incluindo o status linfonodal axilar, tamanho tumoral, grau nuclear e grau histológico eram utilizados para selecionar pacientes de alto risco e que necessitariam de quimioterapia e/ou radioterapia. Com a introdução da imuno-histoquímica, o câncer de mama passou a ser estudado em nível molecular dando lugar a outros biomarcadores (Receptor de estrogênio (RE), Receptor de progesterona (RP), *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) e Ki67) conhecidos como prognósticos e preditivos e fundamentais para a decisão terapêutica nos dias atuais. Para selecionar pacientes que possam responder à terapia endócrina, tanto o RE como o RP devem ser pesquisados em todos os cânceres de mama invasivos recentemente diagnosticados. Por outro lado, para selecionar uma resposta provável a todas as formas de terapia anti-HER2 - trastuzumabe, pertuzumabe,

lapatinibe e trastuzumabe emtansine (T-DM1) - a determinação da expressão de HER2 ou do número de cópia do gene é mandatória (DUFFY et al. 2017).

Ensaio clínico randomizado e meta-análises evidenciaram que níveis elevados de Ki67 são associados com desfecho adverso em pacientes com câncer de mama. Em muitos desses estudos são relatados a imprecisão laboratorial, o uso de diferentes métodos para medir Ki67 e distintos pontos de corte para diferenciar tumores com baixas e altas concentrações desse marcador (AZAMBUJA et al. 2007; YERUSHALMI et al. 2010; PETRELLI et al. 2015). No entanto, um estudo multicêntrico realizado *pelo International Ki67 in Breast Cancer Working Group* concluiu que, realizando biópsias do centro tumoral, conseguiu-se um valor interlaboratorial mais padronizado e fidedigno quando os escores de Ki67 foram maiores ou inferiores aos escores intermediários, ou seja, <10 % ou > 20% de marcação nuclear (DOWSETT et al. 2011). Além de seu valor prognóstico, o Ki67 também foi avaliado como preditor de resposta. Foi evidenciado uma associação significativa entre altos níveis de Ki67 e resposta à quimioterapia neoadjuvante medido por resposta clínica ou patológica. No cenário da quimioterapia adjuvante, no entanto, a relação entre os níveis de Ki67 e o benefício da quimioterapia é menos clara (DENKERT et al. 2015). Com a terapia endócrina neoadjuvante, vários estudos descobriram que as modificações no Ki67, mesmo após um tratamento a curto prazo, predizem a resposta e o prognóstico do paciente (DOWSETT et al. 2005, 2007, 2011).

As metodologias mais utilizadas incluem imuno-histoquímica (que mede indiretamente a função gênica através da expressão proteica) ou da avaliação direta do número de cópias do gene por meio da hibridização *in situ* (*silver in situ hybridization-SISH*, *fluorescence in situ hybridization-FISH*, *chromogenic in situ hybridization-CISH*). Os estudos de expressão gênica em larga escala usando técnicas de microarray e *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR) apesar de menos disponíveis nos laboratórios de rotina diagnóstica trouxeram uma outra abordagem e contribuíram significativamente para o redesenho da classificação do câncer de mama (NIMIR 2017).

Nesse contexto, PEROU et al. (2000) propuseram pela primeira vez a "Classificação Molecular" do câncer de mama, dividindo-o em diferentes subgrupos de acordo com o perfil de expressão gênica em larga escala. Os tumores do tipo "Luminal" (refletindo os genes reguladores de RE e RP e genes expressos em células epiteliais luminais normais), "HER-2 positivo" (refletindo a amplificação de HER-2 e os genes mais expressos na hiperativação dessa via), "Basal" (refletindo a baixa expressão dos genes envolvidos nas vias de ativação relacionados a RE, RP e HER-2 e a alta expressão de genes usualmente expressos nas células basais e mioepiteliais normais da mama) foram os principais subgrupos identificados. O tipo luminal ainda poderia ser subdividido em pelo menos 2 subtipos: luminal A e luminal B. Um subgrupo de tipo normal foi descrito, mas a importância de identificar este subgrupo e suas consequências não são claras, pois, parece representar amostras com baixo teor de células

tumorais, apresentando predominância de componentes normais do tecido mamário. Esses subtipos moleculares têm valor prognóstico e preditivo: os cânceres de mama basais e HER2 superexpressos têm prognóstico pior, e dentro dos subtipos RE positivos, o tipo luminal B tem um prognóstico significativamente pior do que o luminal A (PEROU et al. 2000; CHEANG et al. 2008).

Além do diferente prognóstico, os subtipos moleculares também apresentam diferenças quanto à idade de apresentação dos tumores e associação com mutações germinativas. Mulheres idosas apresentam-se mais comumente com tumores receptores hormonais positivos e HER 2 negativos, tendo desfecho clínico e prognóstico melhores. Em contraste, mulheres mais jovens com câncer de mama triplo-negativo e HER 2 positivo têm um risco aumentado de recidiva dentro de 5 anos após o diagnóstico. Além disso, também se observa associação com redução da sobrevida e mais alta incidência de marcadores tumorais prognósticos desfavoráveis (KOLEČKOVÁ et al. 2017). As jovens pacientes com tumores triplo-negativo apresentam a maior frequência de mutações germinativas no gene *BRCA1* (COPSON et al. 2018).

Uma classificação em subgrupos moleculares pela imunohistoquímica utilizando poucos marcadores, consegue reproduzir, ainda que com algumas limitações, a classificação por expressão gênica, e têm sido amplamente utilizada na rotina diagnóstica. Um painel incluindo RE, RP, HER2, Ki-67 pode ser utilizado para distinguir os tumores luminais, HER2 e triplo-negativos (PRAT et al. 2015; COATES et al. 2015).

O último Consenso de *Saint Gallen* (COATES et al. 2015) apresentou uma nova classificação por imunohistoquímica dos subtipos moleculares do câncer de mama. Tumores luminais A apresentam imunoposição de RE, RP acima de 20% e Ki67 abaixo de 20%. O valor do ponto de corte de ki67 entre 20 e 29% para diferenciação entre luminal A e B ainda não foi definido adequadamente na literatura (Quadro 1).

Quadro 1 - Subtipos moleculares de câncer de mama classificados por imuno-histoquímica.

Subtipos intrínsecos	Classificação imuno-histoquímica
Luminal A	<ul style="list-style-type: none"> - RE positivo; - RP positivo \geq 20%; - HER2 negativo; - Ki67 < 20%.
Luminal B	<ul style="list-style-type: none"> - RE e/ou RP positivo; - RP < 20% ou Ki67 \geq 30%; - HER2 negativo.
Luminal B HER2 positivo	<ul style="list-style-type: none"> - RE e/ou RP positivos; - HER2 positivo
Luminal não-A e não-B	<ul style="list-style-type: none"> - RE positivo; - RP positivo \geq 20%; - HER2 negativo; - Ki67 \geq 20% e < 30%
HER2 hiperexpresso	<ul style="list-style-type: none"> - HER2 positivo (não-luminal)
Tripla negativo	<ul style="list-style-type: none"> - RE e RP ausentes, HER2 negativo

Fonte: Adaptado de COATES et al. (2015).

Cerca de 75% dos cânceres de mama são classificados como luminais (receptor hormonal positivo e HER 2 negativo) e são do tipo histológico carcinoma ductal invasivo, sendo tratados predominantemente por cirurgia, que inclui biópsia do linfonodo sentinela e terapia endócrina adjuvante, e quimioterapia adjuvante para os casos considerados de maior risco para recorrência. Felizmente, mais da metade dessas mesmas pacientes (50-60%) respondem à terapia antiestrogênica. No entanto, embora estes tumores sejam sensíveis ao bloqueio hormonal, um em cada quatro pacientes com doença local ao diagnóstico apresentará recidiva durante o seguimento (DALMAU et al. 2014).

Por outro lado, acredita-se que um subconjunto de pacientes esteja recebendo quimioterapia sem obter qualquer aumento na sobrevida. Evitar terapias adjuvantes desnecessárias e ineficazes tornou-se um importante passo no tratamento do câncer de mama. Particularmente, nas pacientes com linfonodos negativos e/ou doença hormônio responsiva é necessário identificar quais necessitariam de quimioterapia.

Em tal cenário, reconhecer um grupo de pacientes que poderá ser poupado dos efeitos colaterais da quimioterapia, bem como do supertratamento, resultará em melhora da qualidade de vida e redução dos custos. Igualmente importante é identificar também aquelas pacientes de alto risco para recorrência, as quais se beneficiarão de terapia sistêmica (DUFFY et al. 2016). Essa percepção impulsionou o desenvolvimento de ferramentas prognósticas mais personalizadas para casos iniciais de câncer de mama RE-positivo (WAZIR e KEFAH 2014).

Sendo assim, foram desenvolvidos testes genômicos, os quais conseguem prever os resultados clínicos de forma mais precisa do que os tradicionais fatores clínico-patológicos ou a classificação por imunohistoquímica. Os principais testes de assinaturas genéticas em câncer de mama são Oncotype DX Breast Recurrence Score Assay (Genomic Health, Inc., Redwood City, EUA), MammaPrint® (Agendia BV, Amsterdã, Holanda), Prosigna® (PAM50; NanoString Technologies Inc, Seattle, EUA), e EndoPredict® (Myriad Genetics Inc, Salt Lake City, EUA) (SCHMIDT et al. 2016). Dentre todos, destacam-se o Oncotype Dx e o MammaPrint® como os testes mais bem validados. O Oncotype DX utiliza RT-PCR para avaliar a expressão de 21 genes e, assim, calcular um risco de recorrência conhecido como recurrence score (RS). O RS divide as pacientes em três grupos, indicando riscos diferentes de recorrência de câncer de mama: baixo risco (<18), risco intermediário (18-30) e alto risco (>30). MammaPrint® utiliza um microarray para avaliar o nível de expressão de 70 genes envolvidos com câncer de mama e separa as pacientes em dois grupos: alto e baixo risco de recorrência. Ambos os testes apresentam importantes utilidades em câncer de mama, pois podem prever a probabilidade da doença recidivar e, assim, identificar pacientes de alto risco que se beneficiariam de quimioterapia adjuvante adicional à hormonioterapia. Os resultados de *trials* prospectivos randomizados evidenciaram que o uso dos testes de multigenes podem modificar o manejo das pacientes com câncer de mama. Fornecendo alto nível de evidência, conseguem reduzir a administração de quimioterapia adjuvante para pacientes consideradas de alto risco por critérios clínicos-

patológicos, sem negativamente impactar os resultados (NICOLINI et al. 2017).

Apesar da disponibilidade dos testes genômicos, os fatores prognósticos tradicionais, como metástase linfonodal, tamanho tumoral, grau tumoral e idade, continuam sendo mandatórios para auxiliar na escolha da terapia das pacientes com cânceres de mama recentemente diagnosticados (NICOLINI et al. 2017). O Quadro 2 resume os principais biomarcadores preditivos e prognósticos utilizados atualmente para decidir terapias.

Portanto, atualmente, o maior desafio é conseguir personalizar o tratamento, oferecendo combinações mais poderosas a pacientes portadoras de tumores agressivos, mas na mesma importância evitar modalidades terapêuticas agressivas em pacientes portadoras de tumores muito indolentes, principalmente nas mulheres idosas.

Quadro 2 - Biomarcadores prognósticos e preditivos para decisão de terapias em câncer de mama.

Biomarcador	Mau Prognóstico	Bom prognóstico	Terapia com predição de resposta
Linfonodos axilares	Positivos	Negativos	NA
Tamanho tumoral	>2,0 cm	<_2,0 cm	NA
Grau tumoral	Grau 2-3	Grau 1	NA
RH	Negativo	Positivo	Terapia antiestrogênica
Ki67	>20%	<10%	NA
HER 2	Positivo	Negativo	Terapias anti-HER 2
Oncotype DX	>30 (alto risco)	<18 (baixo risco)	Alto risco—quimioterapia adjuvante adicional à hormonioterapia Baixo risco—hormonioterapia adjuvante
Mammaprint	Alto risco	Baixo risco	Alto risco-quimioterapia adjuvante adicional à hormonioterapia Baixo risco-hormonioterapia adjuvante

NA: não aplicável.

Fonte: Adaptado de NICOLINI et al. (2017).

1.2 LINFONODO SENTINELA

O status dos linfonodos axilares é o principal fator correlacionado com a sobrevida global em pacientes com câncer de mama, influenciando diretamente o prognóstico e o tratamento (LIU et al. 2017). Representa um indicador importante da gravidade da doença, independentemente do

tamanho do tumor, do status dos receptores hormonais e HER 2. Quanto maior o número de linfonodos axilares comprometidos por câncer de mama, maior será o risco de recorrência e de um pior desfecho clínico, estando a quimioterapia e radioterapia adjuvantes fortemente recomendadas (WEN et al. 2017).

Embora haja associação entre algumas características anatomopatológicas, como grau tumoral e a presença de invasão linfovascular, com metástases em linfonodos axilares, o impacto dos subtipos moleculares no acometimento axilar pode não ter relação direta (LIU et al. 2017). Sendo assim, podemos ter tumores pequenos com biologia tumoral mais agressiva, apresentando metástases axilares. Entretanto, muitos estudos sugerem que o câncer de mama triplo-negativo, considerado o subtipo de pior prognóstico, apresenta-se com menos envolvimento linfonodal. Acredita-se que tal fato ocorra devido à disseminação hematogênica evidenciada por esses tumores, causando menor frequência de metástases axilares (CRABB et al. 2008). Já para os tumores triplo positivos e HER2 são evidenciadas as maiores incidências de comprometimento linfonodal axilar. Por último, os cânceres de subtipo luminal A são os que têm o menor risco de metástases axilares (HOWLAND et al. 2013). Em contrapartida, quando um tumor de subtipo triplo-negativo apresenta-se com envolvimento linfonodal axilar a sobrevida torna-se ainda mais reduzida. Já os tumores de subtipos luminais, mesmo com acometimento linfonodal, apresentam boas taxas de sobrevida quando comparado com triplo-negativo e HER2. Isso demonstra que muitas vezes o

status linfonodal para alguns tipos de tumores podem não ter tanta importância e para outros, apresenta grande impacto no prognóstico (ZAHA et al. 2010).

Dados americanos indicam que o câncer restrito somente à mama apresenta sobrevida relativa em 5 anos de 99%. Já a disseminação para os linfonodos regionais tende a baixar a sobrevida para 85% (HOWLADER et al. 2016). Quando analisamos a sobrevida global em 5 anos na população brasileira, mulheres com tumores com doença localizada e confinada à mama apresentaram sobrevida global em cinco anos de 84,1%. As pacientes com comprometimento linfonodal apresentaram sobrevida global em dez anos de 58%, ao passo que aquelas com axilas livres, a sobrevida global foi de 77% (FREITAS JÚNIOR et al. 2017). Por esse importante impacto na sobrevida, acreditava-se na década de 80 que a remoção cirúrgica da cadeia de linfonodos, independente do estadiamento tumoral ao diagnóstico, era o tratamento padrão do câncer de mama. A morbidade e as sequelas do esvaziamento axilar eram significativas, tendo como principais complicações tardias, o linfedema, a parestesia, a dor crônica e a limitação na amplitude de movimento. Entretanto, cada vez mais, os tumores têm sido diagnosticados em estágios iniciais, os quais se apresentam com axila clinicamente negativa, permitindo que hoje a maioria das pacientes sejam tratadas com cirurgias mais conservadoras com ou sem esvaziamento axilar, a depender do status dos linfonodos sentinelas e do tratamento cirúrgico da mama (MORAIS 2014).

Baseado no princípio da drenagem linfática sequencial da mama, o linfonodo sentinela é considerado aquele que primeiro recebe a drenagem linfática do tumor e, portanto, o que apresenta maior probabilidade de acometimento metastático (BEVILACQUA et al. 2007). O *status* do linfonodo sentinela é um bom preditor do *status* da axila como um todo e o melhor método de estudo do linfonodo sentinela é a avaliação histológica detalhada. Assim, nas pacientes com axila negativa no estadiamento clínico pré-operatório, está indicado realizar a biópsia de linfonodo sentinela (BLS). O esvaziamento axilar poderá ou não ser realizado nos casos em que o linfonodo sentinela estiver comprometido por células neoplásicas (VERONESI et al. 2010).

GIULIANO et al. (1994) publicaram o estudo original a respeito da viabilidade e acurácia da BLS intraoperatória em câncer de mama, sinalizando que era possível evitar o sobretratamento em determinado grupo de pacientes. Desde então a técnica vem sendo consolidada como tratamento padrão em tumores iniciais.

A literatura acumulada em estudos que somam mais de 6000 casos de linfonodo sentinela mostra uma técnica com alto valor preditivo positivo (100%) e negativo (96-98%) para o estabelecimento do status linfonodal da axila, com taxas de falsos negativos que variam de 5-11%, explicados tanto pela falha na identificação do linfonodo sentinela, quanto pela metástase para um linfonodo não sentinela com linfonodo sentinela livre de doença. De qualquer forma, os índices de recorrência axilar são bem menores, entre 0 e 4.5%, mostrando que nem toda doença axilar se manifesta clinicamente ou

interfere na sobrevida das pacientes. (Krag et al. 2004; Weaver et al. 2000; Gill et al. 2009; Veronesi et al. 2010).

O *American College of Surgeons Oncology Group* (ACOSOG) realizou um estudo prospectivo randomizado, intitulado ACOSOG Z0011 que randomizou pacientes candidatas à cirurgia conservadora da mama para realizar a BLS exclusiva versus BLS seguido de esvaziamento axilar. Após a publicação dos primeiros resultados do ACOSOG Z0011 e de sua última atualização apresentada na *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) em 2016, a supressão do esvaziamento axilar em pacientes com câncer de mama submetidas à BLS tem sido recomendada para até um ou dois linfonodos sentinela metastáticos, tumores T1N0 e T2N0 tratados com cirurgia conservadora, irradiação da mama e terapia sistêmica no pós-operatório.

No seguimento de 10 anos, ACOSOG Z0011 demonstrou não haver diferença significativa na sobrevida livre de doença, sobrevida global e taxas de falha loco-regionais entre os pacientes randomizados para dissecação axilar completa contra biópsia linfonodo sentinela exclusiva (a incidência de recorrência nos dois grupos foi menor do que 1 %, sem diferença estatisticamente significativa). Contudo, seus resultados mostraram que 27% das pacientes no braço da dissecação axilar tinham metástases nodais adicionais identificadas na avaliação histopatológica do conteúdo axilar, indicando que uma considerável quantidade de doença permanecia na axila. Neste grupo de pacientes, os pesquisadores afirmam que a remoção dos linfonodos não envolvidos não irá guiar a terapia adjuvante e a doença

residual pode ser erradicada com quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia, não expondo o paciente ao risco de linfedema e suas complicações associadas (GIULIANO et al. 2011, 2016).

Então, por que a maioria das pacientes com linfonodos axilares não-sentinelas metastáticos não desenvolveram doença clinicamente detectável (recidiva regional) no braço sem a dissecação axilar completa? GIULIANO et al. (2011) afirmam que essa resposta estaria na radioterapia oferecida para toda a mama, a qual também abrangeria os primeiros níveis da axila. Ainda que o esvaziamento não seja realizado, a técnica do linfonodo sentinela está indicada para fins de estadiamento e indicação de terapias sistêmicas.

Outro estudo importante como o IBCSG 23-01 apresentado na Conferência de San Antonio-TX, EUA em 2011, não mostrou benefício na dissecação axilar quando o linfonodo sentinela era minimamente envolvido (micrometástase, depósitos neoplásicos 0,2 mm e 2 mm). As pacientes que realizaram mastectomia (25% dos casos) não receberam radioterapia. As sobrevidas livre de doença e global foram semelhantes em ambos os grupos (GALIMBERTI et al. 2013).

Em 2001 foi iniciado o ensaio AMAROS, um estudo de não inferioridade, tendo como objetivo a comparação entre radioterapia (RT) axilar e dissecação axilar após linfonodo sentinela positivo. Esse estudo incluiu também pacientes tratadas cirurgicamente com mastectomia e quadrantectomia. Foi encontrado menos linfedema no grupo da RT, porém as taxas de recidiva local foram similares entre os grupos (RUTGERS et al. 2014).

Está em curso no Instituto europeu de Oncologia, o SOUND trial que pretende avaliar se a BLS pode ser evitada em mulheres mais velhas, tumores pequenos com axila clinicamente e ecograficamente negativa e se a escolha de terapia adjuvante pode ser feita mediante a biologia do tumor sem a informação do estadiamento patológico axilar (GENTILINI e VERONESI 2012).

O último consenso publicado após a *14th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel* e o último *guideline* da ASCO recomendam a omissão do esvaziamento axilar (EA) no caso de BLS com micrometástases e admitem não haver benefício no EA nos doentes que cumpram os critérios de inclusão do ensaio ACOSOG Z0011 (COATES et al. 2015; LYMAN et al. 2017). As mulheres com câncer de mama operáveis e tumores multicêntricos, as com carcinoma ductal in situ que se submeterão à mastectomia, as que se submeteram à cirurgias prévias de mama e/ou axila, ou àquelas que receberam terapia sistêmica neoadjuvante podem ser submetidas à BLS (LYMAN et al. 2017).

Gul Alco não compartilha das explicações quanto aos achados do ACOSOG Z0011, pois mesmo utilizando campos tangencias mais altos para o tratamento radioterápico, não irá abranger toda a axila (95% dos níveis I e II receberam uma dose média de 16,8 Gy e 11,6 Gy, respectivamente), além disso, esta dose está muito distante do recomendado para o tratamento de metástase axilar (ALCO et al. 2010). A dose para tratamento da axila seria de 50-50,4 Gy, administrada em frações de 1,8-2,0 Gy (com ou sem a realização de reforço na cicatriz, com 2 Gy por fração, numa dose total de

aproximadamente 60 Gy) (National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2017).

Em segundo lugar, como proposto por Giuliano e pelo próprio Alco, há fatores biológicos relacionados à progressão da doença axilar que ainda não estão totalmente conhecidos. O estudo ACOSOG Z0011 na época de sua primeira publicação sofreu muitas críticas, pois se atribuía que a maioria das pacientes apresentava prognóstico favorável representado por tumores luminais e mulheres idosas. Outros grandes centros reproduziram o estudo em seus serviços, realizando uma validação do mesmo. Destacamos um estudo prospectivo realizado no *Memorial* de Nova York com 793 pacientes elegíveis para o Z0011 que realizaram BLS exclusiva. O esvaziamento axilar foi indicado para metástases em ≥ 3 LS ou LS com extravasamento extracapsular (130 pacientes). Exames de imagem axilar não foram realizados de rotina. Em 484 pacientes com BLS exclusiva e com campos de RT conhecidos (103 prono, 280 supino tangente e 101 mama e linfonodos) e seguimento ≥ 12 meses, a taxa de recorrência linfonodal em 5 anos foi de 1% e não diferiu significativamente por campos de RT. A sobrevida livre de eventos em cinco anos após BLS exclusiva foi de 93% e sem recorrências axilares isoladas. Dados relevantes do estudo são: 1 – a indicação do EA não variou com base na idade, RE, RP ou status de HER2, 2 – exames de imagem pré-operatórias não são indicados de rotina para avaliar o status axilar e 3 - uso rotineiro de RT nodal não interferiu no controle local (MORROW et al. 2017).

As orientações da ASCO de 2005, ratificadas na última atualização de 2016 recomendam não realizar a BLS para: tumores grandes e localmente avançados (T3/T4); câncer de mama inflamatório (T4D); CDIS (Carcinoma ductal in situ) quando programado a cirurgia conservadora e gravidez. (LYMAN et al. 2005, 2017).

Portanto, o tratamento da axila foi um dos que mais sofreu mudanças, chegando ao estágio de conservação do conteúdo axilar mesmo nos casos de linfonodo sentinela positivo. Sendo assim, a biópsia do linfonodo sentinela ganhou cada vez mais força e o seu papel no tratamento do câncer de mama tornou-se diagnóstico e terapêutico para a maioria dos casos. Porém, a preocupação de que outros fatores biológicos do tumor e, não apenas as variáveis clinico-patológicas pudessem interferir no comportamento tumoral e progressão do câncer de mama, fez surgir novas linhas de pesquisa, como a imunoterapia.

Mesmo após esta publicação de grande impacto, alguns centros continuam a defender a dissecação axilar completa quando o linfonodo sentinela é positivo nos casos de pacientes submetidas à mastectomia, devido ainda ao pouco número de trabalhos suprimindo o EA em pacientes tratadas com esse tipo de cirurgia. Dada a relutância da maioria dos cirurgiões de deixar doença residual na axila, um meio confiável de prever a probabilidade de envolvimento dos linfonodos não-sentinelas será um passo para aperfeiçoar a indicação da dissecação axilar completa (TAN et al. 2011). Nesse contexto, é necessário que se estabeleçam novos critérios de

predição de acometimento axilar, os quais poderão ser utilizados juntamente com os fatores anatomopatológicos já padronizados.

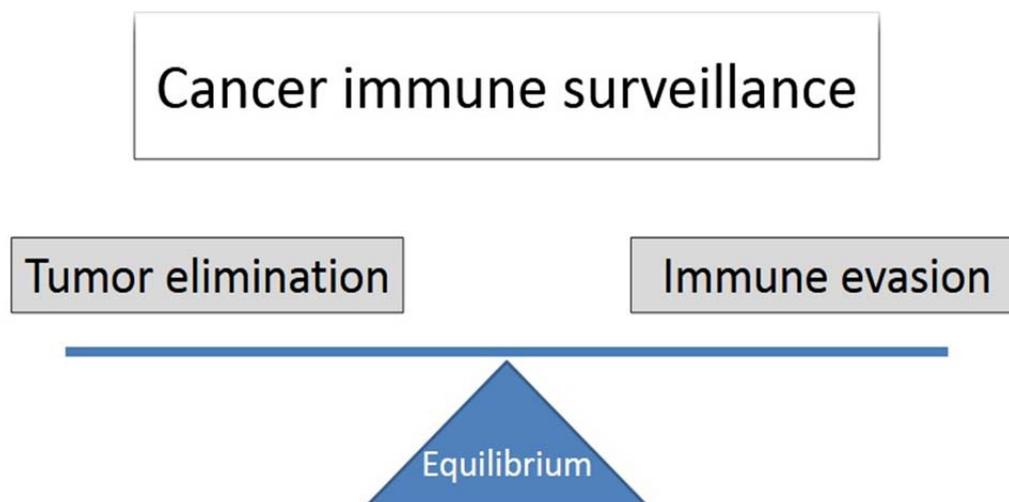
1.3 SISTEMA IMUNE E INFLAMAÇÃO EM CÂNCER DE MAMA

Inflamação é uma característica bem estabelecida do câncer, tanto que condições inflamatórias crônicas são reconhecidas por aumentar o risco de câncer (LIJIMA et al. 2011). Com a progressão do câncer, ocorre uma resposta do sistema imune, promovendo crescimento tumoral ou mediando a erradicação da doença. De acordo com a teoria da imunoedição do câncer, as variantes tumorais capazes de sobreviver à vigilância do sistema imune são selecionadas através da evolução genética, enquanto aquelas que não conseguem sobreviver são erradicadas (CIMINO-MATHEWS et al. 2015).

A interação entre o sistema imune e o tumor ocorre em três fases: eliminação, equilíbrio e escape (Figura 1). Na fase de eliminação ocorre uma resposta inflamatória aguda desencadeada pelo recrutamento de células do sistema imune inato (macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* entre outras) para o microambiente tumoral gerando remodelação do estroma e angiogênese, bem como a produção de citocinas inibidoras dos tumores (SCHREIBER et al. 2011; VESELY et al. 2011). Essas citocinas pró-inflamatórias (na sua maioria interleucina-12 e interferon- γ) promovem mais ativação do sistema imune inato, levando a morte celular tumoral. Ainda nessa fase, células dendríticas maduras, também conhecidas como

células apresentadoras de antígenos, metabolizam os antígenos associados ao tumor e os apresentam ao nível dos linfonodos de drenagem tumoral para as células T *Helper*, onde ocorre a ativação das células T CD4+ e CD8+. As células T ativadas promovem a morte celular tumoral. Sendo assim, pode ocorrer a completa erradicação do tumor ou a evolução de variantes celulares tumorais que escapam da resposta imune e estabelecem tumores mensuráveis (CIMINO-MATHEWS et al. 2015). Durante a fase de equilíbrio, a inflamação aguda dá lugar à crônica, levando ao completo escape tumoral da vigilância do sistema imune. A fase de escape é sustentada pela inflamação crônica que promove uma completa autonomia tumoral do sistema imune de vigilância, levando ao crescimento e metástase do câncer, que envolve principalmente células imunossupressoras e associadas ao tumor (macrófagos, células T regulatórias –Tregs, células supressoras mielóides, linfócitos B ativados e fibroblastos) e fatores solúveis (SCHREIBER et al. 2011).

Os principais mecanismos que promovem o crescimento tumoral incluem a inibição das células antígeno-específicas tumorais pelas células Tregs intratumorais, uma mudança da resposta imune antitumorigênica T *helper* tipo 1 (TH1) para pró-tumorigênica T *helper* tipo 2 (TH2) e a produção de fatores solúveis os quais promovem a remodelação estromal (EMENS et al. 2012). A capacidade de evadir a destruição imune recentemente foi reconhecida como uma característica do câncer (JIANG et al. 2014).



Fonte: CIMINO-MATHEWS et al. (2016)

Figura 1 - Imunoedição do câncer de mama

1.4 MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente do câncer de mama pode ser considerado nos níveis local (intratumoral), regional (mama) e distante (metastático), cada qual englobando múltiplos tipos de células como fibroblastos, macrófagos, linfócitos, adipócitos, células mioepiteliais e endoteliais. Também observamos a existência de componentes da matriz extracelular, fatores solúveis (citocinas, hormônios, fatores de crescimento e enzimas) e propriedades físicas (por exemplo, pH e conteúdo de oxigênio) (SOYSAL et al. 2015). Em suma, o microambiente tumoral é composto por células e proteínas por elas expressas e secretadas (CIMINO-MATHEWS et al. 2015). Durante a última década, tornou-se amplamente aceito que as células do tumor dependem de sinais do seu próprio microambiente, a fim de proliferar e sobreviver dentro de um tecido e que modificações epigenéticas das

células estromais podem comandar essa cascata de sinalizações (RUDNICK et al. 2012).

Tal conhecimento é apoiado pela detecção de alterações significativas nos padrões de metilação do DNA das células estromais no câncer de mama. Uma proporção significativa desses genes metilados codifica fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento e a diferenciação (FIEGL et al. 2006). Em estudo realizado por DIREKZE et al. (2004) foi proposto que os miofibroblastos e fibroblastos associados ao tumor (TAF - do inglês *tumor-associated fibroblasts*) se desenvolvem a partir de *stem cells* derivadas da medula óssea que são especificamente recrutadas para o microambiente dos tumores em desenvolvimento e suas mudanças epigenéticas podem ser diretamente induzidas por fatores produzidos pelos tumores. Assim, os tumores são participantes ativos em moldar seu microambiente e garantir condições favoráveis.

Além disso, muitas investigações sugerem que as células estromais desempenham um importante papel na iniciação, progressão e metástase tumoral através da produção de citocinas e fatores de crescimento. Portanto, as células tumorais e estromais agem de maneira recíproca dentro do microambiente tumoral do câncer de mama (Figura 2) (MAO et al. 2013). Essas mudanças no estroma podem prever a sobrevida do paciente e se correlacionar com subtipos distintos de tumores de mama. Sendo assim, o microambiente tumoral é um elemento crítico para o desenvolvimento e progressão do câncer de mama, bem como suas células são um parâmetro mensurável de resposta ao tratamento (SOYSAL et al. 2015).

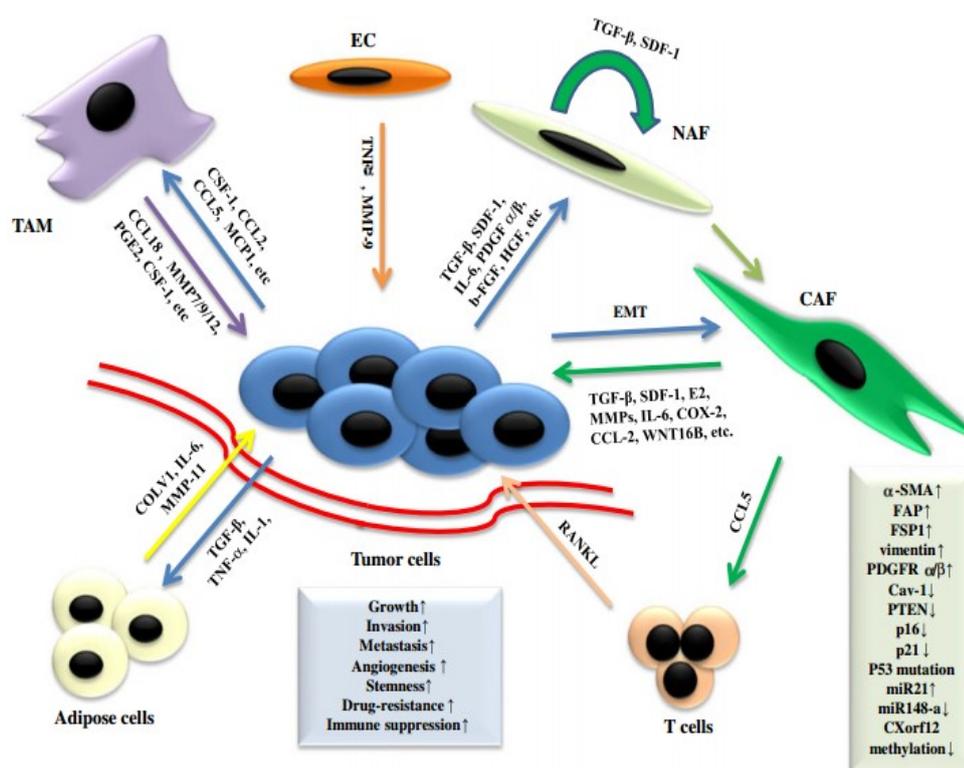
Como células importantes do microambiente tumoral destacamos os TAF (do inglês *tumour associated fibroblast*), TIL (do inglês *tumour-infiltrating lymphocytes*) e TAM (do inglês *tumour associated macrophages*), considerados os principais componentes celulares do estroma de muitos tumores sólidos. Estas desempenham um papel crucial dentro do microambiente, sendo responsáveis por importantes alterações inflamatórias. Os TAF fornecem muitos mediadores inflamatórios, incluindo uma variedade de citocinas, fatores de crescimento, metaloproteinases da matriz e outros componentes da matriz extracelular (MEC). Sua função é auxiliar na mobilização das células inflamatórias (LIJIMA et al. 2011).

Em 1949, a relação entre TIL e prognóstico foi reportada em câncer de mama e desde então um grande número de estudos sobre essas células têm sido publicado. O componente predominante de TIL em tumores sólidos é composto de células T CD3+, as quais são subclassificadas em células T citotóxicas CD8+, células T helper CD4+ e células T regulatórias CD4+ (Tregs). As células T helper CD4+ apresentam um papel importante na resposta imune tumoral, que dependendo da citocina secretada por essas células, podem apresentar uma resposta TH1 ou TH2, voltada para uma resposta imune celular ou imune humoral, respectivamente (MATSUMOTO et al. 2015).

Por sua vez, os TAM constituem até 50% da massa tumoral do câncer de mama, sendo vitais na resposta imune inata. Sua linhagem compreende um sistema celular muito diverso em relação às propriedades fenotípicas e funcionais (MUKHTAR et al. 2011). Recentemente diversas pesquisas foram

publicadas avaliando a relação de TIL e TAM em tumores de mama triplo-negativos. Os resultados evidenciaram que tais células parecem apresentar papéis opostos. Altos níveis de TIL (células T CD8+) podem estar associados a um melhor prognóstico, enquanto altos níveis de TAM relacionam-se com pior sobrevida (MATSUMOTO et al. 2015).

Além das células estromais, o microambiente tumoral apresenta um importante componente que é a MEC. Um *turnover* de componentes da MEC é frequentemente detectado em cânceres, particularmente em condições inflamatórias, sendo considerado um reservatório para citocinas e fatores de crescimento. Além disso, certas moléculas da MEC podem atuar indiretamente induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios. A degradação dos componentes da MEC dá origem a fragmentos bioativos que desempenham papéis fundamentais no controle de inúmeros eventos, incluindo remodelação tecidual, inflamação, angiogênese, crescimento tumoral e metástase, atuando como quimioatrativos para células inflamatórias (LIJIMA et al. 2011).



Fonte: MAO et al. (2013).

Figura 2 - Representação esquemática mostrando o papel das células estromais no microambiente tumoral e a progressão do câncer de mama. As células estromais promovem crescimento tumoral, invasão e metástase, secretando citocinas, quimiocinas e outros fatores de crescimento. Além disso, as células tumorais também afetam o fenótipo das células do estroma. SDF-1: fator derivado do estroma; TNF- α : fator de necrose tumoral; TGF- β : fator de crescimento transformador beta; NF- κ B: fator nuclear κ B; MMP-7,9,11: metaloproteinase da matriz-7,9,11; α -SMA: actina do músculo liso alfa; FAP: proteína de ativação de fibroblastos; FSP-1, proteína específica de fibroblastos-1; PDGFR- α / β : fator de crescimento derivado de plaquetas- α / β ; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; Cav-1:caveolina-1; IL-1,4,6,10,13: interleucina -1,4,6,10,13; E2: estrona-2; CCL2, 5, 18: ligante de quimiocina 2, 5, 18; RANKL: ligando do fator nuclear- κ B (RANK); CSF-1, fator estimulador de colônia-1; COLVI: colágeno VI; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; HGF: fator de crescimento de hepatócitos.

1.5 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR (TAM)

Os macrófagos derivam da linhagem celular mielóide e compõe o sistema fagocítico mononuclear (OBEID et al. 2013). Representam a

primeira linha de defesa contra patógenos e apresentam várias funções no sistema imune inato (NEYEN et al. 2013). São células cuja superfície é composta por receptores de membrana que são capazes de reconhecer ligantes cognatos expressados na superfície de agentes infecciosos e de células apoptóticas. Esses receptores incluem imunoglobulinas e receptores de complemento (CR3, CR4), *Toll like receptors*, integrinas (CD11b), receptores de citocinas (IL-4), receptores de quimiocinas, entre outros (GORDON et al. 2005). Além de sua função de reconhecimento, esses receptores facilitam a fagocitose, ativação, diferenciação, migração e adesão dos macrófagos, contribuindo para a homeostase e defesa do hospedeiro. Os monócitos evadem da medula óssea e ganham a circulação sanguínea, sendo ativados após o contato com agentes nocivos ao organismo, diferenciando-se em macrófagos maduros e adquirindo a capacidade de realizar uma espécie de limpeza dos debris celulares e de células tumorais, através da fagocitose (GORDON et al. 2005).

Os monócitos atraídos por substâncias quimiotáticas, aderem a parede dos vasos sanguíneos e atravessam a barreira celular endotelial, indo migrar para o sítio inflamatório (RHEE 2016). Somente quando entram no tecido se diferenciam em macrófagos e apresentam diferentes funções baseados no sinal emitido pelo microambiente (OBEID et al. 2013). Os macrófagos residentes no sítio inflamatório respondem aos sinais emitidos pelo microambiente e produzem citocinas inflamatórias que permitem a célula endotelial tornar-se mais aderente para facilitar o recrutamento das células inflamatórias ao local (RHEE 2016). Por exemplo, durante uma

infecção bacteriana, os macrófagos primeiramente desencadeiam uma resposta inflamatória aguda ao eliminar o patógeno invasor. Posteriormente, fagocitam e destroem os debris celulares e, por último, eles ativam a fase proliferativa de cicatrização ao liberar fatores de crescimento e citocinas os quais recrutam e ativam os fibroblastos, polimorfonucleares e linfócitos e promovem angiogênese (ALLAVENA e MANTOVANI 2012).

Essas células são dotadas de uma plasticidade a qual lhes permitem a mudança de seu fenótipo de acordo com os sinais do microambiente tumoral. Sendo assim, podem agir como imunoestimulatórios ou imunossupressivos, ora promovendo ou contendo a inflamação (ALLAVENA e MANTOVANI 2012).

De acordo com as diferentes vias de ativação, macrófagos podem ser classificados e polarizados em dois grupos: macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos alternativamente ativados (M2) (CASSETTA et al. 2011). Foi proposta uma subclassificação por MANTOVANI et al. em 2004 para os macrófagos M2 de acordo com o estímulo recebido, o qual os divide em M2a, M2b e M2c. Vários fatores causadores de estresse no microambiente tumoral, tal como hipóxia, baixo pH e alta concentração de lactato, direcionam a transformação dos TAM para um fenótipo pró-angiogênico (CH'NG et al. 2013). Os macrófagos M1 têm atividade antitumoral, realizando o reconhecimento de células cancerosas e as destruindo por fagocitose e citotoxicidade (CHOI et al. 2018). São caracterizados pela alta expressão de fatores pró-inflamatórios: Interleucina (IL)-12, IL-23, óxido nítrico sintetase 2, Fator de necrose tumoral α (TNF-

inglês *tumoral necrosis factor*) e alta atividade tumoricida (supressão tumoral). Interferon gama (INF) estimula o macrófago causando uma hiperexpressão de *toll like receptors* (TLRs) que, então, na presença de patógenos ou de seus produtos, tornam-se macrófagos ativados e adquirem o fenótipo M1, secretando citocinas, particularmente IL-12 e IL-23, as quais são produzidas em alta quantidade (OBEID et al. 2013). Expressam também altos níveis de CD86, CD40 e PDL-1 (ZHAO et al. 2017). Macrófagos M1 podem polarizar para outro tipo de macrófago sob a influência de certos estímulos ambientais, tais como nos casos onde ocorre progressão do câncer, numa tentativa de eliminar as células tumorais do microambiente alterado (RAI et al. 2012; JOSHI et al. 2014).

Por sua vez, os macrófagos M2 geralmente promovem crescimento tumoral e metástases e produzem altos níveis de citocinas anti-inflamatórias: (IL)10, TGF- β (do inglês *transforming growth factor*) (TANG 2013). Também promovem o crescimento do tumor através da produção de fatores angiogênicos (VEGF- fator de crescimento vascular endotelial) (ZHAO et al. 2017), fatores de degradação do estroma e supressão de respostas imunes antitumorais (progressão tumoral) (MUKHTAR et al. 2011). Macrófagos M2 são ativados por outras citocinas ou por complexos imunes que induzem a uma resposta T helper tipo 2 (M2a e M2b) e T helper tipo 1 (M2c) (OBEID et al. 2013). A diferenciação para macrófagos M2a é induzida pela exposição a IL-4 e IL-13. Esses macrófagos são conhecidos por serem pró-fibróticos e expressam altos níveis de moléculas de superfície IL-4R, CD163, CD206, CD209 (NELSON et al. 2012) e arginase-1 (ZHAO et al. 2017). M2b são

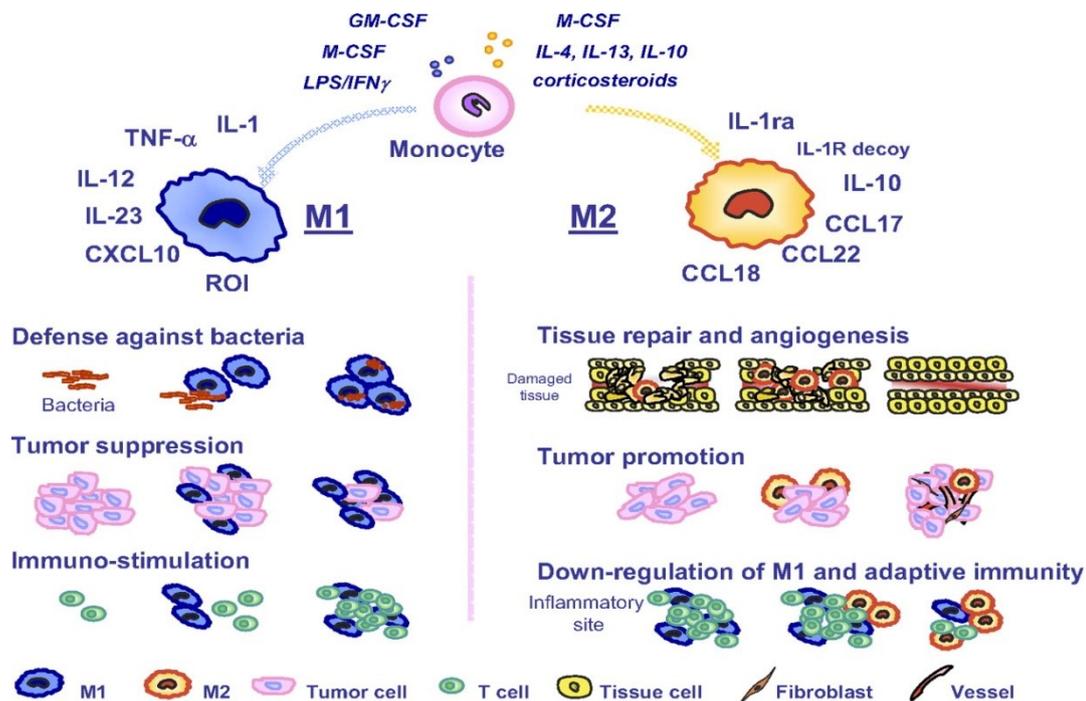
diferenciados pelos ligantes de TLRs e complexos imunes (OHAMA et al. 2015). M2c representam macrófagos ativados pela IL-10 e hormônios glucocorticóides sendo, em geral, responsáveis por suprimir a inflamação (OBEID et al. 2013), também conhecidos por serem envolvidos no reparo tecidual e remodelação da matriz. (RHEE 2016).

Alguns tumores exibem ambos os tipos de macrófagos, dependendo das condições fisiológicas e patológicas, bem como do microambiente tumoral (TANG 2013). Então como os TAM podem ser pró-tumorais ou antitumorais, pode-se dizer que a polarização determinará a sua função e não há relatos de que o fenótipo polarizado estará expresso simultaneamente em uma população de macrófagos (ALLAVENA et al. 2008). Porém, a maioria dos estudos afirma que TAM em câncer de mama e em outros tumores sólidos são primariamente uma subpopulação com fenótipo M2, pois a quantidade de macrófagos M2 é comparativamente mais alta do que M1 (CHEN et al. 2011), bem como o nível de IL-10 (citocina produzida por macrófagos M2) (WEIGERT et al. 2009).

Um dos mecanismos reportados que podem induzir essa natureza M2-like dos TAM seria a secreção de substâncias químicas pela célula tumoral mamária, especialmente o tumor de fenótipo basal é um indutor do fenótipo M2 nos macrófagos. Outro mecanismo sugerido é a regulação por mi-RNA. O miR146a é reportado como indutor do fenótipo M2.

Entretanto, há dados de outras pesquisas evidenciando que genes M1 associados são expressos mais frequentemente em câncer de mama. O que se sabe é que vários subgrupos de TAM estão presentes em câncer de

mama (CHOI et al. 2018). A diminuição do número de TAM ou aumento da polarização M1 permite a destruição de células cancerosas ou impede o crescimento tumoral (RHEE 2016). Em câncer de mama, TAM de fenótipo M2 ao promover angiogênese, promove a remodelação da matriz extracelular e habilita as células tumorais para intravasarem no sangue periférico. Além disso, comunicando e cooperando com as células tumorais mamárias, TAM de fenótipo M2 também migram pela circulação periférica por intravazamento através das barreiras capilares intratumorais. Sendo assim, monócitos com fenótipo M2 circulantes podem ser considerados um subconjunto de TAM que derivam do tecido tumoral mamário, os quais podem facilitar a metástase do câncer de mama (ROUSSOS et al. 2011; ADAMS et al. 2014). A Figura 3 sumariza a polarização dos macrófagos.



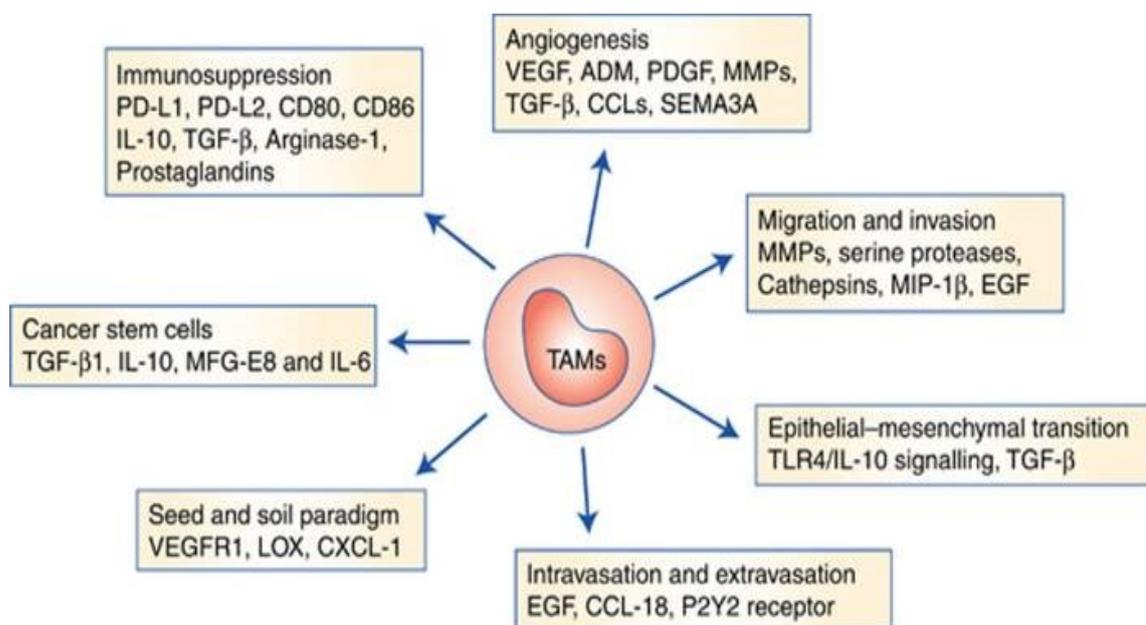
Fonte: SOLINAS et al. (2009)

Figura 3 - Polarização dos macrófagos. Macrófagos constituem uma população heterogênea, que pode ser dividida em duas classes principais: M1 e M2. Monócitos sanguíneos diferenciando-se na presença de LPS / IFN- γ amadurecem em células M1 polarizadas (macrófagos classicamente ativados). Produzem níveis elevados de IL-12, IL-1, IL-23, TNF- α e CXCL10 e são caracterizados pela atividade citotóxica contra microrganismos e células neoplásicas, expressão de altos níveis de ROI e capacidade de APCs. Por outro lado, quando os monócitos se diferenciam na presença de IL-4, IL-13, IL-10 ou corticosteróides, eles amadurecem em macrófagos M2 (alternativamente ativados, que secretam IL-10, CCL17, CCL22, CCL18, IL-10). Macrófagos M2 promovem a eliminação de detritos, angiogênese, remodelação e reparo de tecidos danificados. LPS / IFN- γ : Lipopolissacarídeos/fator de necrose tumoral gama; IL-12-1-23-4-13-10: interleucina 12-1-23-4-13-10; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa e CXCL10: ligante CXL; ROI: intermediários reativos de oxigênio;APCs: células apresentadoras de antígenos; CCL17-22-18: ligante de quimiocina 17-22-18.

Trabalhos em modelos animais afirmaram que as células tumorais do câncer de mama produzem CSF-1 (do inglês colony stimulantig factor) e CCL2, dois principais fatores de crescimento para os TAM. O CSF atrai os macrófagos para o sítio tumoral e por ação autócrina, estimulam a produção de mais CSF pelas células tumorais. Essa habilidade em produzir CSF resulta em aumento na capacidade invasiva do tumor, além de promover a produção de VEGF e o desenvolvimento de uma rede vascular de alta densidade, a qual facilita o crescimento e disseminação tumoral. Os animais com falta de CSF-1 e áreas tumorais com depleção de macrófagos têm atraso na angiogênese e conseqüentemente menos metástases. O microambiente tumoral podem conter CCL2, uma quimiocina produzida pelo tumor que também recruta macrófagos. Os macrófagos M2 produzem essa quimiocina, cujos níveis elevados estão associados a um pior prognóstico. Também se observa uma associação entre câncer de mama de alto risco (com risco aumentado para metástase) e TAM, sugerindo que nem todos os tumores têm a capacidade para atrair e polarizar os macrófagos. (MUKHTAR et al. 2011). Outra característica dos TAM é a sua capacidade de produzir metaloproteinases as quais regulam a digestão da matriz extracelular e por isso favorecem a invasão tumoral e metástase (CH'NG et al. 2013).

TAM favorecem a invasão da célula tumoral por secretar metaloproteinases que degradam a matriz extracelular e estimulam a angiogênese e vascularização tumoral através da secreção de vários fatores pró-angiogênicos e suprime a função antitumoral das células T

citotóxicas. A Figura 4 sintetiza os principais eventos relacionados com a progressão do câncer de mama relacionada com os TAM, bem como os mediadores inflamatórios envolvidos em cada evento.



Fonte: ARAS e ZAIDI (2017)

Figura 4 - Progressão do câncer de mama e mediadores inflamatórios secretados por TAM. Sinais do microambiente tumoral estimulam os macrófagos a adotar um fenótipo específico e desempenhar papéis distintos que contribuem para a tumorigênese. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas; MMPs: metaloproteinases da matriz; TGF- β : fator de crescimento tumoral beta; CCLs: ligantes de quimiocinas; SEMA3A: Semaforinas; MIP-1B: *macrophage inflammatory protein-1B*; EGF: fator de crescimento endotelial; TLR4: *toll like receptors 4*; IL-10-6: interleucina 10-6; CLX-1: ligante CLX-1; VEGFR1: receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1; PD-L1-L2: *programmed Death – Ligant 1-2*.

Os TAM são derivados principalmente de monócitos do sangue periférico recrutados para a massa tumoral e diferenciados em macrófagos teciduais residentes, os quais não apresentam capacidade proliferativa.

Porém, há evidências de uma subpopulação de TAM com capacidade proliferativa, conhecidos como macrófagos proliferantes (PROMACS). Estes foram isolados de uma variedade de tumores em camundongos. Em estudos com humanos, os PROMACS podem ser identificados por imunohistoquímica através de dupla marcação para CD68 (um pan-marcador de macrófagos) e antígeno nuclear celular proliferante (PCNA, um marcador de proliferação), sendo descritos em associação a uma variedade de doenças, incluindo glomerulonefrite, aterosclerose, demência relacionada à AIDS, linfoma e câncer de esôfago. Recentemente, relatou-se correlação entre PCNA+ e TAM com cânceres de mama receptores hormonais negativos, apresentando mal prognóstico (MUKHTAR et al. 2012) (CAMPBELL et al. 2011). Em estudo de KORU-SENGUL et al. (2016), foi investigado esse status proliferativo de TAM em diferentes raças. Foi utilizado dupla marcação por imunohistoquímica com CD163 e KI-67 para detectar os PROMACS. Os autores encontraram um maior número de PROMACS naqueles macrófagos próximos a células tumorais, sugerindo que os macrófagos são incentivados a se proliferarem quando em contato com estas células. Também encontraram uma taxa maior de PROMACS nos tumores de mulheres negras em relação às outras etnias (KORU-SENGUL et al. 2016). Embora na publicação de CAMPBELL et al. (2011) não se verificasse associação estatisticamente significativa entre os PROMACS e o número de linfonodos axilares acometidos, foi observado relação entre presença de PROMACS e alto grau tumoral, receptor hormonal negativo e subtipo basal like. Iremos verificar se o mesmo ocorre em nossa amostra.

1.6 TAM E ACOMETIMENTO LINFONODAL AXILAR

Há muitos trabalhos relatando a relação entre a densidade dos macrófagos e os parâmetros anatomopatológicos clássicos. Em 4 desses estudos foi encontrada uma associação estatisticamente significativa entre o aumento da densidade dos TAM e o aumento das metástases linfonodais. O Quadro 3 ilustra estes estudos (TANG 2013).

Quadro 3 - Associação entre aumento da densidade dos TAM e envolvimento linfonodal

Autor	JUBB et al.	CHEN et al.	MAHMOUD et al.	TIAINEN et al.
Ano	2010	2011	2012	2015
Revista	Am J Pathol.	Cancer Cell	J Clin Pathol	Histopathology
Número de casos	296	562	1322	278
Marcador associado com TAM	CD68 (P=0.003)	CCL18 macrófago M2 (P<0.001)	CD68 (P=0.042)	CD163 (P=0,008)
Tipo de associação	Univariada direta ODDS RATIO > 1 Associação direta entre marcação positiva para CD68 e metástase linfonodal	Univariada direta Quanto maior o número de linfonodos axilares metastáticos, maior a imunomarcagem para CCL18	Univariada direta Quanto maior o número de linfonodos axilares metastáticos, maior a imunomarcagem para CD68	Univariada direta O alto número de células CD163 positivas correlaciona-se com linfonodos positivos pN3

Entretanto, em estudo realizado por CH'NG et al. 2013, foi encontrada uma importante correlação entre a densidade de TAM no estroma e no compartimento intratumoral. Quanto mais alta a densidade no estroma

também era maior a densidade nesses focos ($p=0.001$). Isso sugere um intercâmbio de TAM entre esses dois compartimentos do câncer de mama. Porém, quando se comparava a densidade dos TAM, apenas 4 parâmetros clínico-patológicos foram significativamente relacionados. Quanto maior o grau nuclear, o índice mitótico, a densidade dos microvasos e menor a expressão de RE, maior era a densidade dos macrófagos no estroma. Em relação aos TAM no compartimento intratumoral só houve essa associação com a densidade dos microvasos ($p=0.007$). Isso sugere que os TAM que melhor se associam com as variáveis anatomopatológicas localizam-se no estroma e que nem todas as variáveis apresentam associação com a densidade dos TAM. Nesse estudo não houve associação significativa com o número de linfonodos acometidos em nenhum dos dois compartimentos (CH'NG et al. 2013). Porém, todos os estudos são unânimes em afirmar a forte correlação entre a densidade dos TAM (ora no estroma, ora intratumoral) e pior prognóstico em câncer de mama (CHEN et al. 2011). Em recente metanálise, com 4541 pacientes, a alta densidade dos TAM foi associada com pior sobrevida global e sobrevida livre de doença, porém não houve associação com sobrevida livre de recidiva e sobrevida câncer específica (ZHAO et al. 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Baseando-se no exposto, formulamos hipótese da existência de correlação entre a densidade dos macrófagos do microambiente tumoral com acometimento neoplásico dos linfonodos sentinelas e não-sentinelas.

Dentre todas as células do estroma tumoral, justifica-se a escolha dos TAM pois estes compõem até cerca de 50% da massa tumoral, apresentando-se como um importante biomarcador de prognóstico e tratamento em câncer de mama e relacionando-se com aumento do risco de metástase linfonodal. Além disto, há uma série de trabalhos relacionando os TAM como importante alvo terapêutico.

Não há, até o momento, estudos avaliando esses marcadores presentes no microambiente do tumor primário de câncer de mama com predição de acometimento axilar de linfonodos sentinelas e não sentinelas.

Nesse sentido, avaliaremos se essa associação existe, tornando válida a utilização dos TAM também como fator preditivo de metástase linfonodal axilar. Caso essa hipótese se confirme, esses novos marcadores poderão ser avaliados no tumor primário nos fragmentos da punção por agulha grossa (*core biopsy*), permitindo um melhor planejamento terapêutico quanto à abordagem da axila nas pacientes com estadiamento clínico inicial. Além disso, seguindo a nova tendência de evitar o sobretratamento e cada vez mais proporcionar às pacientes a conservação da axila nos tumores iniciais, a densidade dos TAM poderá até mesmo sinalizar quais as pacientes que irão se beneficiar em não realizar a biópsia do linfonodo sentinela.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a associação entre a densidade dos TAM no estroma tumoral (através dos seguintes anticorpos: CD68, CD163 e HLA-DR) e o acometimento metastático em linfonodos sentinelas.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Identificar associação entre a densidade dos TAM e fatores clínico-patológicos relacionados a pior prognóstico;
- 2 Comparar a densidade de TAM totais, M1 e M2 no tumor primário e sua relação entre si;
- 3 Pesquisar os PROMACS e sua relação com o acometimento axilar e variáveis anatomopatológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo transversal.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de mama invasivo em estadiamento clínico inicial (tumores T1 a T3 e axila clinicamente negativa) que se submeteram à cirurgia (quadrantectomia ou mastectomia) e pesquisa do linfonodo sentinela entre janeiro/2007 a dezembro/2012 no A.C.Camargo Cancer Center, as quais preenchem os critérios de elegibilidade.

4.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

- Tumores de mama invasivos (T1-T3,N0),
- Cirurgia (quadrantectomia ou mastectomia) e biópsia de linfonodo sentinela (janeiro/2007 a dezembro 2012)
- Idade entre 18 e 80 anos

4.3.1 Critérios de Exclusão

- Ausência de informações clínicas

- Diagnóstico de câncer de mama por biópsia incisional
- Pacientes com tratamento prévio para câncer de mama
- LS positivo (macrometástase) que não foi submetida ao esvaziamento axilar

4.4 COLETA DOS DADOS

Os casos foram selecionados a partir de um banco de dados de pacientes com câncer de mama do A.C.Camargo Cancer Center. O banco de dados com 760 pacientes estava separado por subtipos histológicos e moleculares e *tissue microarray* (TMA) correspondente com a seguinte distribuição (Quadro 4):

Quadro 4 - Banco de dados AC Camargo e distribuição por TMA

TIPO HISTOLÓGICO E MOLECULAR	TMA	PESQUISA	TOTAL DE PACIENTES
LUMINAL	31	Tese de doutorado – Dra Fabiana Makdissi	90
TRIPLO-NEGATIVO	41	Trabalhos de conclusão de curso de Residência Médica em Oncologia Clínica – Dr Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima e Dr Felipe Costa	81
CÂNCER INVASOR NST	45 e 46	Tese de doutorado – Dr Fabio Medeiros	173
LOBULAR INVASOR LOBULAR IN SITU	49	Pesquisa de iniciação científica – aluna Tais Pelissari	416

Após a análise dos prontuários e laudos histopatológicos, seguindo os critérios de inclusão e exclusão do estudo, formou-se o banco de dados da pesquisa com a amostra inicialmente estimada para 141 casos. Todas as pacientes tiveram o seu diagnóstico histopatológico de câncer de mama invasivo por core-biopsy e foram submetidas a procedimento cirúrgico mamário (quadrantectomia ou mastectomia) entre janeiro de 2007 a dezembro de 2012. A distribuição dos casos segue abaixo (Quadro 5):

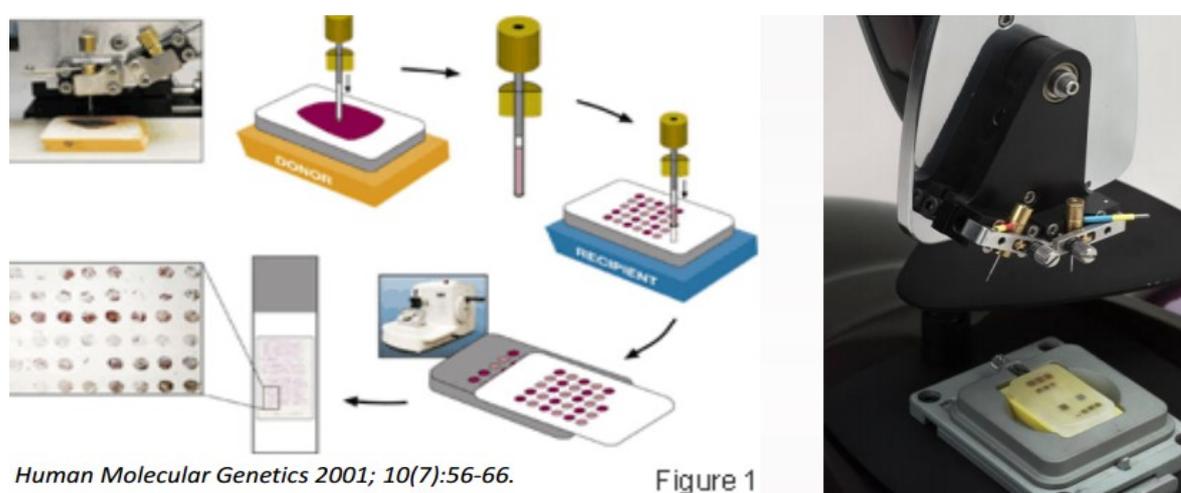
Quadro 5 - Amostra estimada da pesquisa (141 casos)

Subtipos moleculares	TMA	Número de casos
Luminais (Ductais ou mucinosos)	31	51
Lobulares Invasivos	49	58
HER 2	45 e 46	13
Triplo-negativo	41	19

4.5 BLOCO DE TMA (TISSUE MICROARRAY)

A técnica de tissue microarray (TMA) é um método que consiste em retirar pequenos fragmentos cilíndricos de múltiplos blocos de parafina convencionais (blocos doadores) e transferi-los para um único novo bloco vazio (bloco receptor) através de um aparelho chamado tissue microarrayer. A obtenção de amostras dos blocos de parafina doadores é realizada por meio de agulha (punch) com diâmetro de 0,6; 1,0; 1,5 ou 2,0 milímetros (KONONEN et al.1998; ILYAS et al. 2013) (Figura 7). O TMA permite a avaliação de centenas de amostras teciduais em uma única lâmina,

proporcionando grande economia de tempo de técnica e análise, de reagentes, tendo como principal vantagem a redução de custos. Por outro lado, pode ocorrer de se inserir alguns cilindros muito profundamente, não aparecendo tecido nos primeiros cortes (campos vazios) (STRANCHAN e READ 2001).



Fonte: STRANCHAN e READ (2001)

Figura 5 - Confeção do TMA

Para a pesquisa foram utilizados cinco TMA já construídos e que se encontravam armazenados nos laboratórios de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Os mesmos foram confeccionados após a demarcação da área tumoral na lâmina em HE e em seguida no bloco de parafina doador, sendo retiradas duas amostras cilíndricas com diâmetro de 1mm de cada caso clínico da região previamente demarcada. Sendo assim, foram confeccionados dois blocos de parafina para cada TMA de forma que continham o material duplicado de todas as pacientes da amostra a serem analisadas. Cada TMA construído contém cerca de 120 cilindros de

carcinomas mamários, sendo 1 cilindro representativo de cada tumor. Foram estudados os tumores das peças cirúrgicas (produto de quadrantectomia ou mastectomia). Tecido de placenta foi adicionado ao início da sequência das amostras no bloco de TMA para facilitação de leitura histológica.

Houve perda de aproximadamente 28% da amostra 39 casos foram excluídos da pesquisa, pois não era possível a realização da imunohistoquímica para os três marcadores dos macrófagos, pelos seguintes motivos:

- Não havia o caso correspondente no TMA, impossibilitando a realização da imuno-histoquímica, (29 casos – 20% da amostra estimada).
- Em todos os TMA, haviam casos que se encontravam sem tecido, o que caracterizamos como campo vazio, inclusive no TMA espelho (Figura 6) (8 casos – 6% da amostra estimada).
- Alguns casos no TMA não representavam tumor e sim outro tipo de tecido mamário (Figura 7) (2 casos – 2% da amostra estimada).

Um caso foi excluído, pois não apresentava informação no laudo ou no prontuário sobre o linfonodo sentinela.

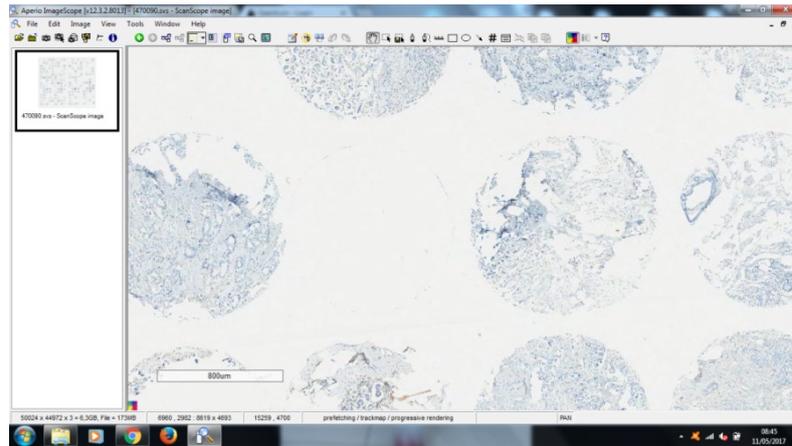


Figura 6 - Caso com campo vazio no TMA

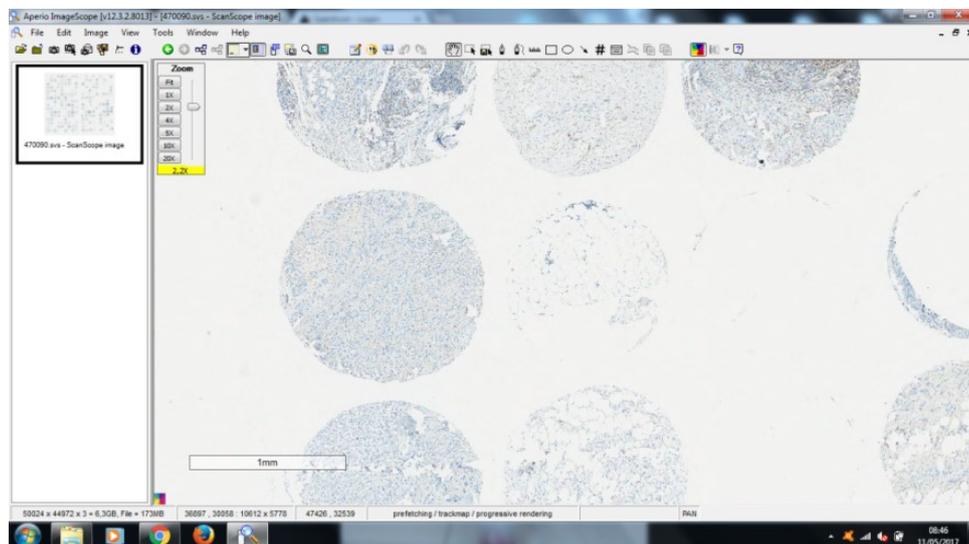


Figura 7 - Caso com tecido gorduroso no TMA

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.6.1 Preparo das Lâminas para Imuno-histoquímica

Foram realizados cortes dos blocos de TMA resfriados em micrótomo rotativo na espessura de 5µm. O material foi então colocado em banho maria em torno de 40°C e aderido às lâminas. As lâminas foram então levadas à estufa aquecida a 60°C para remover o excesso de parafina e melhorar a fixação do corte à lâmina. Cortes histológicos do TMA foram submetidos à imunohistoquímica (IHQ) usando os anticorpos ki67 (30-9), CD68 (Kp1), CD163 (10D6) e HLA-DR (LN3). Todas as reações de IHQ foram processadas em plataforma automatizada BenchMark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA), usando o kit de detecção Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical System/ Roche). Os anticorpos estão listados no Quadro 6.

O protocolo seguido apresentou as seguintes etapas:

- 1 Identificação das lâminas com as etiquetas de códigos de barras.
- 2 Desparafinização das lâminas em solução de EZ PREP (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA).
- 3 Recuperação antigênica por calor em solução CC1 (Ultra Cell Conditionig Solution) com pH alto, a 96°C, em tempo previamente padronizado para cada anticorpo.
- 4 Bloqueio da peroxidase endógena por 5 minutos utilizando o reagente de bloqueio de peroxidase (UltraView Universal DAB Inhibitor, 3% H2O2).

- 5 Passagens em soluções de lavagem (Wash buffer).
- 6 Incubação com anticorpo primário com tempo previamente padronizado.
- 7 Passagens em soluções de lavagem.
- 8 Incubação com polímero HRP (HRP Multimer) com subseqüentes lavagens em tampão.
- 9 Incubação com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB), passagem em tampão de lavagem e contracorados com Hematoxilina (Hematoxilina II), lavadas, passadas em água com detergente para retirada do LCS, seguida de lavagem em água corrente e destilada.
- 10 Passagem em xilol, álcool e montagem.

Quadro 6 - Anticorpos utilizados na pesquisa

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Kit detecção
<i>CD68</i>	Ventana	Kp1	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
<i>CD163</i>	Vector	10D6	<i>1/50</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
HLA-DR	Invitrogen	LN3	<i>1/600</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Ki-67	Ventana	30.-9	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>

Após a seleção da amostra, os laudos anatomopatológicos das cirurgias (quadrantectomia ou mastectomia) foram identificados e as respectivas lâminas localizadas nos TMA correspondentes (Figura 8). Casos com campos vazios foram revisados pelo mesmo patologista no espelho do TMA (caso duplicado) e em alguns casos foi possível a análise imuno-histoquímica.

Placenta	516/130 10%	A-711696 A	A-711672	A-714497 A1	A-714957 A2	A-714958 A2	200/3 / 15%	104/76 / VAZIO, VAZIO,	A-713055 A2	296/9/5%	A-725200 F	VAZIO/7/ 20%	A-712351	35/70/VA ZIO
1003/392 10%	A-712973 A1	A-710325 A	442/54/ 20%	A-710917 A	142/111/ 25%	524/100/ 50%	J2	A-718933 VAZIO / VAZIO/	302/100/ /20%	64/14/ 25%	140/132/ 130%	407/15/ 20%	A-720543 H	VAZIO / VAZIO
VAZIO / VAZIO /	A-713923 B2	A-714309 A2	102/147/ 7%	A-721239 C	A-721251 D	472/230 /10%	A-721905 I	822546 B1	815961 C	814639 D3	VAZIO / VAZIO /	834042 AF	812138 A1	A-807243 F2
A-710040 C	A-712248 A2	VAZIO / VAZIO /	192/43/ 10%	66/64/ VAZIO /	A-805191 A1	A-804516 A1	A-803773 A1	A-803772 D2	A-802788 A	320/250 /VAZIO	A-802217 A	902097 AC	813142 S	A-805191 AG
BAS-4976 A	BAS-4910 A1	BAS-4921 F	BAS-4218 A	BAS-5468 I	A-713216 A	VAZIO / VAZIO /	A-716118 A1	A-717396 A	210/187/1/ 5%	A-719373 A	12/18/VA ZIO	A-726375 B5	2560/30/ 6%	A-800695 A
VAZIO /7/ VAZIO /	A-726499 A2	A-715149 A	A-715882 A	728 / 242/25%	A-718317 A	A-718588 A2	135 /54/ 40%	A-717743 A	A-705998 A	A-707115 VAZIO / VAZIO /	VAZIO / VAZIO /	560 /51/ 10%	A-706597 A1	A-718933 J2
A-719882 /30%	1020/212 VAZIO /	VAZIO /	320 /50/ 10%	348 1000%	A-707311 G	154/8/40 %	198/4/40 %	320 /130 /70%	A-708578 A	A-709247 A	429 /42/ 15%	812632 A3	A-725532 B2	A-725251 G
A-724436 A	57 /3 / 15%	A-723367 A	840 /82/ 7%	370 / VAZIO /	21 / VAZIO /	A-722873 B	A-707775							
Fígado	Próstata N	intestino	Melanoma	Linfonodo N	Músculo Esquelético	Pele	Mama N							
Placenta	A-711497 D	A-711696 A	A-711672	A-714497 A1	A-714957 A2	A-714958 A2	A-715012 E	104/76/25 %	vaziovazi vaziov	A-713055 A2	A-715682 A	A-725260 F	vaziov7/20	A-712351
A-712598 K	A-712973 A1	A-710325 A	A-710672	A-710917 A	A-721935 J	A-722162 A	A-718933 vaziovazi vaziov	vaziovazi vaziov	A-718933 H1	A-718935 D2	A-719676 B	A-720042 A5	A-720543 vaziovazi vaziov	69/4/vazio
vaziovazi vaziov	A-713923 B2	A-714309 A2	A-721165 C	A-721239 D	A-721251 Q	A-721529 A2	822546 B1	815961 C	814639 D3	vaziovazi vaziov	VAZIO / VAZIO /	834042 AF	812138 A1	A-807243 F2
A-710040 A	A-712248 A2	vaziovazi vaziov	A-806657 6664/20	A-805191 A	A-804516 A	A-803773 D3	A-803772 D2	A-802788 320/250/v vaziov	A-802217 vaziov	902097 vaziov	A-802217 A	902097 AC	813142 S	A-805191 AG
BAS-4976 A	BAS-4910 A1	BAS-4921 F	BAS-4218 A	BAS-5468 I	A-713216 vaziovazi vaziov	A-716118 A1	A-717396 A	A-718937 A	A-719373 A	12/18/vazi o	A-726375 B5	A-800697 A7	A-800695 A	A-804516 A2
vaziovazi vaziov	A-726499 A2	A-715149 A	A-715882 A	A-715050 A	A-716317 A	A-716500 A2	A-717155 B3	A-717743 A	A-705998 B3	A-707115 %	2762/10 %	7322/60	A-706602 B	A-706597 A1
A-719882 A	A-716320 C	3324/432 A	A-726297 A1	A-725029 A	A-707311 G	A-707313 A1	A-707886 A	A-708171 A2	A-708578 A	A-709247 A	A-709370 A	812632 A3	A-725532 B2	A-725251 G
A-724436 A	A-723664 H1	A-723367 A	A-723200 Q	370/vaziov vaziov	21/vaziov vaziov	A-722873 B	A-707775							
Próstata				Linfonodo	Músculo		Mama							

Figura 8 - Seleção dos casos no TMA e repetição no espelho (TMA 31)

4.6.2 Biomarcadores para Macrófagos Selecionados para o Estudo

Baseado em recentes publicações escolhemos os biomarcadores para os macrófagos, a saber: CD68 (macrófagos totais), CD163 (macrófagos M2) e HLA-DR (macrófagos M1).

4.6.3 Receptores Hormonais

Não foi necessário realização de imuno-histoquímica para pesquisa dos receptores de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (RP), haja vista que a mesma já havia sido realizada a partir dos blocos de parafina dos tumores. Foi realizada uma análise separando as amostras em RE e RP positivo e negativo. Foi definido como positivo a partir de 1% de células marcadas por imuno-histoquímica.

4.6.4 HER-2

Não foi necessária a realização da pesquisa do status HER 2 no TMA, pois já havia sido feito a partir dos blocos de parafina. Casos com a proteína ausente ou quantificada em 1+ foram considerados HER 2 negativo. A grande maioria dos casos HER2 inconclusivos (2+) foram submetidos a FISH. Em apenas 1 caso não foi realizado. Esse caso foi excluído. Os demais casos foram reclassificados após a FISH. Casos com FISH evidenciando a amplificação do Gene, foram reclassificados como HER 2 POSITIVOS. Os casos sem amplificação foram classificados como NEGATIVOS.

4.6.5 Ki67

A determinação do ki67 dos tumores para classificação molecular por IHQ foi obtida através da utilização do status à época do diagnóstico da paciente, e, em casos de ausência de informação, pelo ki67 obtido pelo TMA. Nesse último caso, quando o TMA constava como campo vazio, não foi possível a realização do Ki67 e, conseqüentemente a classificação em luminal A ou B, sendo nesse caso classificado como luminal. Para aqueles casos que foram necessários a quantificação do Ki-67, seguiu-se as recomendações do International Ki67 in Breast Cancer Working Group. Em casos de coloração nuclear homogênea foram contados pelo menos três campos de grande aumento selecionados aleatoriamente. Em casos de gradiente de aumento da coloração em direção às bordas, foram pontuados

três campos na periferia do tumor e nos casos de pontos quentes foi fornecido uma pontuação média global (DOWSETT et al. 2011).

4.6.6 Macrófagos Proliferantes

Pesquisou-se os PROMACS (macrófagos proliferantes) através da dupla marcação com anticorpo CD68 (marcador para macrófago) e Ki67 (marcador de proliferação).

4.6.7 Preparo das Lâminas para Pesquisa dos PROMACS-Dupla Marcação

Foi realizada reação de IHQ automatizada com dupla marcação os anticorpos CD68 (clone KP-1-VENTANA) e Ki67 (clone 30-9-VENTANA) no equipamento Benchmark ULTRA (VENTANA). Foi utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante (VENTANA), que consistiu das seguintes etapas: desparafinização em solução de EZ Prep, aplicação do BenchMark Ultra LCS após lavagens e antes das aplicações dos reagentes subsequentes, recuperação antigênica por calor (95°C) em solução recuperante BenchMark Ultra CC1 (pH 8,0) por 64 minutos, lavagem com Reaction Buffer, seguida da aplicação do anticorpo CD68 por 32 minutos, detecção com UltraView Universal DAB Kit, lavagens com Reaction Buffer e na sequência aquecimento a 90°C por 4 minutos para desnaturação. Após lavagem com Reaction Buffer, aplicação do anticorpo dupla marcação (Ki67) por 32 minutos e detecção com UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit. Realizada contracoloração com Hematoxilina (VENTANA) por

12 minutos, seguido de incubação com Bluing Reagent (VENTANA) por 4 minutos. Lavagem das lâminas em Reaction Buffer, passagem em água corrente e montagem das lâminas.

4.6.8 Identificação e Gradação dos TAM e PROMACS

Os casos selecionados foram revistos por um único patologista (Monique Batista da Costa Lemos) para uniformização da densidade dos TAM e PROMACS.

A densidade dos macrófagos foi avaliada de forma subjetiva pela quantificação absoluta de células marcadas/mm². Cada caso teve o registro da densidade de macrófagos em uma área pré-determinada (círculo com 1mm de diâmetro) no estroma tumoral, segundo a publicação de SOUSA et al. (2015) foram avaliadas as populações de macrófagos totais (avaliado com marcador CD68), macrófagos M1 (avaliado com o marcador HLA-DR), macrófagos M2 (avaliado com marcador CD163) (SOUSA et al. 2015) e Ki67.

Para identificação e gradação dos PROMACS, utilizamos a publicação de CAMPBELL et al. (2011) que avaliou 106 casos de câncer de mama submetidos à dupla marcação em TMA (coorte validada). Os nossos resultados de IHQ foram pontuados semi-quantitativamente por um patologista utilizando a *Reiner's four-point scale* baseado na intensidade e porcentagem da reação de IHQ. A intensidade da reação foi graduada como 1, 2 ou 3, sendo 1 a mais fraca e 3 a mais intensa coloração. Já a porcentagem de células coradas na reação foi avaliada como 1,2, 3 ou 4,

sendo: 1, <10% de células coradas; 2, <30%; 3, <70%; e 4, > 70% de células coradas, em comparação com o total de células tumorais. Os resultados de determinação de intensidade e heterogeneidade foram combinados e avaliados como segue no Quadro 7 (CAMPBELL et al. 2011).

Quadro 7 - Graduação dos PROMACS de acordo com a reação de IHQ

	Zero	Marcação negativa
Grau 1	2 e 3	Marcação fraca
Grau 2	4 e 5 pontos	Marcação intermediária
Grau 3	6 e 7 pontos	Marcação alta

Os PROMACS e os TAM também foram avaliados de forma subjetiva pela quantificação absoluta de células marcadas/mm² (números de PROMACS ou TAM por Campo de Grande Aumento), sendo estabelecido um ponto de corte para classificação de alta densidade e baixa densidade.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%.

Foram expressas as médias e desvio-padrão das variáveis quantitativas, comparadas por meio do teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos, normalidade analisada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov).

Os dados categóricos foram analisados por meio dos testes Exato de Fisher e qui-quadrado de Pearson e expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Foram utilizadas curvas ROC para estimar pontos de corte de percentual de células positivas para CD68, CD163 e HLA-DR, como preditor de acometimento metastático em linfonodo sentinela, considerando melhor ponto aqueles com maiores sensibilidade e especificidade concomitantes (Apêndice 1).

Agrupamos as amostras por clusterização hierárquica não supervisionada empregando os marcadores estudados em matriz de medida de distância euclidiana e o método de ligação utilizado foi o método de Ward. Após, realizamos o cruzamento com o acometimento do linfonodo sentinela (positivo e negativo) para observar o comportamento dos clusters.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRA FINAL DA PESQUISA

Totalizando em 101 casos (figura 9).

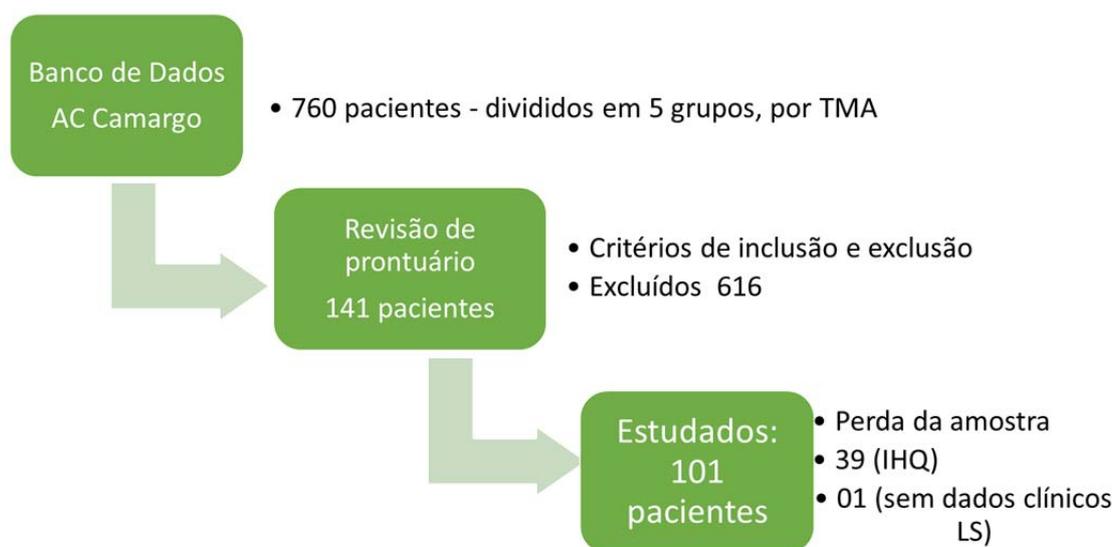


Figura 9 - Fluxograma evidenciando como foi composta a amostra final da pesquisa

5.2 PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO e MOLECULAR POR IHQ

A idade média das pacientes foi 55 ± 10 anos de idade, não diferindo significativamente entre os grupos com linfonodo sentinela negativo (52 ± 10) e com linfonodo sentinela positivo (53 ± 10) ($p=0,979$). A maioria das pacientes (73%) apresentava estadiamento clínico T1N0M0. A maioria das pacientes com linfonodo sentinela negativo (75,7%) tinha tumores

estadiados como T1 e todas as pacientes que eram T3N0M0 (3%) tiveram linfonodo sentinela positivo. Essa associação foi significativamente estatística ($p=0,027$).

A maioria das pacientes foram submetidas à cirurgia conservadora (quadrantectomia), 59,4%, não diferindo significativamente segundo o acometimento do sentinela ($p=0,716$). 76,8% tiveram o diagnóstico por core biopsy com resultado de carcinoma invasor, sendo o restante carcinoma ductal in situ ou sem informação. Não havia informação no prontuário sobre o método usado para a identificação do linfonodo sentinela na maioria das pacientes (55,4%).

O tamanho médio dos tumores na peça cirúrgica diferiu entre os grupos com linfonodo sentinela negativo ($1,68\pm 0,92$ cm) e positivo ($2,373\pm 1,69$), sendo estatisticamente significativo ($p=0,029$).

O número médio de linfonodos sentinelas retirados foi similar entre os grupos, não diferindo quando o sentinela era positivo ($1,87\pm 1,07$) ou negativo ($1,94\pm 1,09$) ($p=0,670$). Quando a pesquisa do linfonodo sentinela era positiva, em média havia $1,27\pm 0,52$ linfonodos sentinelas positivos ($p<0,001$).

Em mais da metade das pacientes com linfonodo sentinela positivo (60%) o acometimento linfonodal foi superior a 50% dos linfonodos excisados.

Quando a dissecação axilar foi realizada, em média foram removidos 13 linfonodos, sendo que não havia mais nenhum linfonodo positivo no conteúdo axilar em 53% dos casos.

Quando da positividade do linfonodo sentinela, o tipo mais frequente de metástase foi a macrometástase (62,1%), seguida pela micrometástase (34,5%). Em 3,4% observou-se linfonodos sentinelas ora com macro, ora com micrometástases.

O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma sem tipo especial (66,3%), seguido pelo carcinoma lobular invasor (27,7%) e outros subtipos (6,0%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com linfonodo sentinela negativo e com linfonodo sentinela positivo. Nenhum dos outros subtipos apresentou linfonodo sentinela positivo.

A maioria das pacientes tinham tumores Grau II segundo a graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificada por Elston & Ellis (48%), grau nuclear 3 (62,4%), índice mitótico baixo (até 5 mitoses/10 CGA) (50%), infiltrado inflamatório leve/discreto (58,4%) e ausência de invasão vascular e linfática (93%). Não houve diferença estatisticamente significativa de acordo com o acometimento do linfonodo sentinela para essas características.

Quando se tinha a informação do Ki67, era possível a classificação entre luminal A *like*, luminal B *like* ou luminal não A e não B por IHQ, segundo a classificação molecular adotada pelo *14th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel*, cujo ponto de corte para o Ki67 é 20%. Os tumores foram classificados nos grupos: luminal A, luminal B, luminal B – HER2 positivo; luminal não-A e não-B (Ki67 na faixa indeterminada entre 20 e 30%); HER2 hiperexpresso e triplo-negativo. A classificação foi através de imuno-histoquímica, com os parâmetros classificados no Quadro 1, de acordo com o último consenso de Saint Gallen

(COATES et al. 2015). A amostra constitui-se na sua maioria por tumores luminais A e B (59,6%).

Tumores RH positivo e HER 2 positivo 2+ e com FISH amplificado, foram considerados Luminal B HER 2 Positivo, perfazendo 8,5% do total da amostra, já os tumores HER-2 hiperexpresso constituíram 6.4%. Os tumores triplo-negativos corresponderam a 14,9% da amostra, sendo que desses 9,6% também eram basalóides pela expressão de citoqueratinas basais ou p63 ou EGFR. Quanto ao acometimento do linfonodo sentinela, observou-se no subgrupo luminal A uma maior quantidade de linfonodos sentinelas negativos (30,8%) e no subgrupo luminal B uma maior quantidade de linfonodos sentinelas positivos (44,8%). Porém, todos esses resultados não foram estatisticamente significativos ($p=0,108$).

As características clínicas-histológicas e moleculares por IHQ da amostra estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas-histológicas e moleculares por IHQ e relação com acometimento metastático do linfonodo sentinela

	Total	Linfonodo sentinela		p-Valor
		Negativo	Positivo	
T				
T1	73 73,0%	53* 75,7%	20 66,7%	0,027
T2	24 24,0%	17 24,3%	7 23,3%	
T3	3 3,0%	0 ,0%	3* 10,0%	
TU peça cirúrgica				
Carcinoma NST	67 66,3%	46 64,8%	21 70,0%	0,259
CLI	28 27,7%	19 26,8%	9 30,0%	
Outros	6 5,9%	6 8,5%	0 ,0%	
GRAU – SBR				
I	17 17,0%	12 16,9%	5 17,2%	0,654
II	48 48,0%	36 50,7%	12 41,4%	
III	35 35,0%	23 32,4%	12 41,4%	
Grau nuclear				
1	8 7,9%	6 8,5%	2 6,7%	0,141
2	30 29,7%	25 35,2%	5 16,7%	
3	63 62,4%	40 56,3%	23 76,7%	
Índice mitótico				
0-10	67 67,0%	50 70,4%	17 58,6%	0,375
11-20	22 22,0%	13 18,3%	9 31,0%	
>20	11 11,0%	8 11,3%	3 10,3%	

Cont/ Tabela 1

	Total	Linfonodo sentinela		p-Valor
		Negativo	Positivo	
Infiltrado inflamatório				
Ausente	8 7,9%	6 8,5%	2 6,7%	0,385
Leve/Discreto	59 58,4%	42 59,2%	17 56,7%	
Moderado	21 20,8%	13 18,3%	8 26,7%	
Intenso	12 11,9%	10 14,1%	2 6,7%	
Sem informação	1 1,0%	0 ,0%	1 3,3%	
Invasão vascular				
Não	99 98,0%	69 97,2%	30 100,0%	1,000
Sim	2 2,0%	2 2,8%	0 ,0%	
Invasão linfática				
Não	94 93,1%	68 95,8%	26 86,7%	0,192
Sim	7 6,9%	3 4,2%	4 13,3%	
HER2				
Negativo	87 86,1%	63 88,7%	24 80,0%	0,246
Positivo	14 13,9%	8 11,3%	6 20,0%	
EEC Linfonodo sentinela				
Não	92 91,1%	71* 100,0%	21 70,0%	<0,001
Sim	9 8,9%	0 ,0%	9* 30,0%	

Cont/ Tabela 1

	Total	Linfonodo sentinela		p-Valor
		Negativo	Positivo	
Subtipo molecular				
Luminal A	26 27,7%	20 30,8%	6 20,7%	0,108
Luminal B	30 31,9%	17 26,2%	13 44,8%	
Luminal B HER 2 Positivo	8 8,5%	6 9,2%	2 6,9%	
HER2 Hiperexpresso	6 6,4%	2 3,1%	4 13,8%	
Triplo negativo	14 14,9%	12 18,5%	2 6,9%	
Luminal não A e não B	10 10,6%	8 12,3%	2 6,9%	

*p<0,05, teste Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

TU: tumor. SBR: Scarff-Bloom-Richardson. EEC: extravasamento extracapsular.

5.3 ANÁLISE DOS TAM

A média de células/mm² coradas com os marcadores CD68, CD163 e HLA-DR não diferiram entre os grupos e foi respectivamente no grupo do linfonodo sentinela negativo de 112,48±95,65, 37,21±43,75 e 119,21±145,32 e no grupo do linfonodo sentinela positivo 119,60±152,42, 49,93±77,63 e 136,25±200,51(Tabela 2).

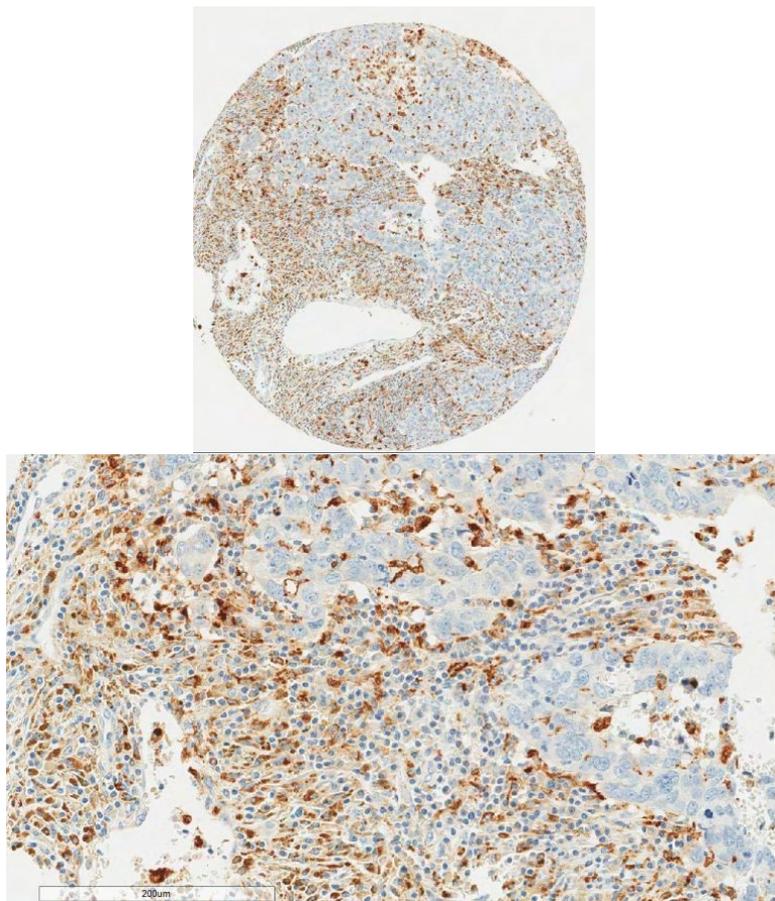
Tabela 2 - A média de células/mm² coradas com os marcadores CD68, CD163 e HLA-DR em relação ao acometimento do linfonodo sentinela (LS)

	LS Negativo	LS Positivo	p-Valor
CD68	112,48±95,65	119,60±152,42	0,736
CD163	37,21±43,75	49,93±77,63	0,490
HLA DR	119,21±145,32	136,25±200,51	0,288

*p<0,05 teste de Mann-Whitney.

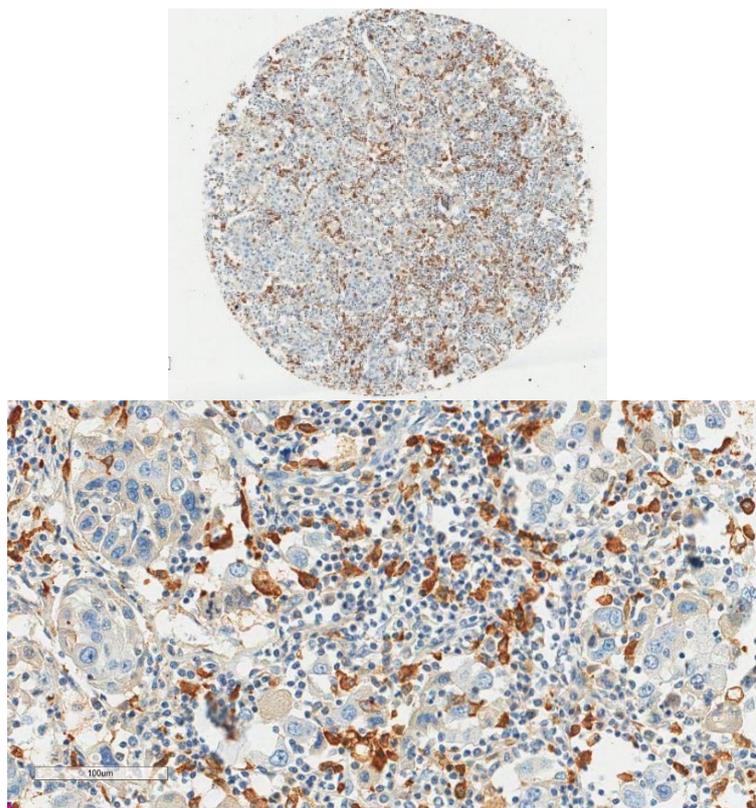
Ao se analisar o número de células coradas com os marcadores para macrófago, foi construída uma curva ROC para estudo de ponto de corte de melhor sensibilidade, especificidade em relação à positividade do linfonodo sentinela, com definição do ponto de corte para cada marcador dos macrófagos (Tabelas em Apêndice).

Chegou-se aos seguintes pontos de cortes dos marcadores dos macrófagos: CD68 (110 céls/mm²), CD163 (25 céls/mm²) e HLA-DR (80 céls/mm²). As Figuras 10,11 e 12 ilustram casos com alta imunoexpressão de CD68, CD163 e HLA-DR, respectivamente. As Figuras 13,14 e 15 são de casos com baixa imunoexpressão de CD68, CD163 e HLA-DR, respectivamente. Após, excluídos os casos com TMA vazios observou-se que não houve associação estatisticamente significativa entre a positividade ou negatividade do linfonodo sentinela e densidade dos TAM, marcados com CD68, CD163 e HLA-DR no estroma tumoral das pacientes da referida amostra (Tabela 3).



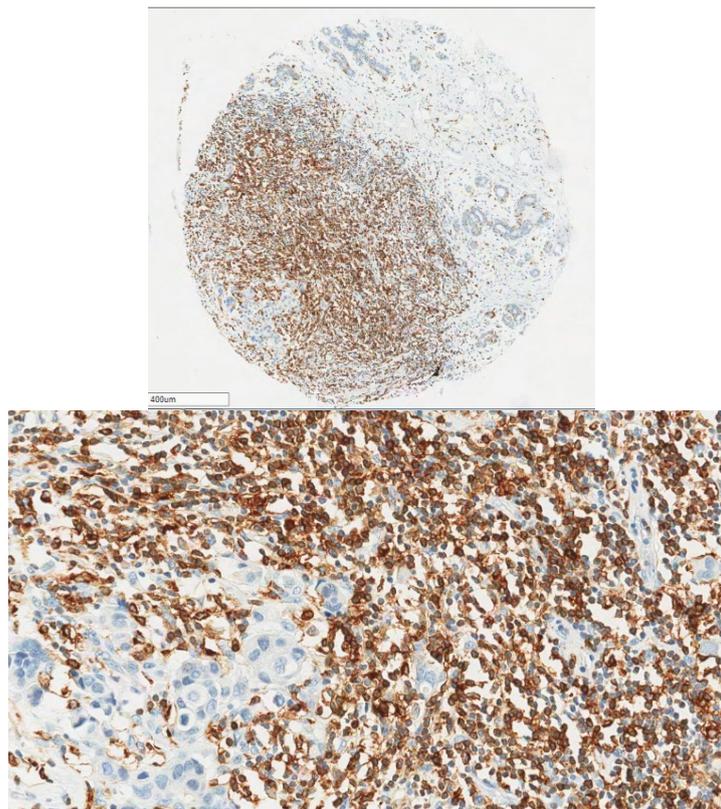
Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 10 - Alta imunexpressão de CD68 (>110 Células/mm²). Menor aumento e maior aumento.



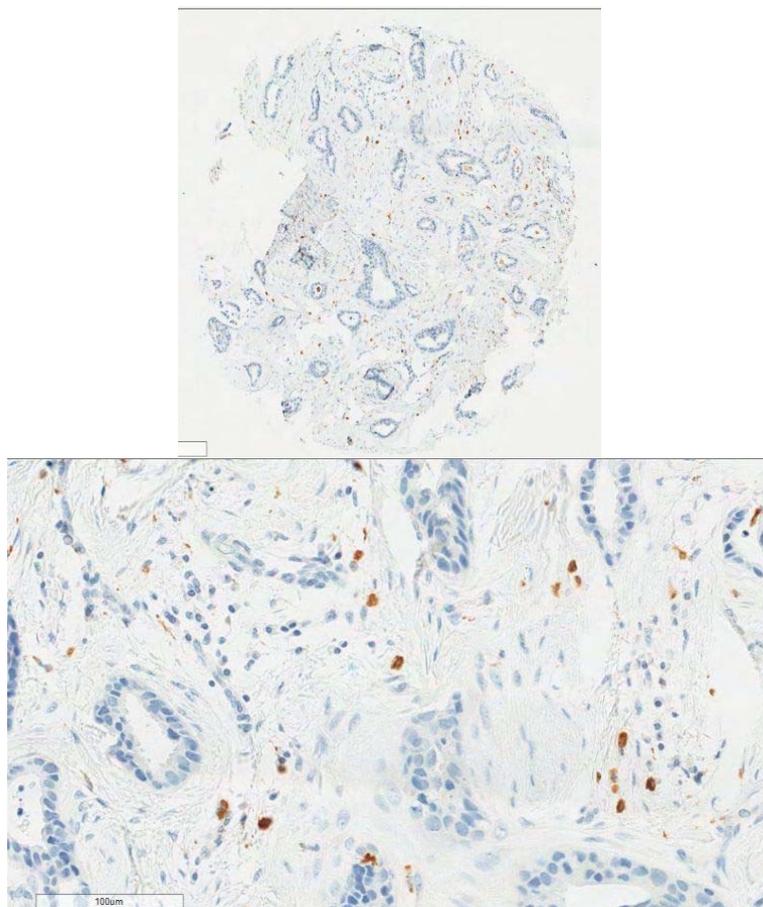
Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 11 - Alta imunoexpressão de CD163 (> 25 Células/mm²) em carcinoma invasor. Menor aumento e maior aumento.



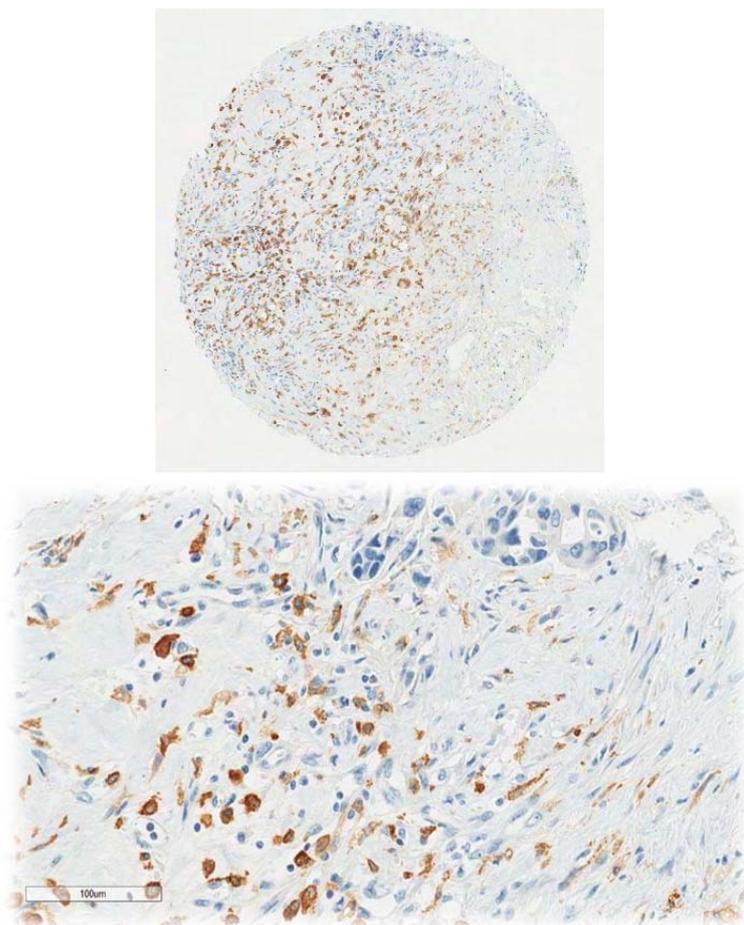
Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 12 - Alta imunexpressão de HLA-DR (>80 células coradas/mm²).
Menor e maior aumento.



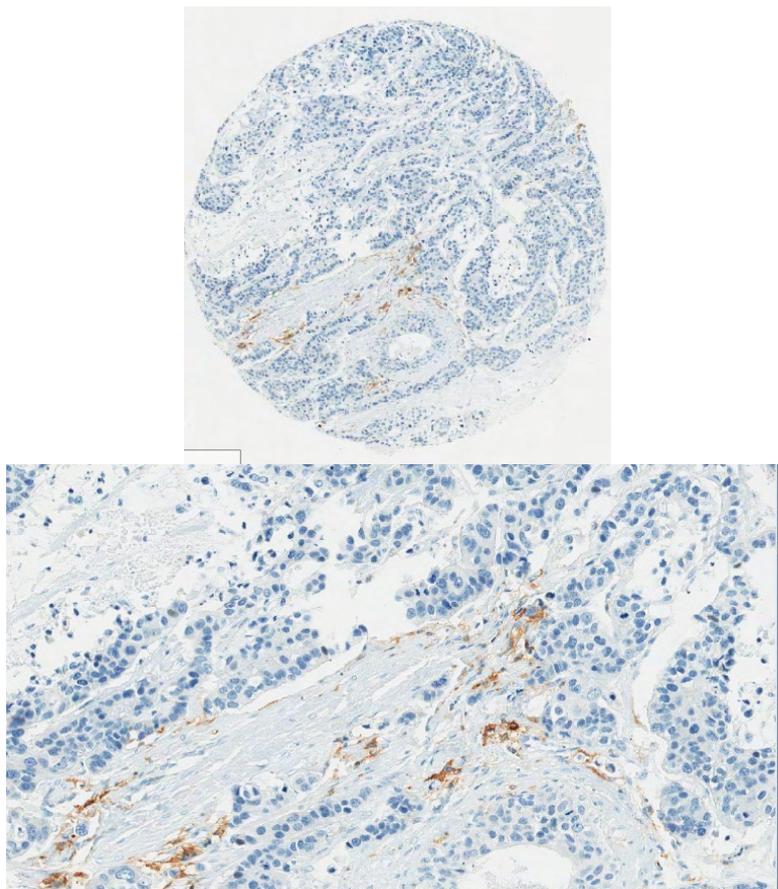
Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 13 - Baixa imunexpressão de CD68 (<110 células coradas/mm²).
Menor e maior aumento.



Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 14 - Baixa imunexpressão de CD163 (<25 células coradas/mm²). Menor e maior aumento.



Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 15 - Baixa imunoreexpressão de HLA-DR (<80 células/mm²). Menor e maior aumento.

Tabela 3 - Associação entre acometimento do linfonodo sentinela e biomarcadores para os macrófagos.

	TOTAL	LS NEGATIVO	LS POSITIVO	VALOR DE p
CD68				
Até 110 céls/mm ²	52	35	17	1,000
	56,5%	56,5%	56,7%	
Mais de 110 céls/mm ²	40	27	13	
	43,5%	43,5%	43,3%	
CD163				
Até 25 céls/mm ²	50	34	16	0,914
	54,3%	54,0%	55,2%	
Mais de 25 céls/mm ²	42	29	13	
	45,7%	46,0%	44,8%	
HLA DR				
Até 80 céls	48	36	12	0,181
	53,3%	58,1%	42,9%	
Mais de 80 céls	42	26	16	
	46,7%	41,9%	57,1%	

*p<0,05, teste Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Houve correlação estatisticamente significativa entre CD68 baixo (até 110 células/mm²), RE positivo (p=0,003), RP positivo (p=0,002) e HER2 negativo (p=0,003) (Tabela 4) e entre CD163 baixo (até 25 células/mm²), RE positivo e com níveis elevados (mais de 75%) (p=0,001), expressão de RP (p=0,032) e HER 2 negativo (p=0,010) (Tabela 5).

Houve associação entre os dois biomarcadores CD68 e CD163, porém tal associação não foi vista com HLA-DR (Tabela 4).

O HLA-DR não apresentou associação estatisticamente significativa com nenhum dos outros marcadores (Tabela 6).

Tabela 4 - Associação entre o CD68 e outros marcadores tumorais

	Total	CD68		p-Valor
		Até 110 céls	Mais de 110 céls	
RE percentual				
Até 75%	50	24	26	0,072
	54,3%	46,2%	65,0%	
Mais de 75%	42	28	14	
	45,7%	53,8%	35,0%	
RP percentual				
Até 35%	47	22	25	0,055
	51,1%	42,3%	62,5%	
Mais de 35%	45	30	15	
	48,9%	57,7%	37,5%	
RE				
Negativo	19	5	14*	0,003
	20,7%	9,6%	35,0%	
Positivo	73	47*	26	
	79,3%	90,4%	65,0%	
RP				
Negativo	30	10	20*	0,002
	32,6%	19,2%	50,0%	
Positivo	62	42*	20	
	67,4%	80,8%	50,0%	
HER2				
Negativo	80	50*	30	0,003
	87,0%	96,2%	75,0%	
Positivo	12	2	10*	
	13,0%	3,8%	25,0%	
Ki67				
Até 20%	46	29	17	0,094
	53,5%	61,7%	43,6%	
Mais de 20%	40	18	22	
	46,5%	38,3%	56,4%	
CD163 (M2)				
Até 25 céls	48	36	12	< 0,001
	53,3%	72,0%	30,0%	
Mais de 25 céls	42	14	28	
	46,7%	28,0%	70,0%	
HLA DR (M1)				
Até 80céls	44	28	16	0,052
	52,4%	62,2%	41,0%	
Mais de 80 céls	40	17	23	
	47,6%	37,8%	59,0%	

*p<0,05, teste Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Tabela 5 - Associação entre os CD163 e outros marcadores tumorais

	Total	CD163		p-Valor
		Até 25 céls	Mais de 25 céls	
RE percentual				
Até 75%	48	18	30*	0,001
	52,2%	36,0%	71,4%	
Mais de 75%	44	32*	12	
	47,8%	64,0%	28,6%	
RP percentual				
Até 35%	48	24	24	0,382
	52,2%	48,0%	57,1%	
Mais de 35%	44	26	18	
	47,8%	52,0%	42,9%	
RE				
Negativo	19	4	15*	0,002
	20,7%	8,0%	35,7%	
Positivo	73	46*	27	
	79,3%	92,0%	64,3%	
RP				
Negativo	31	12	19*	0,032
	33,7%	24,0%	45,2%	
Positivo	61	38*	23	
	66,3%	76,0%	54,8%	
HER2				
Negativo	80	48*	32	0,010
	87,0%	96,0%	76,2%	
Positivo	12	2	10*	
	13,0%	4,0%	23,8%	
ki 67				
Até 20%	47	29	18	0,056
	54,7%	64,4%	43,9%	
Mais de 20%	39	16	23	
	45,3%	35,6%	56,1%	
CD68				
Até 25 céls	50	36*	14	<0,001
	55,6%	75,0%	33,3%	
Mais de 25 céls	40	12	28*	
	44,4%	25,0%	66,7%	
HLA DR				
Até 80céls	44	24	20	0,766
	53,0%	54,5%	51,3%	
Mais de 80 céls	39	20	19	
	47,0%	45,5%	48,7%	

*p<0,05, teste Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Tabela 6 - Associação entre HLA-DR e outros marcadores tumorais

	Total	HLA DR		p-Valor
		Até 80céls	Mais de 80 céls	
RE percentual				
Até 75%	48	24	24	0,498
	53,3%	50,0%	57,1%	
Mais de 75%	42	24	18	
	46,7%	50,0%	42,9%	
RP percentual				
Até 35%	45	25	20	0,673
	50,0%	52,1%	47,6%	
Mais de 35%	45	23	22	
	50,0%	47,9%	52,4%	
RE				
Negativo	17	6	11	0,098
	18,9%	12,5%	26,2%	
Positivo	73	42	31	
	81,1%	87,5%	73,8%	
RP				
Negativo	30	16	14	1,000
	33,3%	33,3%	33,3%	
Positivo	60	32	28	
	66,7%	66,7%	66,7%	
HER2				
Negativo	77	42	35	0,765
	85,6%	87,5%	83,3%	
Positivo	13	6	7	
	14,4%	12,5%	16,7%	
Ki67				
Até 20%	46	24	22	1,000
	56,1%	55,8%	56,4%	
Mais de 20%	36	19	17	
	43,9%	44,2%	43,6%	
CD68				
Até 110 céls	45	28	17	0,052
	53,6%	63,6%	42,5%	
Mais de 110 céls	39	16	23	
	46,4%	36,4%	57,5%	
CD163				
Até 25 céls	44	24	20	0,766
	53,0%	54,5%	51,3%	
Mais de 25 céls	39	20	19	
	47,0%	45,5%	48,7%	

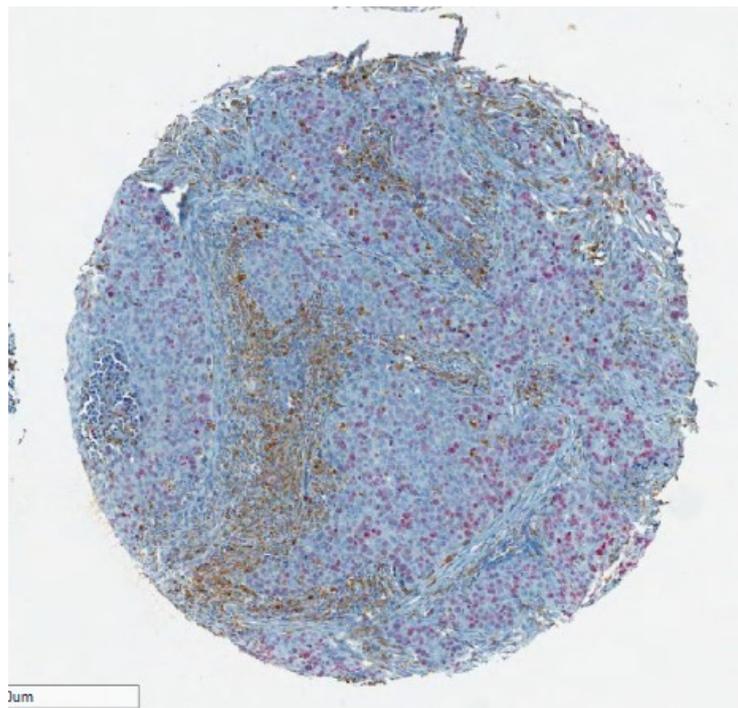
*p<0,05, teste Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

82,1% não apresentaram PROMACS e tiveram a intensidade da reação classificada como ausente. Nesses casos não houve associação estatisticamente significativa em relação à positividade ou não do linfonodo sentinela. Apenas 4% tiveram a reação moderada e forte, sendo todos os casos verificados em linfonodos negativos.

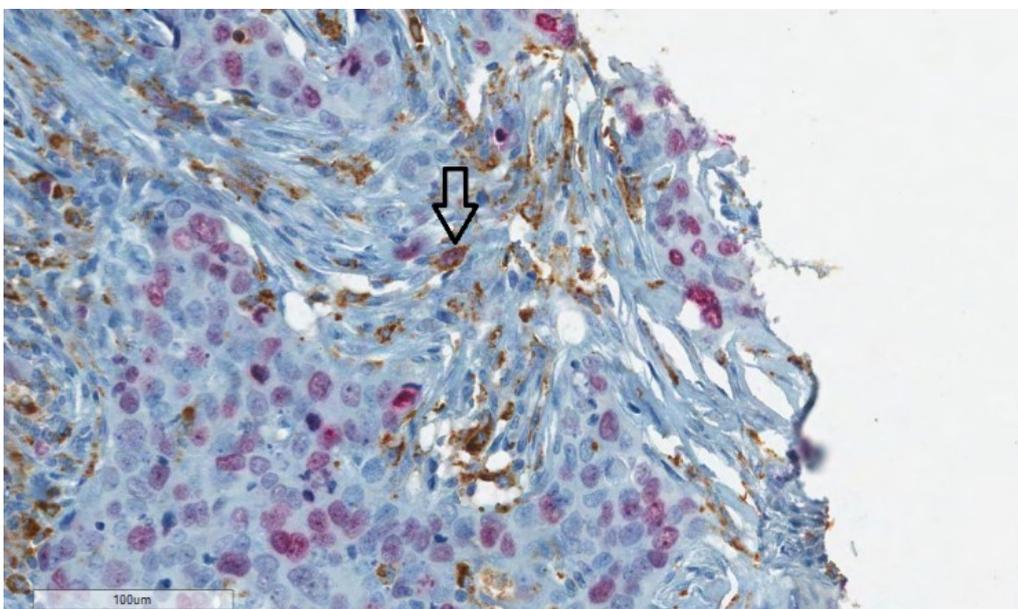
Apenas 6,3% dos casos apresentaram mais de 2 células coradas em campo de grande aumento, sendo todos os casos em linfonodos negativos (Tabela 7).

As Figuras 16 e 17 evidenciam as reações de imuno-histoquímica com dupla marcação (CD68 e KI67). Nesse caso a intensidade da reação foi fraca com menos de 10% de células coradas



Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 16 - Reação de imuno-histoquímica - dupla marcação (CD68 e Ki67).
Menor aumento (10 x).



Fonte: Acervo do presente estudo.

Figura 17 - Reação de imuno-histoquímica - dupla marcação (CD68 e Ki67)
Macrófagos: marcados com CD68 (marrom). PROMACS: células coradas mostram o citoplasma marrom e núcleo rosado (seta). Maior aumento (200 x).

Tabela 7 - Relação entre PROMACS e linfonodo sentinela

	Linfonodo sentinela			p-Valor
	Total	Negativo	Positivo	
PROMAC Intensidade				
Ausente	78	52	26	0,580
	82,1%	80,0%	86,7%	
Fraco	13	9	4	
	13,7%	13,8%	13,3%	
Moderado	2	2	0	
	2,1%	3,1%	,0%	
Forte	2	2	0	
	2,1%	3,1%	,0%	
PROMAC %				
0%	78	52	26	0,569
	82,1%	80,0%	86,7%	
Até 10%	17	13	4	
	17,9%	20,0%	13,3%	
PROMAC contagem absoluta				
Até 2	89	59	30	0,172
	93,7%	90,8%	100,0%	
Mais de 2	6	6	0	
	6,3%	9,2%	0,0%	

5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE TAM E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS

Os carcinomas lobulares invasores apresentaram menor imunoreatividade para CD163 ($p=0,035$).

Os tumores luminais A e B apresentaram menor número de células expressando CD68 e CD163 ($P<0,001$ e $p=0,009$).

A intensidade do infiltrado inflamatório foi diretamente proporcional à quantidade de células marcadas com CD68 e CD163 ($p=0,004$ e $p=0,035$) e sem diferença para HLA-DR ($p=0,355$).

Realizamos o agrupamento de algumas variáveis patológicas. Foram observadas associações estatisticamente significativas em:

- Grau histológico com CD68 e CD163: o grau histológico alto (III) se associou com maior imunoreatividade para CD163 e CD68.
- Índice mitótico com CD68 e CD163: o índice mitótico alto (>20 mitoses/CGA) se associou com maior imunoreatividade para CD163 e CD68. Quando o índice mitótico era de 0-20 mitoses/CGA se observou associação com baixo CD68 e CD163.
- Quando se agrupou o infiltrado inflamatório em ausente/leve x moderado/intenso, observou-se que o primeiro grupo apresentou baixo CD68 e CD163 e o segundo grupo alto CD68 e CD163.

As demais características não tiveram correlação com os biomarcadores para TAM (Tabela 8).

Tabela 8 - Características clínico-patológicas e TAM

	CD68			CD163		p-Valor	HLA-DR		p-Valor
	Baixo <110cél/s/mm ²	Alto >110cél/s/mm ²		Baixo <25cél/s/mm ²	Alto >25cél/s/mm ²		Baixo <80cél/s/mm ²	Alto >80cél/s/mm ²	
T									
T1	40 76,9%	26 65,0%	0,404	40 80,0%	27 64,3%	0,223	34 70,8%	29 69,0%	0,847
T2	11 21,2%	12 30,0%		9 18,0%	13 31,0%		12 25,0%	12 28,6%	
T3	1 1,9%	2 5,0%		1 2,0%	2 4,8%		2 4,2%	1 2,4%	
TU peça									
CDI	31 59,6%	30 75,0%	0,119	30 60,0%	31* 73,8%	0,003	35 72,9%	23 54,8%	0,200
CLI	19 36,5%	7 17,5%		20* 40,0%	6 14,3%		11 22,9%	16 38,1%	
Outros	2 3,8%	3 7,5%		0 0,0%	5* 11,9%		2 4,2%	3 7,1%	
GRAU – SBR									
I	10* 19,6%	4 10,0%	0,001	10* 20,4%	4 9,5%	0,011	8 16,7%	8 19,5%	0,157
II	31* 60,8%	13 32,5%		28* 57,1%	16 38,1%		27 56,3%	15 36,6%	
III	10 19,6%	23* 57,5%		11 22,4%	22* 52,4%		13 27,1%	18 43,9%	

Cont/ Tabela 8

	CD68		p-Valor	CD163		p-Valor	HLA-DR		p-Valor
	Baixo <110cél/mm ²	Alto >110cél/mm ²		Baixo <25cél/mm ²	Alto >25cél/mm ²		Baixo <80cél/mm ²	Alto >80cél/mm ²	
GRAU –SBR									
I/II	41*	17	0,001	38*	20	0,003	35	23	0,097
	80,4%	42,5%		77,5%	47,6%		73,0%	56,1%	
III	10	23*		11	22*		13	18	
	19,6%	57,5%		22,4%	52,4%		27,1%	43,9%	
Grau nuclear									
1	4	2	0,581	3	3	0,227	4	4	0,761
	7,7%	5,0%		6,0%	7,1%		8,3%	9,5%	
2	17	10		19	9		16	11	
	32,7%	25,0%		38,0%	21,4%		33,3%	26,2%	
3	31	28		28	30		28	27	
	59,6%	70,0%		56,0%	71,4%		58,3%	64,3%	
Grau nuclear									
1 e 2	21	12	0,303	22	12	0,127	20	15	0,563
	40,4%	30,0%		44,0%	28,5%		41,6%	35,7%	
3	31	28		28	30		28	27	
	59,6%	70,0%		56,0%	71,4%		58,3%	64,3%	
Índice mitótico									
0-10	42*	17	<0,001	39*	20	0,001	36	23	0,126
	82,4%	42,5%		79,6%	47,6%		75,0%	56,1%	
11-20	8	13*		9	12*		9	11	
	15,7%	32,5%		18,4%	28,6%		18,8%	26,8%	
>20	1	10*		1	10*		3	7	
	2,0%	25,0%		2,0%	23,8%		6,3%	17,1%	

Cont/ Tabela 8

	CD68			CD163		p- Valor	HLA-DR		p- Valor
	Baixo <110cél/mm ²	Alto >110cél/mm ²		Baixo <25cél/mm ²	Alto >25cél/mm ²		Baixo <80cél/mm ²	Alto >80cél/mm ²	
Índice mitótico									
0-20	50*	30	<0,001	48*	32	0,001	45	34	0,107
	98,1%	75,0%		98,0%	76,2%		93,8%	82,9%	
>20	1	10*		1	10*		3	7	
	2,0%	25,0%		2,0%	23,8%		6,3%	17,1%	
Infiltrado inflamatório									
Ausente	7*	0	0,004	4	1	0,035	4	3	0,355
	13,5%	,0%		8,0%	2,4%		8,3%	7,1%	
Leve/Discreto	34*	20		36*	20		29	24	
	65,4%	50,0%		72,0%	47,6%		60,4%	57,1%	
Moderado	8	11*		7	12*		11	7	
	15,4%	27,5%		14,0%	28,6%		22,9%	16,7%	
Intenso	2	9*		3	8*		3	8	
	3,8%	22,5%		6,0%	19,0%		6,3%	19,0%	
Sem informação	1	0		0	1		1	0	
	1,9%	,0%		,0%	2,4%		2,1%	,0%	
Infiltrado inflamatório									
Ausente/Leve	42*	20	0,002	40*	22	0,005	34	27	0,507
	80,8%	50,0%		80,0%	52,4%		70,8%	64,2%	
Moderado/Intenso	10	20*		10	20*		14	15	
	19,2%	50,0%		20,0%	47,6%		29,2%	35,7%	

Cont/ Tabela 8

	CD68			CD163		p- Valor	HLA-DR		p- Valor
	Baixo <110cél/m ²	Alto >110cél/m ²		Baixo <25cél/m ²	Alto >25cél/m ²		Baixo <80cél/m ²	Alto >80cél/m ²	
Invasão vascular									
Não	51 98,1%	39 97,5%	1,000	48 96,0%	42 100,0%	0,498	46 95,8%	42 100,0%	0,497
Sim	1 1,9%	1 2,5%		2 4,0%	0 ,0%		2 4,2%	0 ,0%	
Invasão linfática									
Não	48 92,3%	38 95,0%	0,694	47 94,0%	39 92,9%	1,000	42 87,5%	41 97,6%	0,116
Sim	4 7,7%	2 5,0%		3 6,0%	3 7,1%		6 12,5%	1 2,4%	
FISH									
Sem amplificação	5 9,6%	2 5,0%	0,693	3 6,0%	4 9,5%	0,376	3 6,3%	3 7,1%	0,943
Amplificado	2 3,8%	2 5,0%		1 2,0%	3 7,1%		3 6,3%	2 4,8%	
Não realizado	45 86,5%	36 90,0%		46 92,0%	35 83,3%		42 87,5%	37 88,1%	
EEC Linfonodo sentinela									
Não	47 90,4%	36 90,0%	0,951	45 90,0%	38 90,5%	1,000	44 91,7%	37 88,1%	0,729
Sim	5 9,6%	4 10,0%		5 10,0%	4 9,5%		4 8,3%	5 11,9%	

Cont/ Tabela 8

	CD68			CD163		p- Valor	HLA-DR		p- Valor
	Baixo <110cél/s/mm ²	Alto >110cél/s/mm ²		Baixo <25cél/s/mm ²	Alto >25cél/s/mm ²		Baixo <80cél/s/mm ²	Alto >80cél/s/mm ²	
Subtipo molecular									
Luminal A	17* 36,2%	7 18,4%	<0,001	15* 34,9%	10 23,8%	0,009	16 35,6%	9 23,7%	0,550
Luminal B	20* 42,6%	9 23,7%		18* 41,9%	10 23,8%		16 35,6%	11 28,9%	
Luminal Híbrido	1 2,1%	6* 15,8%		1 2,3%	6* 14,3%		3 6,7%	4 10,5%	
HER2	1 2,1%	4* 10,5%		1 2,3%	4* 9,5%		3 6,7%	3 7,9%	
Tripla negativo	4 8,5%	1 2,6%		2 4,7%	3 7,1%		1 2,2%	2 5,3%	
Tripla negativo Basalóide	0 0%	9 23,7%		1 2,3%	8 19,0%		2 4,4%	6 15,8%	
Linfonodo positivo tipo metástase									
Macro	9 52,9%	9 75,0%	0,146	11 64,7%	7 58,3%	0,479	6 50,0%	11 73,3%	0,204
Micro	8 47,1%	2 16,7%		6 35,3%	4 33,3%		6 50,0%	3 20,0%	
Macro e Micro	0 ,0%	1 8,3%		0 ,0%	1 8,3%		0 ,0%	1 6,7%	

*p<0,05, teste Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual. TU: tumor. SBR: Scarff-Bloom-Richardson. EEC: extravasamento extracapsular

5.5 CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Após realizada a clusterização hierárquica não supervisionada, os marcadores para macrófagos foram agrupados em três clusters (Figura 18).

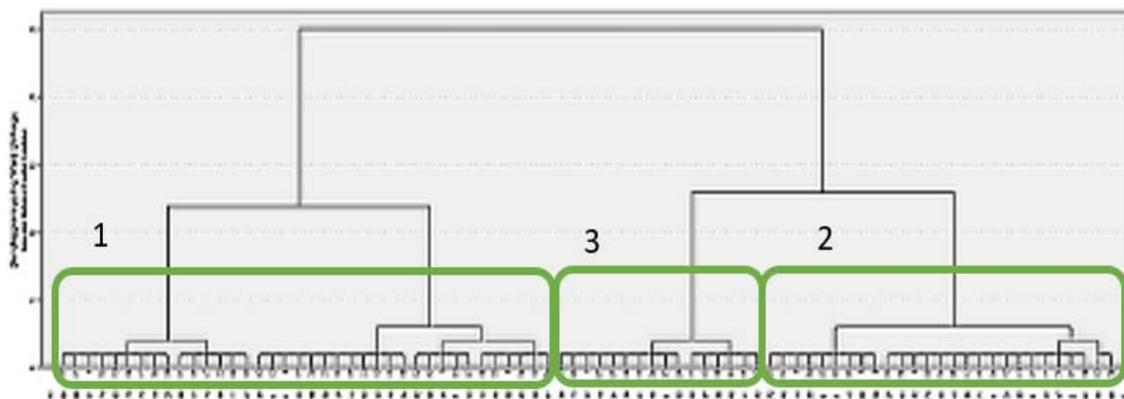


Figura 18 - Clusters por perfil CD68*CD163*HLA-DR*PROMAC*

O cluster 3 teve baixa prevalência de casos CD68-, CD163-, HLA-DR- e PROMACS-, o cluster 2 teve alta prevalência de CD68+, CD163+, HLA-DR- PROMACS - e o cluster 1 teve alta prevalência de CD68+, CD163+, HLA-DR+, PROMACS+. Essa clusterização não se associou a nenhuma das características clínico-patológicas da Tabela 9.

Tabela 9 - Clusterização hierárquica não supervisionada

	Clusters por perfil CD68*CD163*HLA-DR*PROMAC*			p-Valor
	1	2	3	
Tipo histológico				
CDI	27 57,4%	14 73,7%	12 75,0%	0,250
CLI	18 38,3%	3 15,8%	4 25,0%	
Outros	2 4,3%	2 10,5%	0 ,0%	
T				
T1	31 66,0%	14 73,7%	13 81,3%	0,743
T2	14 29,8%	4 21,1%	3 18,8%	
T3	2 4,3%	1 5,3%	0 ,0%	
SBR				
I	8 17,4%	3 15,8%	1 6,3%	0,052
II	17 37,0%	9 47,4%	13 81,3%	
III	21 45,7%	7 36,8%	2 12,5%	

Cont/ Tabela 9

	Cluters por perfil CD68*CD163*HLA-DR*PROMAC*			p-Valor
	1	2	3	
Grau nuclear				
1	4 8,5%	2 10,5%	0 ,0%	0,624
2	12 25,5%	7 36,8%	5 31,3%	
3	31 66,0%	10 52,6%	11 68,8%	
Índice mitótico				
0-10	25 54,3%	12 63,2%	14 87,5%	0,180
11-20	13 28,3%	5 26,3%	2 12,5%	
>20	8 17,4%	2 10,5%	0 ,0%	
Infiltrado inflamatório				
Ausente	1 2,1%	2 10,5%	3 18,8%	0,248
Leve/Discreto	29 61,7%	11 57,9%	10 62,5%	
Moderado	9 19,1%	5 26,3%	2 12,5%	
Intenso	8	1	1	

Cont/ Tabela 9

	Clusters por perfil CD68*CD163*HLA-DR*PROMAC*			p-Valor
	1	2	3	
Linfonodo sentinela	30	13	12	0,707
Negativo	63,8%	68,4%	75%	
Positivo	17	6	4	
	36,2%	31,6%	25%	
Invasão linfática				
Não	44	18	14	0,666
	93,6%	94,7%	87,5%	
Sim	3	1	2	
	6,4%	5,3%	12,5%	
RE				
Negativo	13	2	1	0,093
	27,7%	10,5%	6,3%	
Positivo	34	17	15	
	72,3%	89,5%	93,8%	
RP				
Negativo	17	5	5	0,733
	36,2%	26,3%	31,3%	
Positivo	30	14	11	
	63,8%	73,7%	68,8%	

Cont/ Tabela 9

	Cluters por perfil CD68*CD163*HLA-DR*PROMAC*			p-Valor
	1	2	3	
HER2				
Negativo	39 83,0%	15 78,9%	16 100,0%	0,167
Positivo	8 17,0%	4 21,1%	0 ,0%	
Ki 67				
Até 20%	26 56,5%	11 57,9%	7 50,0%	0,890
Mais de 20%	20 43,5%	8 42,1%	7 50,0%	
CD68				
Até 110 céls	18 38,3%	9 47,4%	16* 100,0%	<0,001
Mais de 100 células	29* 61,7%	10* 52,6%	0 ,0%	
CD163				
Até 25 células	27 57,4%	0 ,0%	16* 100,0%	<0,001
Mais de 25 células	20* 42,6%	19* 100,0%	0 ,0%	

Cont/ Tabela 9

	Clusters por perfil CD68+CD163+HLA-DR+PROMAC+			p-Valor
	1	2	3	
HLA-DR				
Até 80 células	8 17,0%	19* 100,0%	16* 100,0%	<0,001
Mais de 80 células	39* 83%	0 0%	0 0%	
PROMAC				
0%	33 70,2%	19* 100,0%	16* 100,0%	0,002
Até 10%	14* 29,8%	0 ,0%	0 ,0%	

*p<0,05, teste Exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

CDI: carcinoma ductal infiltrante. CLI: carcinoma lobular invasor. T: tamanho tumoral. SBR: Scarff-Bloom-Richardson. RE: receptor de estrogênio. RP: receptor de progesterona. PROMAC: macrófago proliferante.

6 DISCUSSÃO

Sendo o câncer de mama uma doença heterogênea e multifatorial cuja etiologia baseia-se em várias mudanças dentro do microambiente tumoral, o presente estudo questionou se existiriam fatores biológicos no tumor primário que pudessem prever o acometimento axilar. Recentemente, muitas pesquisas sustentam a hipótese de que células tumorais estromais desempenham papéis importantes na iniciação, progressão e metástase do tumor. Os eventos moleculares através dos quais as células estromais tornam-se reativas e afetam as células tumorais podem ser definidos de modo que os biomarcadores e os alvos terapêuticos começam a ser identificados (MAO et al. 2013).

Esse estudo tentou provar a hipótese de que os TAM localizados no estroma tumoral poderiam prever o status axilar. Para tanto, a amostra foi constituída de tumores iniciais (T1-T2), com axila clinicamente negativa (já que obrigatoriamente era necessário a realização da pesquisa do linfonodo sentinela) e que teriam como tratamento primário a cirurgia. A amostra constitui-se de 101 casos, maioria com estágio T1N0M0 (73%), linfonodo sentinela negativo (75,7%) e tumores luminais A e B (59,6%). Concluímos que o baixo número de casos HER 2 e triplo-negativo deve-se ao fato de tais pacientes, já na sua apresentação diagnóstica, terem tumores maiores ou com uma abordagem inicial para quimioterapia neoadjuvante, critérios esses que se enquadram nos de exclusão da pesquisa. Além disso, nossos dados

estão de acordo com os encontrados na literatura que, segundo estudos internacionais, classicamente apontam os subtipos Luminais como os mais prevalentes.

O luminal A é o mais prevalente dentre todos os perfis moleculares do câncer de mama, correspondendo de 50 a 60% dos casos. O subtipo Luminal B corresponde de 10 a 20% dos casos, mesma proporção dos subtipo triplo-negativo. O subtipo HER2 apresenta prevalência de 15 a 20% (BARRETO-NETO et al. 2014). Na amostra do presente estudo tivemos o subtipo luminal B (31,9%) um pouco mais prevalente que o luminal A (27,7%). Essa discreta diferença em relação à literatura internacional pode ter ocorrido pelo fato de que a nossa amostra foi classificada com ponto de corte de Ki67 em 20% e acrescentada a classificação de luminal não A e luminal não B. Em grande estudo retrospectivo observacional, foram analisados 5687 casos de câncer de mama, avaliando-se a sua distribuição pelas regiões do Brasil e os subtipos moleculares classificados por imunohistoquímica. Foi utilizado o ponto de corte do Ki67 em 14% para a distinção entre luminal A e luminal B. Regiões Sul e Sudeste com maior porcentagem de ascendência europeia e maior nível socioeconômico apresentaram maior proporção de tumores luminais. A região Norte apresentou-se com mais subtipos agressivos (HER 2 e triplo-negativos), enquanto na região Centro-Oeste predominaram carcinomas triplo-positivos. As diferenças persistiram em subgrupos de pacientes com menos de 50 anos. Os dados desse estudo também estão de acordo com os encontrados em nossa amostra, cujas pacientes residem na cidade de São Paulo (CARVALHO et al. 2014).

Foi utilizado no estudo o CD68 (*human homolog of macrosialin*) como um marcador para macrófagos. O número de macrófagos aumentados (CD68+) está associado com alta vascularização, metástase nodal, bem como sobrevida livre de recorrência e sobrevida global reduzidas, sugerindo o seu uso como fator prognóstico em câncer de mama (TANG 2013). Porém, outros marcadores para os macrófagos devem ser requeridos, uma vez que estes podem ser corados por anticorpos anti-CD68. Algumas células (por exemplo, Fibroblastos) são também CD68+. Além disso, o CD68 marca tanto macrófagos M1 como M2, sendo considerado um marcador pan-macrófago. Estudos recentes apontam outros marcadores identificados por dupla coloração com CD68 ou aqueles predominantemente expressos em macrófagos pró-tumorais (M2). Estes são: CD163, VEGF, HIF, PCNA, FTL, CCL18. Dentre esses, o CD163 é um marcador altamente específico para macrófagos M2. Ele é mais associado com fatores clinicopatológicos desfavoráveis do que CD68, apresentando-se como um marcador com impacto prognóstico quando utilizado sozinho ou em combinação com CD68 (TANG 2013).

Em recente metanálise, reunindo as principais evidências sobre o tema, a alta densidade dos TAM no estroma foi associada com menor taxa de sobrevida câncer-específica, quando comparado com a densidade do ninho tumoral. Os autores concluíram ainda que a utilização do CD68 (avaliado por imuno-histoquímica em tecido parafinado) como um biomarcador para o TAM na avaliação desse risco foi melhor do que o CD163 ou CD206 sozinho. Além disso, a alta infiltração de TAM foi

significativamente associada com o status de receptor hormonal negativo e comportamento biológico mais agressivo. Essa publicação reuniu 16 estudos e em 15 deles foram utilizados o marcador CD68 para predizer a densidade dos TAM (macrófagos totais) (ZHAO et al. 2017). Acreditamos que para responder o objetivo principal da pesquisa tal marcador já foi devidamente validado em publicações anteriores, inclusive sendo avaliado em TMA.

TIAINEN et al. (2015) utilizaram em seu estudo a marcação com CD68 para macrófagos totais e CD163 para macrófagos M2-like e justificou tal escolha baseado em publicações anteriores (TANG 2013). SOUSA et al. (2015) utilizaram CD68 para quantificação de macrófagos totais, CD163 para macrófagos M2 e HLA-DR para macrófagos M1, em 562 casos de câncer de mama humano utilizando TMA, como no presente estudo. Em sua publicação os autores relatam que os marcadores de superfície validados para macrófagos M1 incluem CD14, CD16, CD64, CD86 e HLA-DR α . Os macrófagos M2 podem ser divididos em M2a, M2b e M2c. Os macrófagos M2c produzem mais IL-10 e fatores de remodelação da matriz, tais como, as metaloproteinases. Para macrófagos M2c, o CD163 é considerado um marcador validado (AMBARUS et al. 2012). Em estudo de CHEN et al. (2011) foi utilizado dupla marcação com CCL18 e CD68 para identificar macrófagos, confirmando que as células CCL18 positivas representam um subconjunto de macrófagos, uma vez que houve co-localização de ambas as células (CCL18+ e CD68+). A expressão de CCL18 em câncer de mama revelou que células CCL18 positivas foram observadas infiltrando o estroma tumoral de 505 de 562 casos de carcinoma invasivo. Entretanto, não houve

marcação nas células neoplásicas e no epitélio não neoplásico adjacente. Além disso, a marcação também foi ausente em todos os tecidos mamários benignos, incluindo lesões com ou sem atipias. Pode-se inferir que talvez o CCL18 seja um marcador altamente específico para macrófagos localizados no estroma tumoral (CHEN et al. 2011). Baseado no exposto, consideramos que o CD68 foi uma boa escolha para marcadores de macrófagos totais e CD163 para macrófagos M2.

Em nossa amostra houve uma predominância de células marcadas com CD68 e HLA-DR, tanto para tumores com linfonodos sentinelas positivos como negativos. A média de células marcadas com CD163 foi bem menor em relação aos outros marcadores de macrófagos (37 para os casos com linfonodo sentinela negativo e 49 para os casos com linfonodos positivos) (Tabela 4). Nossa casuística constituiu-se de tumores de bom prognóstico, com axila clinicamente negativa (N0), que expressaram mais HLA-DR do que CD163, independente do status do linfonodo sentinela. Os estudos encontrados na literatura mostraram correlação entre os tumores com biologia mais agressiva, como os triplo-negativos ou com comprometimento linfonodal, e a densidade dos TAM. Tais estudos demonstram que TAM apresenta uma polarização M2, e os macrófagos CD163 positivos associaram-se com fatores de mau prognóstico e maior risco de metástases à distância, justificando seu papel no crescimento tumoral, promovendo a angiogênese e reprimindo a imunidade adaptativa (MANSFIELD et al. 2012).

Portanto, avaliamos tumores de evolução favorável, não encontrando correlação para predição de acometimento axilar. Entretanto, em nossa amostra há uma predominância de macrófagos HLA-DR positivos, com tendência a polarização M1, um fenótipo antitumoral, que permite a destruição de células cancerosas ou impede o crescimento tumoral (RHEE 2016).

Em estudo de CARRIO et al. (2013) foram avaliados 30 casos de tumores de mama invasivos em três etnias distintas. O estudo incluiu tumores menores de 2,0 cm (T1), RE positivo e HER2 negativo. O RP poderia ser positivo ou negativo. Tal amostra consistiu-se de tumores luminais iniciais, compatível com a maioria dos casos da nossa pesquisa. O autor encontrou heterogeneidade na densidade dos TAM (CD68+) em relação às etnias. A etnia caucasiana quase não apresentou infiltração por TAM e a afro-americana foi a que evidenciou uma maior infiltração. Parece que mesmo em tumores iniciais e de bom prognóstico, fatores genéticos podem influenciar o grau de infiltração dos TAM. Portanto, é necessário mais estudos sobre o microambiente tumoral em nossa população para verificarmos qual o perfil de infiltração de TAM e se os seus biomarcadores podem ser utilizados como alvos terapêuticos.

De acordo com dados da literatura, a maioria dos tumores da amostra apresentavam índice mitótico baixo, infiltrado inflamatório leve e ausência de invasão vascular e linfática, compatível com os subtipos luminais que são tumores de comportamento biológico menos agressivo.

De acordo com dados previamente publicados em tumores humanos, incluindo câncer de mama (ZHANG et al. 2017), os macrófagos infiltraram quase todos os tumores na presente população do estudo.

Não houve diferença significativamente estatística entre a densidade dos TAM, mensurada pela quantidade de células coradas com os três marcadores de macrófagos (CD163, CD68 e HLA-DR) e o acometimento do linfonodo sentinela em pacientes com câncer de mama nessa coorte de pacientes de baixo risco. A associação entre TAM e metástases linfonodais e à distância têm sido relatada em câncer de mama (BOLAT et al. 2006). Observa-se um maior número de TAM em casos com linfonodos axilares positivos e, principalmente para os tumores triplo-negativos, uma maior infiltração de TAM foi relacionada com risco maior de metástases à distância (CHOI et al. 2018). Porém, há poucos estudos relacionando a quantidade dos macrófagos, mensuradas em números absolutos e o status axilar. Esses mesmos estudos apresentam resultados controversos e não relacionam de forma clara a densidade dos TAM e o grau de acometimento axilar, apenas relatando como “aumento de metástase linfonodal”.

Há na literatura uma quantidade ainda menor de estudos abordando a densidade dos TAM no tumor primário do câncer de mama e nos linfonodos axilares correspondentes, no intuito de encontrar alguma correlação. Em estudo conduzido por YANG et al. (2015), TAM foi avaliado nos correspondentes linfonodos dos tecidos mamários com câncer de mama, sendo encontrados de forma difusa ou dispersa no seio marginal e cordão medular. Curiosamente, o número de TAM foi infinitamente maior nos

linfonodos não-metastáticos do que nos metastáticos, com densidade mediana de 119 células/HPF e 48 células/ HFP, respectivamente ($P < 0,01$). Porém, não houve associação entre densidade de TAM no tumor primário e risco de metástases axilares, de acordo com os dados do nosso estudo. MANSFIELD et al. (2012) também obteve os mesmos achados em seu estudo com 47 pacientes com câncer de mama, ao analisar a expressão de CD163 nos linfonodos sentinelas com e sem metástases. O autor concluiu que a baixa expressão de CD163 no linfonodo sentinela de pacientes com câncer de mama, especialmente naquelas com metástase nodal, leva a crer que a presença de macrófagos na área perisinusoidal do linfonodo sentinela possa ser um fator protetor contra metástases. Também não houve associação estatisticamente significativa entre a frequência de macrófagos CD163 positivos no linfonodo sentinela e os parâmetros anatomopatológicos, como tipo, grau e tamanho tumoral (MANSFIELD et al. 2012).

Concluimos pelos nossos achados e baseados nas publicações anteriores que o melhor fator de predição do status axilar através da avaliação da densidade dos TAM talvez fosse pesquisar os TAM no linfonodo sentinela e não no tumor primário. Nesse último caso, os estudos são controversos, principalmente para tumores iniciais e luminais. Já para tumores triplo- negativos observamos associações mais consistentes. (CAMPBELL et al. 2011; ZHAO et al. 2017). TAM em câncer de mama triplo-negativo *basal-like* apresenta diferença na polarização dos macrófagos, perfil de citocinas e função migratória, sugerindo que a resposta imune

mediada por TAM para esse perfil de tumor pode ser diferente daquela para os tumores não-basais (MATSUMOTO et al. 2015).

Em relação a outra população de células estromais, também muito estudada conhecidas como linfócitos infiltrantes de tumores (TIL), os achados são bem parecidos com os encontrados para os TAM. TIL, ambos CD3+ e CD8 +, relacionaram-se com melhor sobrevida em uma meta-análise em pacientes com tumores sólidos (GOODEN et al. 2011). Por outro lado, não há muito relato de TIL em metástases nodais, embora sua presença tenha sido correlacionada com a sobrevida livre de doença em melanoma (MIHM et al. 1996).

Assim, parece que, dependendo da localização (tumor primário ou linfonodos regionais) e do microambiente local, a presença de macrófagos CD163 + em pacientes com câncer de mama pode estar associada a reações imunes benéficas ou deletérias. Talvez tais achados sejam explicados pelo fato do linfonodo sentinela representar o local de ativação das células T e sítio primário de metástases precoces. Como tal, os linfonodos sentinelas são ideais para investigações de imunologia tumoral em câncer de mama, ao fornecerem parâmetros mais fidedignos da resposta imune relacionada com TAM (MANSFIELD et al. 2012). Porém, ao analisar o estudo de MANSFIELD et al. (2012), observamos que foram avaliados somente 11 casos com linfonodo sentinela, sendo necessário mais estudos para confirmação dos achados. Os estudos são escassos para concluir que o ideal seria pesquisar TAM nos linfonodos sentinelas e não no tumor primário, necessitando de confirmação com mais dados.

A quase totalidade dos estudos encontrados sobre TAM em câncer de mama abordam a relação entre os TAM com prognóstico e os relaciona com parâmetros clinicopatológicos clássicos e subtipos moleculares. Em recente metanálise, reunindo 16 publicações com 4541 pacientes, o marcador utilizado para contagem da densidade dos TAM foi o CD68 (15 estudos). Somente em 4 estudos foi utilizado CD163. A alta infiltração dos TAM teve correlação estatisticamente significativa com idade mais jovem (<50 anos), tamanho tumoral (>2 cm), grau histológico alto, receptores hormonais negativos, fenótipo basal e invasão vascular; condizendo com um comportamento biológico mais agressivo. Porém, não houve associação com status linfonodal ($p=0,206$) e status HER-2 (ZHAO et al. 2017), fato também ocorrido com a nossa amostra. TANG (2013) em artigo de revisão com 17 estudos encontrou que de uma forma geral, a alta densidade dos TAM está relacionada com alto grau tumoral, negatividade do receptor hormonal, metástases linfonodais e à distância, bem como reduzida sobrevida livre de recorrência e sobrevida global.

Portanto, a maioria desses estudos relaciona a densidade dos TAM com fatores de pior prognóstico. Apenas em 4 estudos houve associação significativa entre infiltração de TAM e aumento das metástases linfonodais. Ao analisarmos separadamente cada estudo observamos que esses resultados podem ser passíveis de viés. No estudo de JUBB et al. (2010), além dos 296 casos de adenocarcinoma de mama, também foram incluídos para análise 38 casos de carcinomas ductais in situ, 10 casos de tecidos mamários normais e 16 casos de angiosarcomas em diferentes locais. Foi

observada associação entre envolvimento linfonodal por tumor e marcação positiva para CD68. Em 73% dos adenocarcinomas de mama foi evidenciado algum grau de infiltração por células CD68 +, classificado em score 0 a 3. Os casos com células ocasionais marcadas com CD68 (score 1) foram incluídas na análise, não havendo relato no estudo sobre o grau de infiltração e o grau de acometimento axilar. Portanto, importante crítica a esse estudo foi considerar qualquer marcação positiva para CD68 como associada com metástases linfonodais. No estudo de MAHMOUD et al. (2012) as células marcadas com CD68 em cada tumor, foram contadas em três localizações: intratumoral, compartimento estromal adjacente e estromal distante, havendo um predomínio maior de macrófagos CD68+ no compartimento estromal distante. Porém, quando foi avaliada a associação entre o número de macrófagos e alguns parâmetros anatomopatológicos, foi realizada a contagem do número total (nos três compartimentos). Um maior número de macrófagos totais foi correlacionado com alto grau tumoral, tamanho tumoral maior, negatividade para receptores hormonais, fenótipo basal e positividade para HER 2. Para status linfonodal a associação foi fracamente significativa ($p=0,042$). Já para a análise da sobrevida foi levado em consideração cada localização, não havendo diferença nos resultados. Uma maior densidade de TAM foi associado com pior prognóstico na análise univariada, porém o mesmo não foi evidenciado na análise multivariada.

Em estudo de CHEN (2011), células CCL18+ foi mais abundante em tumores primários com linfonodos axilares positivos ($p<0,01$) e metástase à distância ($p=0,014$), evidenciando que quanto maior o número de linfonodos

acometidos, maior era a contagem de células CCL18+. Entretanto, não houve associação entre a densidade de macrófagos e o status do RE como traz a maioria das publicações. A contagem de macrófagos CCL18+ foi avaliada também nas metástases dos linfonodos axilares. A densidade dos TAM foi bem maior no tumor primário mamário do que no seu correspondente metastático no linfonodo, sugerindo que TAM provavelmente afeta o tumor primário de maneira adjacente. Células CCL18+ acima de 20 foram relacionadas com mais de 4 linfonodos comprometidos no conteúdo axilar. Tal publicação é a que mais evidencia uma forte correlação entre a densidade dos TAM e o grau de acometimento axilar.

Em estudo de TIAINEN et al. (2015) foram avaliados 278 casos de câncer de mama utilizando CD68 e CD163 para pesquisar macrófagos totais e M2-like, respectivamente. Os macrófagos foram avaliados nas áreas de HOT-SPOTS em campo de pequeno aumento, tanto na área intratumoral invasiva, como no estroma adjacente por 3 patologistas simultaneamente. Estes realizaram a contagem das células nessas áreas, sendo classificados em baixa ou alta infiltração de macrófagos. Concluíram que houve forte correlação entre o aumento das células marcadas com CD163 e CD68 com grau tumoral, RH negativos, HER 2 positivo e aumento da taxa de recidiva. Porém, apenas CD163 correlacionou-se significativamente com positividade linfonodal (status axilar) e tamanho tumoral. Com esse estudo, os autores concluíram que, particularmente o fenótipo M2-like, correlacionou-se com fatores clinico-patológicos desfavoráveis, com o CD163 representando um forte e independente fator prognóstico em câncer de mama. Seus dados

afirmam a importância do fenótipo M2 *like* na promoção tumoral no microambiente.

Corroborando esses dados, os pesquisadores encontraram correlação entre aumento de TAM e fragmentos bioativos gerados pela degradação enzimática de componentes da matriz extracelular (conhecido como *hyaluronan* (HA)). Uma das funções do *hyaluronan* é facilitar a diferenciação do macrófago para um fenótipo M2-*like*. É portanto, possível que uma maior quantidade de HA no estroma promova infiltração de TAM, particularmente M2-*like*. Baseados nesses achados, podemos inferir que pelo fato de nossa amostra constituir-se basicamente de tumores com um perfil biológico menos agressivo, apresentando poucos casos triplo negativos (14 casos) ou HER 2 (6 casos), justifica-se não termos encontrado tal relação, pois o número desses casos é escasso para alguma conclusão.

Há um grande questionamento se haveria também relação entre a densidade dos TAM e comportamento tumoral nas pacientes com linfonodos negativos, já que não há muita documentação para esses casos. Embora a taxa de recorrência tumoral do câncer de mama em pacientes com linfonodos negativos seja muito baixa em comparação com linfonodos positivos, cerca de 20-30% dos pacientes sofrerão recorrências e morrerão da doença em 10 anos (KARLSSON et al. 2007). Em estudo de ZHANG et al. (2017) foi evidenciado que em pacientes com linfonodos axilares negativos, a alta infiltração de TAM no estroma indicou também pior taxa de sobrevida, sendo um fator prognóstico independente em câncer de mama. Não houve correlação nesse estudo entre expressão de CD68 e status

linfonodal ou status do receptor hormonal, correlacionando-se apenas com o grau tumoral ($p=0,016$).

Dado interessante de ser reportado é que parece que os TAM apresentam fenótipos e funções diferentes de acordo com o sítio em que se encontram (intratumoral ou estromal). Em muitos estudos, TAM intratumoral não tem nenhuma correlação com quaisquer dos fatores clinicopatológicos. Já no estroma houve associação com grau tumoral e prognóstico (MEDREK et al. 2012). Devido a esses achados optamos por realizar a avaliação de TAM no estroma.

Concluimos que TAM estromais podem ser considerados um fator prognóstico do comportamento tumoral, porém não um preditor de acometimento axilar. Entretanto, há grande limitação em relação à análise comparativa da densidade dos TAM nos estudos individuais, principalmente em relação aos diferentes marcadores para macrófagos e valores de cut-off utilizados, tornando os índices inconsistentes. Além disso, devemos considerar o local dentro do microambiente tumoral que foi realizada a contagem dos macrófagos. Alguns estudos realizaram a pesquisa ora intratumoral, ora no estroma ou em ambos, o que torna diferente o valor de TAM, bem como o seu comportamento. No estudo de MEDREK et al. (2012) não houve diferença na distribuição dos macrófagos marcados com CD163 e CD68 em relação à localização para os subtipos luminais A. Para esses tipos tumorais a maioria apresentou distribuição esparsa ou ausente. Já para os subtipos triplo-negativos houve diferença na distribuição dos macrófagos por compartimento. Em 80% das pacientes houve infiltração densa de

macrófagos CD163 no estroma, enquanto apenas 23% tiveram infiltração densa de macrófagos CD68 para esse local. Em metanálise conduzida por ZHAO (2017), os macrófagos estromais associaram-se com mau prognóstico.

Encontramos associação estatisticamente significativa entre baixa imunexpressão de CD68 e CD163 e tumores luminais A e B, compatível com a maioria dos estudos, que abordam a forte relação entre aumento de TAM e tumores não luminais (KLINGEN et al. 2017). Encontramos a mesma analogia para os tumores não-luminais (triplo-negativos e HER 2) em nosso estudo, apresentando alta expressão de CD68 e CD163 nos tumores RE e RP negativos. Entretanto, nossa casuística é constituída de um número pequeno de pacientes com esse perfil. Dado interessante encontrado em nossa amostra foi quando o RE encontrava-se acima de 75% das células tumorais marcadas houve baixa imunoreatividade somente com CD163 ($p=0,001$).

Para RP não observamos um valor mais alto que identifica-se uma relação estatisticamente significativa como para RE. Porém, observamos que RP entre 1% e 35% relacionou-se com baixo CD68 e CD163 e RP negativo relacionou-se com alto CD163 e CD68. Esses achados são compatíveis com os da literatura. Para HLA-DR não obtivemos nenhuma correlação, sugerindo que esse marcador não pode ser utilizado para avaliar correlação com status do RH e HER 2 na nossa amostra.

Obtivemos também relação diretamente proporcional entre CD68 e CD163 compatível com os dados da literatura. A maioria dos estudos

utilizam CD68 como um marcador para macrófagos totais e CD163 como marcador para macrófago M2-*like*.

Há pouco relato na literatura utilizando HLA-DR como marcador para macrófago em câncer de mama, sendo encontrado um único estudo. Reproduzimos o estudo de SOUSA et al. (2015), pesquisando em TMA, os três marcadores para macrófagos. Houve heterogeneidade entre os casos nos níveis de expressão dos diferentes marcadores para macrófagos como em nossa amostra. Porém, nos tumores desse estudo o ponto de corte para CD163 foi 1675 células marcadas/mm² (HLA-DR foi 107 células marcadas/mm²), evidenciando um fenótipo mais direcionado para macrófagos M2-*like*. Encontramos em nossa amostra associação entre o tipo histológico carcinoma lobular invasivo com baixo CD163 (p=0,003). Diferentemente do estudo de Sousa, não observamos correlação com o tipo histológico ductal, onde o autor evidenciou níveis de CD163 mais altos para esses tumores. Porém, para grau histológico III e índice mitótico alto houve concordância dos achados, tanto para CD68 como para CD163, com níveis mais altos desses marcadores nos tumores com pior grau de diferenciação. Também não houve correlação das variáveis patológicas com HLA-DR, como em nosso estudo.

Também realizamos a pesquisa dos PROMACS em relação ao acometimento do linfonodo sentinela. A grande maioria dos tumores da nossa amostra não apresentaram células duplamente coradas (82,1%) e tiveram a intensidade da reação classificada como ausente. Nesses casos não houve relação estatisticamente significativa em relação à positividade ou

não do linfonodo sentinela. Isso nos leva a inferir que a maioria dos macrófagos encontrados em nossa amostra não apresentam nenhum grau de proliferação, provavelmente pelo comportamento tumoral menos agressivo dos nossos casos. Na publicação de CAMPBELL et al. (2011), houve correlação para alto grau tumoral, RH negativo e subtipo basal-like com alta infiltração de PROMACS. Não houve diferença estatisticamente significativa para tamanho tumoral e acometimento linfonodal axilar. Portanto, como a maioria da nossa amostra corresponde a tumores luminiais, nossos achados encontram-se compatíveis com os da literatura.

Nossa pesquisa apresenta algumas limitações. A primeira delas diz respeito a perda da amostra. Após análise do banco de dados do hospital AC Camargo com 760 casos em TMA, chegamos a uma amostra estimada de 141 casos. Entretanto, 39 casos foram excluídos da pesquisa, pois impossibilitava a realização da imuno-histoquímica. Apenas 1 caso foi excluído por não apresentar informações no laudo histopatológico ou no prontuário médico sobre o linfonodo sentinela. O TMA apresenta inúmeras vantagens como a realização da pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos das neoplasias, uniformização das reações, grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações, possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco e simplificação do trabalho das linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto (ANDRADE et al. 2007). Porém, em nossa pesquisa encontramos casos sem o seu correspondente no TMA, sem tecido tumoral (campo vazio) ou ainda com representatividade de tecido gorduroso.

Observamos que tal situação é uma importante limitação do TMA, pois pode ocorrer que na confecção do bloco, o cilindro pode atingir um determinado nível do bloco doador onde não haja tumor. Além disso, como um mesmo TMA é utilizado para várias pesquisas, ocorrerá também que um nível do bloco pode não existir mais tumor, o que pode não ocorrer em relação a outro caso situado no mesmo nível do bloco de TMA. Isso pode acarretar uma diminuição do número de casos da amostra, inversamente proporcional às vezes que o bloco de TMA foi utilizado para pesquisas prévias. Esses casos foram excluídos. Durante a análise estatística, tivemos o cuidado de excluir os casos em que não se havia a informação sobre os três marcadores para os macrófagos. Porém, os casos onde se tinha pelo menos a informação de um dos três marcadores foram incluídos. Caso excluíssemos todos os casos em que não foi possível a análise por conta do desgaste no bloco de TMA, perderíamos muitos casos. A amostra constituiu-se de casos que na sua maioria tinham a análise dos três marcadores. Porém, haviam casos que só tínhamos um ou dois marcadores, sendo assim foi avaliado todos os parâmetros de forma separada para aquele marcador, excluídos os casos sem informação. Estes não foram computados durante a análise estatística.

Outra limitação foi o pouquíssimo número de casos de tumores triplo-negativos (14 casos) e HER-2 (6 casos). Na grande maioria dos estudos a correlação entre os TAM e os parâmetros anatomopatológicos foi encontrado com esse perfil de tumores. Para uma conclusão mais fidedigna dos nosso achados seria necessário equilibrar os grupos da amostra entre

os diferentes perfis moleculares do câncer de mama. Levando em consideração que os tumores com abordagem inicial com cirurgia e pesquisa do linfonodo sentinela são em sua grande maioria tumores luminais, assim tornou-se difícil encontrar tumores não-luminais com um número considerável de casos nos quais pudéssemos avaliar a correlação entre TAM e acometimento axilar em linfonodos sentinelas.

Quando analisamos os marcadores para os macrófagos em clusters (clusterização hierárquica não supervisionada), encontramos três principais fenótipos para os macrófagos ou clusters, que não se associaram a nenhuma das características clínico-patológicas, inclusive com o acometimento do linfonodo sentinela.

O impacto do presente estudo foi concluir que para tumores de bom prognóstico, TAM não pode ser considerado preditor do status axilar. Nesse contexto, surgem novas perspectivas de pesquisa, como por exemplo, avaliar TAM nos linfonodos sentinelas desses mesmos tumores na busca de associação com a predição do acometimento metastático axilar. Além disso, pela escassez de casos triplo-negativos e HER2 em nossa amostra, é necessário estudar os TAM nesses tumores, verificando se teríamos os mesmos achados, independente do subtipo molecular.

7 CONCLUSÃO

- 1 TAM no estroma tumoral não é um preditor de acometimento axilar
- 2 O baixo número de células CD68 e CD163 associa-se com tumores luminais, status HER 2 negativo, grau histológico I e II e baixo índice mitótico
- 3 RE acima de 75% das células tumorais marcadas associa-se com baixa imunexpressão de células CD163 positivas, incluindo o subtipo lobular invasivo.
- 4 A alta expressão de CD68 e CD163 associa-se com tumores RE e RP negativos, grau histológico III e alto índice mitótico. Porém, pela escassez de casos com esse perfil não conseguimos comprovar a relação destes marcadores com metástases nodais.
- 5 HLA-DR não esteve associado com nenhuma variável clínico-patológica.
- 6 Os tumores apresentaram maior média de células marcadas para HLA-DR, sugerindo um fenótipo M1. CD68 e CD163 apresentam associação diretamente proporcional.
- 7 A maioria dos macrófagos encontrados em nossa amostra não apresentam nenhum grau de proliferação e não há associação entre os PROMACS e a predição do status axilar.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 2014; 111:3514-9.

Alco G, Igdem S, Ercan T, et al. Coverage of axillary lymph nodes with high tangential fields in breast radiotherapy. **Br J Radiol** 2010; 83:1072-6.

Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clin Exp Immunol** 2012; 167:195-205.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 66:1-9.

Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, et al. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. **J Immunol Methods** 2012; 375:196-206.

Andrade VP, Cunha IW, Silva SEM. et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Aras S, Zaidi MR. TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. **Br J Cancer** 2017; 117:1583-91.

Azambuja E, Cardoso F, de Castro Júnior G, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. **Br J Cancer** 2007; 96: 1504-13.

Barreto-Neto NJS, Pinheiro AB, Oliveira JF, et al. Perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal da mama em população de pacientes em Salvador, Bahia. **Rev Bras Mastol** 2014; 24:98-102.

Bevilacqua JL, Kattan MW, Fey JV, Cody HS, Borgen PI, Van Zee KJ. Doctor, what are my chances of having a positive sentinel node? A validated nomogram for risk estimation. **J Clin Oncol** 2007; 25:3670-9.

Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal TZ, Yagmurdur MC, Bal N, Demirhan B. Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: correlations with prognostic parameters. **J Exp Clin Cancer Res** 2006; 25:365-72.

Campbell MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, et al. Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 128:703-11.

Carrio R, Koru-Sengul T, Miao F, et al. Macrophages as independent prognostic factors in small T1 breast cancers. **Oncol Rep** 2013; 29:141-8.

Carvalho FM, Bacchi LM, Pincerato KM, Rijn MV, Bacchi CE. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. **BMC Women's Health** 2014; 14:102.

Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. **Scientific World J** 2011; 11:2391-402.

Chen J, Yao Y, Gong C, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. **Cancer Cell** 2011. 19:541-55.

Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res** 2008; 14:1368-76.

Ch'ng ES, Sharif SET, Jaafar H. In human invasive breast ductal carcinoma, tumor stromal macrophages and tumor nest macrophages have distinct relationships with clinicopathological parameters and tumor angiogenesis. **Virchows Arch** 2013; 462:257-67.

Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. **Histol Histopathol** 2018; 33:133-45.

Cimino-Mathews A. **Immune targeting in breast cancer**. 2016. Available from: <URL:https://handouts.uscap.org/2016_CM15_Cimi_1.pdf>. [2018 mar 12].

Cimino-Mathews A, Foote JB, Emens LA. Immune targeting in breast cancer. **Oncology (Williston Park)** 2015; 29:375-85.

Coates AS, Winer EP, Goldrisc A, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Ann Oncol** 2015; 26:1533-46.

Copson ER, Maishman TC, Tapper WJ, et al. Germline BRCA mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study. **Lancet Oncol** 2018; 19:169-80.

Crabb SJ, Cheang MC, Leung S, et al. Basal breast cancer molecular subtype predicts for lower incidence of axillary lymph node metastases in primary breast cancer. **Clin Breast Cancer** 2008; 8:249-56.

Dalmau E, Armengol-Alonso A, Muñoz M, Seguí-Palmer MÁ. Current status of hormone therapy in patients with hormone receptor positive (HR+) advanced breast cancer. **Breast** 2014; 23:710-20.

Denkert C, Budczies J, Minckwitz GV, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. **Breast** 2015; 24:S67-S72.

Direkze NC, Hodiala-Dilke K, Jeffery R, et al. Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. **Cancer Res** 2004; 64:8492-5.

Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, Boeddinghaus I. Biomarker changes during neoadjuvant anastrozole, tamoxifen, or the combination: influence of hormonal status and HER-2 in breast cancer—a study from the IMPACT trialists. **J Clin Oncol** 2005; 23:2477-92.

Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103:1656-64.

Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, et al. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:167-70.

Duffy MJ, O'Donovan N, McDermott E, Crown J. Validated biomarkers: The key to precision treatment in patients with breast cancer. **Breast** 2016; 29:192-201.

Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). **Eur J Cancer** 2017; 75: 284-98.

Emens LA. Breast Cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. **Expert Rev Anticancer Ther** 2012; 12:1597-611.

Fiegl H, Millinger S, Goebel G, et al. Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. **Cancer Res** 2006; 66:29-33.

Freitas Júnior R, Nunes RD, Martins E, et al. Fatores prognósticos do câncer de mama e sobrevida global em cinco e dez anos na cidade de Goiânia, Brasil: estudo de base populacional. **Rev Col Bras Cirur** 2017; 44:435-43.

Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, et al. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:297-305.

Gentilini O, Veronesi U. Abandoning sentinel lymph node biopsy in early breast cancer? A new trial in progress at the European Institute of Oncology of Milan (SOUND: Sentinel node vs Observation after axillary UltraSOUND). **Breast** 2012; 21:678-81.

Gill G, Gillett D, Molland G, et al. Sentinel-lymph-node-based management or routine axillary clearance? One-year outcomes of sentinel node biopsy versus axillary clearance (SNAC): a randomized controlled surgical trial. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:266-75.

Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. **Ann Surg** 1994; 220:391-401.

Giuliano AE, McCall L, Beitsch P, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial. **Ann Surg** 2011; 252:426-32.

Giuliano AE, Ballman K, McCall L, et al. Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: long-term follow-up From the American College of Surgeons Oncology Group (Alliance) ACOSOG Z0011 Randomized Trial. **Ann Surg** 2016; 264:413-20.

Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. **Br J Cancer** 2011; 105:93-103.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol** 2005; 5:953-64.

Goss PE, Lee BL, Badovinac-Crnjevic T, et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. **Lancet Oncol** 2013; 14:391-436.

Howland NK, Driver TD, Sedrak MP, et al. Lymph node involvement in immunohistochemistry-based molecular classifications of breast cancer. **J Surg Res** 2013; 185:697-703.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2016. Available from: <URL:https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/>. [2017 abr 20].

[IBGE]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mortalidade – Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. [2017 ago 25].

Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, et al. National Cancer Research Institute (UK) Biomarker and Imaging Clinical Studies Group. Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. **Histopathology** 2013; 62:827-39.

Jiang X, Shapiro DJ. The immune system and inflammation in breast cancer. **Mol Cell Endocrinol** 2014; 382:673-82.

Joshi S, Singh AR, Zulcic M, Bao L, Messer K, Ideker T, Dutkowski J, Durden DL Rac2 controls tumor growth, metastasis and M1-M2 macrophage differentiation in vivo. **PLoS One** 2014; 9:95893.

Jubb AM, Soilleux EJ, Turley H, et al. Expression of vascular notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer. **Am J Pathol** 2010; 176:2019-28.

Karlsson E, Danielsson A, Delle U, et al. Chromosomal changes associated with clinical outcome in lymph node-negative breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 2007; 172:139-46.

Klingen TA, Chen Y, Aas H, et al. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. **Hum Pathol** 2017; 69:72-80.

Kolečková M, Zdeněk K, Ehrmann J, et al. Age-associated prognostic and predictive biomarkers in patients with breast cancer. **Oncol Lett** 2017; 13:4201-7.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Koru-Sengul T, Santander AM, Miao F et al. Breast cancers from black women exhibit higher numbers of immunosuppressive macrophages with proliferative activity and of crown-like structures associated with lower survival compared to non-black Latinas and Caucasians. **Breast Cancer Res Treat** 2016; 158:113-26.

Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. **Am J Clin Pathol** 2004; 122:794-801.

Leong AS, Zhuang Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. **Pathobiology** 2011; 78:99-114.

Lijima J, Konno K, Itano N. Inflammatory alterations of the extracellular matrix in the tumor microenvironment. **Cancers (Basel)** 2011, 3:3189-205.

Liu N, Yang Z, Liu X, Niu Y. Lymph node status in different molecular subtype of breast cancer: triple negative tumours are more likely lymph node negative. **Oncotarget** 2017; 8:55534-43.

Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology Guideline Recommendations for Sentinel Lymph Node Biopsy in Early Breast Cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:7703-20.

Lyman GH, Somerfield MR, Bosserman LD, Perkins CL, Weaver DL, Giuliano AE. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. **J Clin Oncol** 2017; 35:561-64

Mahmoud SMA, Lee AHS, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. **J Clin Pathol** 2012; 65:159-63.

Mansfield AS, Heikkila P, von Smitten K, Vakkila J, Leidenius M. The presence of sinusoidal CD163 (+) macrophages in lymph nodes is associated with favorable nodal status in patients with breast cancer. **Virchows Arch** 2012; 461:639-46.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol** 2004; 25:677-86.

Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2013; 32:303-15.

Matsumoto H, Koo SL, Dent R, Tan PH, Iqbal J. Role of inflammatory infiltrates in triple negative breast cancer. **J Clin Pathol** 2015; 68:506-10.

Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. **BMC Cancer** 2012; 12:306.

Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. **Lab Invest** 1996; 74:43-47.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Morais FD. **Qualidade de vida e morbidade tardia após a biópsia do linfonodo sentinela ou linfadenectomia axilar em mulheres submetidas ao tratamento do câncer de mama**. Goiânia; 2014. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Goiás].

Morrow M, Van Zee KJ, Patil S, et al. Axillary Dissection and nodal irradiation can be avoided for most node-positive Z0011-eligible breast cancers: a prospective validation study of 793 patients. **Ann Surg** 2017; 266:457-62.

Mukhtar RA, Moore AP, Tandon VJ. et al. Elevated levels of proliferating and recently migrated tumor-associated macrophages confer increased aggressiveness and worse outcomes in breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:3979-86.

Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. **Expert Rev Mol Diagn** 2011; 11:91-100.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **The NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines™) Breast Cancer (Version 2.2017)**. Available from: <URL:http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf>. [2017 ago 30].

Nelson MP, Christmann BS, Dunaway CW, Morris A, Steele C. Experimental Pneumocystis lung infection promotes M2a alveolar macrophage-derived MMP12 production. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2012; 303:L469-75.

Neyen C, Plüddemann A, Mukhopadhyay S, et al. Macrophage scavenger receptor a promotes tumor progression in murine models of ovarian and pancreatic cancer. **J Immunol** 2013; 190:3798-805.

Nicolini A, Ferrari P, Duffy MJ. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. **Semin Cancer Biol** 2017; S1044-579X:30052-4.

Nimir CCBA. Fundamentos da classificação histológica e da biologia tumoral no planejamento terapêutico do câncer de mama. In: Lucena CEM, Paulinelli RR, Pedrini JL, editores. **Oncoplastia e reconstrução mamária**. Rio de Janeiro: Medbook, 2017. p.43-50.

Obeid E, Nanda R, Fu YX, Olopade OI. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). **Int J Oncol** 2013; 43:5-12.

Ohama H, Asai A, Ito I, Suzuki S, Kobayashi M, Higuchi K, Suzuki F. M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections. **Am J Pathol** 2015; 185:420-31.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 153: 477-91.

Prat A, Pineda E, Adamo B et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast** 2015; 24:S26-35.

Rai RK, Vishvakarma NK, Mohapatra TM, Singh SM. Augmented macrophage differentiation and polarization of tumor-associated macrophages towards M1 subtype in listeria administered tumor-bearing host. **J Immunother** 2012; 35:544-54.

Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. **Arch Pharm Res** 2016; 39:1588-96.

Roussos ET, Balsamo M, Alford SK, et al. Mena invasive (MenaINV) promotes multicellular streaming motility and transendothelial migration in a mouse model of breast cancer. **J Cell Sci** 2011; 124:2120-31.

Rudnick JA, Kuperwasser C. Stromal biomarkers in breast cancer development and progression. **Clin Exp Metastasis** 2012; 29:663-72.

Rutgers E, Donker M, Tienhoven G, et al. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981-22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:1303-10.

Schmidt M, Thomssen C, Untch M. Intrinsic subtypes of primary breast cancer – gene expression analysis. **Oncol Res Treat** 2016; 39:102-10.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science** 2011; 331:1565-70.

Soares LR, Gonzaga CMR, Branquinho LW, Sousa ALL, Souza MR, Freitas-Junior R. Mortalidade por câncer de mama feminino no Brasil de acordo com a cor. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2015; 37: 388-92.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **J Leukocyte Biol** 2009; 86:1065-73.

Sousa S, Brion R, Lintunen M, et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. **Breast Cancer Res** 2015; 17:101.

Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the tumor microenvironment in breast cancer. **Pathobiology** 2015; 82:142-52.

Stranchan T, Read A. **Human molecular genetics**. Nova York. Garland Science. 2001. Nucleic acid hybridization principles and applications; p.56-66.

Tan EY, Ho B, Chen JJC, et al. Predictors of nonsentinel nodal involvement to aid intraoperative decision making in breast cancer patients with positive sentinel nodes. **ISRN Oncol** 2011; 2011:539503.

Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, Inoue K. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. **Clin Med Insights Oncol** 2010; 20:15-34.

Tang X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **Cancer Lett** 2013; 332:3-10.

Tiainen S, Tumelius R, Rilla K, et al. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. **Histopathology** 2015; 66:873-83.

Veronesi U, Viale G, Paganelli G, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. **Ann Surg** 2010; 251:595-600.

Vesely MD1, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol** 2011; 29:235-71.

Wazir U, Kefah M. Emerging gene-based prognostic tools in early breast cancer: First steps to personalised medicine. **World J Clin Oncol** 2014; 5:795-9.

Weaver DL, Krag DN, Ashikaga T, et al. Pathologic analysis of sentinel and nonsentinel lymph nodes in breast carcinoma: a multicenter study. **Cancer** 2000; 88:1099-107.

Wen J, Yang Y, Liu P et al. Development and validation of a nomogram for predicting survival on the base of modified lymph node ratio in breast cancer patients. **Breast** 2017; 33:14-22.

Weigert A, Schiffmann S, Sekar D, et al. Sphingosine kinase 2 deficient tumor xenografts show impaired growth and fail to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype. **Int J Cancer** 2009; 125:2114-21.

Yang J, Li X, Liu X, Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. **J Clin Exp Pathol** 2015; 8:6656-64.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. **Lancet Oncol** 2010; 11:174-83.

Zaha DC, Lazăr E, Lăzureanu C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. **Rom J Morphol Embryol** 2010; 51:85-9.

Zhang B, Cao M, He Y, et al. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. **Tumour Biol** 2017; 39:1010428317711571.

Zhao X, Qu J, Sun Y, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. **Oncotarget** 2017; 8:30576-86.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

OK

São Paulo, 16 de junho de 2014.

Ao
Dr. Victor Piana de Andrade.

Aluno: Aline Carvalho Rocha Schoenherr (Doutorado - Instituto do Câncer do Ceará).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1896/14

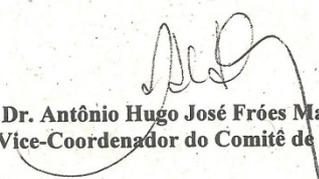
“O papel dos macrófagos associados ao tumor (TAM) na predição de acometimento metastático de linfonodos sentinelas e não-sentinelas em câncer de mama”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/06/2014, **aprovaram** a realização do projeto (datado de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Curvas ROC para avaliação do ponto de corte dos marcadores para macrófagos

Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de células positivas para CD68 como marcador preditor de acometimento metastático em linfonodo sentinela em câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center entre 2007 e 2012.

	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade – Especificidade
CD68			
5,00	0,958	0,000	0,958
7,00	0,958	0,019	0,939
9,00	0,958	0,038	0,921
11,50	0,917	0,057	0,860
15,50	0,917	0,094	0,822
21,00	0,917	0,113	0,803
24,50	0,917	0,132	0,785
25,50	0,917	0,151	0,766
26,50	0,917	0,170	0,747
28,00	0,917	0,189	0,728
29,50	0,875	0,189	0,686
30,50	0,833	0,208	0,626
32,00	0,792	0,208	0,584
34,50	0,792	0,226	0,565
36,50	0,750	0,226	0,524
37,50	0,750	0,245	0,505
39,50	0,708	0,245	0,463
44,50	0,708	0,264	0,444
48,50	0,667	0,264	0,403
49,50	0,667	0,283	0,384
50,50	0,667	0,302	0,365
56,00	0,625	0,321	0,304
62,50	0,625	0,340	0,285
65,00	0,583	0,340	0,244
67,50	0,583	0,377	0,206
71,50	0,583	0,396	0,187

77,00	0,583	0,415	0,168
85,50	0,583	0,453	0,131
93,50	0,542	0,453	0,089
98,00	0,542	0,472	0,070
103,00	0,500	0,472	0,028
107,00*	0,500	0,491	0,009
110,50*	0,458	0,509	-0,051
113,50	0,458	0,528	-0,070
114,50	0,417	0,547	-0,131
119,50	0,375	0,547	-0,172
124,50	0,375	0,566	-0,191
127,50	0,333	0,566	-0,233
131,00	0,333	0,585	-0,252
135,50	0,292	0,585	-0,293
142,00	0,292	0,604	-0,312
146,50	0,292	0,623	-0,331
149,50	0,292	0,660	-0,369
152,00	0,292	0,679	-0,388
155,50	0,292	0,698	-0,406
159,50	0,250	0,717	-0,467
165,00	0,208	0,736	-0,528
170,50	0,167	0,736	-0,569
173,50	0,125	0,736	-0,611
179,50	0,125	0,755	-0,630
185,50	0,125	0,774	-0,649
193,50	0,083	0,774	-0,690
201,00	0,083	0,792	-0,709
204,00	0,083	0,811	-0,728
214,50	0,083	0,830	-0,747
241,50	0,083	0,849	-0,766
260,50	0,083	0,868	-0,785
270,00	0,083	0,887	-0,803
284,00	0,083	0,906	-0,822
294,50	0,083	0,925	-0,841
303,50	0,083	0,943	-0,860
332,50	0,083	0,962	-0,879
361,00	0,083	0,981	-0,898
435,00	0,083	1,000	-0,917
624,50	0,042	1,000	-0,958
744,00	0,000	1,000	-1,000

*Valores ótimos (melhores sensibilidade e especificidade concomitantes).

Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de células positivas para CD163 como marcador preditor de acometimento metastático em linfonodo sentinela em câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center entre 2007 e 2012.

	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade – Especificidade
CD163			
0,50	1,000	0,038	0,962
2,00	0,958	0,113	0,845
3,50	0,958	0,151	0,807
4,50	0,917	0,208	0,709
5,50	0,875	0,245	0,630
7,00	0,792	0,245	0,546
8,50	0,792	0,264	0,528
9,50	0,750	0,264	0,486
10,50	0,750	0,302	0,448
12,50	0,708	0,321	0,388
14,50	0,667	0,340	0,327
16,00	0,667	0,377	0,289
17,50	0,625	0,377	0,248
18,50	0,625	0,434	0,191
20,50	0,542	0,453	0,089
22,50	0,542	0,472	0,070
23,50	0,542	0,491	0,051
25,00*	0,500	0,509	-0,009
26,50	0,500	0,528	-0,028
27,50	0,500	0,566	-0,066
28,50	0,500	0,585	-0,085
31,50	0,458	0,623	-0,164
36,00	0,417	0,623	-0,206
38,50	0,375	0,642	-0,267
40,00	0,375	0,679	-0,304
43,50	0,375	0,698	-0,323
46,50	0,333	0,698	-0,365
48,00	0,333	0,717	-0,384
50,50	0,333	0,736	-0,403
53,00	0,333	0,755	-0,421
57,00	0,333	0,774	-0,440
61,00	0,292	0,774	-0,482
62,50	0,292	0,792	-0,501

67,00	0,292	0,811	-0,520
72,50	0,250	0,811	-0,561
78,00	0,208	0,811	-0,603
83,00	0,167	0,811	-0,645
85,00	0,167	0,830	-0,664
89,50	0,125	0,887	-0,762
107,50	0,125	0,906	-0,781
125,50	0,083	0,906	-0,822
134,50	0,083	0,925	-0,841
144,00	0,083	0,943	-0,860
149,00	0,042	0,943	-0,902
152,00	0,042	0,962	-0,921
176,00	0,042	0,981	-0,939
299,00	0,042	1,000	-0,958
401,00	0,000	1,000	-1,000

*Valores ótimos (melhores sensibilidade e especificidade concomitantes).

Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de células positivas para HLA-DR como marcador preditor de acometimento metastático em linfonodo sentinela em câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital A.C.Camargo Cancer Center entre 2007 e 2012.

HLA DR	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade – Especificidade
,50	1,000	0,038	0,962
2,50	1,000	0,057	0,943
5,00	0,958	0,075	0,883
6,50	0,958	0,113	0,845
8,00	0,958	0,151	0,807
10,00	0,958	0,170	0,789
13,00	0,875	0,170	0,705
15,50	0,875	0,189	0,686
17,00	0,875	0,226	0,649
18,50	0,833	0,245	0,588
20,50	0,833	0,264	0,569
24,00	0,792	0,264	0,528
27,00	0,792	0,283	0,509
28,50	0,750	0,283	0,467
29,50	0,750	0,302	0,448
32,00	0,708	0,302	0,406
34,50	0,708	0,321	0,388
37,50	0,667	0,321	0,346
41,50	0,667	0,340	0,327
44,50	0,667	0,377	0,289
46,50	0,667	0,396	0,270
49,00	0,667	0,415	0,252
52,50	0,667	0,434	0,233
55,00	0,625	0,434	0,191
60,00	0,625	0,453	0,172
67,50	0,625	0,472	0,153
73,00	0,583	0,472	0,112
77,00*	0,583	0,491	0,093
79,50*	0,500	0,528	-0,028
81,00	0,500	0,547	-0,047
85,50	0,458	0,547	-0,089
92,00	0,458	0,566	-0,108
97,50	0,417	0,566	-0,149

102,00	0,417	0,604	-0,187
107,50	0,417	0,642	-0,225
112,00	0,375	0,660	-0,285
113,50	0,333	0,679	-0,346
119,50	0,250	0,679	-0,429
131,50	0,250	0,698	-0,448
144,00	0,250	0,717	-0,467
155,50	0,250	0,736	-0,486
164,50	0,208	0,736	-0,528
171,50	0,167	0,736	-0,569
184,00	0,125	0,736	-0,611
194,50	0,125	0,755	-0,630
212,50	0,125	0,774	-0,649
241,50	0,083	0,774	-0,690
264,50	0,083	0,792	-0,709
285,50	0,083	0,811	-0,728
310,50	0,083	0,830	-0,747
334,00	0,083	0,849	-0,766
348,00	0,083	0,868	-0,785
353,50	0,083	0,887	-0,803
365,00	0,083	0,906	-0,822
386,00	0,083	0,925	-0,841
398,00	0,083	0,943	-0,860
405,50	0,083	0,962	-0,879
437,50	0,042	0,962	-0,921
589,00	0,042	0,981	-0,939
889,00	0,042	1,000	-0,958
1065,00	0,000	1,000	-1,000

*Valores ótimos (melhores sensibilidade e especificidade concomitantes).