

**DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA DO INFILTRADO  
LINFOCITÁRIO EM TUMORES TRIPLO-NEGATIVOS E  
SEU IMPACTO NA SOBREVIVÊNCIA DA PACIENTE COM  
CÂNCER DE MAMA**

**JOSÉ PEIXOTO**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de Concentração em Oncologia.**

**Orientador: Dr Marcos Duarte Guimarães  
Coorientadora: Dra Maria Aparecida Seabra**

**São Paulo  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Peixoto, José

**Distribuição topográfica do infiltrado linfocitário em tumores triplo-negativos e seu impacto na sobrevida da paciente com câncer de mama** / José Peixoto. São Paulo; 2018.

64p.

Tese(Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco

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

Orientador: Marcos Duarte Guimarães

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2. Neoplasias de Mama Triplo Negativas/Triple Negative Breast Neoplasms. 3. Análise de Sobrevida/Survival Analysis. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Linfócitos do Interstício Tumoral/Lymphocytes, Tumor-Infiltrating

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais e irmãos, Adalberto, Izabel, Luís e Lourdes Peixoto, que sempre apoiaram a minha formação médica, a minha companheira Luciane, e meus filhos, Luís, João e Renata, que são minha fonte de alegria. Dedico também aos pacientes e seus familiares, pois sem eles, seria impossível a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Hospital de Câncer de Pernambuco, que foi parceiro ao longo de toda pesquisa. Ao Professor Doutor Fernando Augusto Soares, na época, representando a Fundação Antônio Prudente, e o Dr. José Iran Costa Júnior, fundamentais para a parceria para criação do doutorado. Ao Professor Doutor Marcos Duarte Guimarães e a Doutora Maria Aparecida Seabra, que colocadas pelas circunstâncias, muito ajudaram na elaboração da pesquisa. Ao Serviço de Patologia do HCP – PE, pela enorme ajuda na execução dos exames histológicos, em especial às funcionárias Rosimeri (Rose), Cristina e Marciane. Aos funcionários do departamento de Ensino e Pesquisa pelo apoio, especialmente Solange e Sônia. A bibliotecária Edna Maria Leite Meirelles Paixão pela aquisição de artigos científicos. A Marília de Freitas Chaves, Laryssa de Freitas, Rayane Conrado, e Dra. Ana Carolina Ferraz, pela colaboração na estruturação da tese. Ao Professor Ulisses Montarroyos, pela realização dos testes estatísticos. Ao Mestre Olávio Campos Júnior, por ter realizado todo o trabalho de contagem da imunohistoquímica, no Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA). Aos Doutores Sérgio Ricardo Soares e Luciana Gurgel Meira, pela importante colaboração na leitura das lâminas histológicas.

## RESUMO

Peixoto J. **Distribuição topográfica do infiltrado linfocitário em tumores triplo-negativos e seu impacto na sobrevida da mulher com câncer de mama.** São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Infiltrado linfocitário tumoral (do inglês Tumor infiltrating lymphocytes - TILs), são geralmente medido com métodos subjetivos, sendo incapaz de diferenciar subpopulações, ou a localização das células imunes no microambiente tumoral. Sendo de grande importância a identificação e localização dessas células por apresentarem respostas diferentes aos estímulos imunológicos. Neste trabalho, a densidade das células imunes foi analisada e um método objetivo de contagem do TIL foi descrito baseado em colorações de hematoxilina e eosina (H&E), como também através de imuno-histoquímica com marcação de CD3 e CD8, tendo como objetivo avaliar em pacientes com câncer de mama triplo-negativo (CMTN) em estágio inicial, se o infiltrado linfocitário no microambiente tumoral provoca algum impacto na sobrevida global (SG) do paciente. Pacientes diagnosticados no Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP-PE), entre 2009 e 2013, foram avaliados quanto à densidade de linfócitos de acordo com a localização intra tumoral e extra tumoral. Neste estudo, foram incluídos 87 pacientes, dos quais 22 pacientes apresentaram evento no período de seguimento. A avaliação do TIL por dois patologistas, mostrou concordância regular entre os avaliadores, com coeficiente de correlação intraclass (do inglês *intraclass correlation coefficient* – ICC) de 0,574 e  $p = 0,001$ . Linfócitos CD3+ e CD8+ estavam em maior quantidade na área intra tumoral em relação aos que se encontravam fora da margem do tumor (extra tumoral). Quando analisada a associação entre a presença dos linfócitos e a SG do paciente, foi observado uma relação diretamente proporcional com essa

sobrevida, ou seja, quanto maior a quantidade de linfócitos menor o risco de morte. A partir destes resultados, sugere-se que existe correlação entre o infiltrado linfocitário tumoral dos CMTN com a sobrevida geral dos pacientes, diminuindo o número de óbitos de acordo com o aumento do TIL quando os linfócitos são identificados como CD3+ e CD8+. O CMTN tem sido um tumor de mama que demonstra um prognóstico ruim e sem terapia alvo específica, portanto a análise do TIL pode ser explorada como marcador prognóstico para o tratamento de câncer de mama.

**Descritores:** Neoplasias da Mama. Neoplasias de Mama Triplo Negativas. Análise de Sobrevida. Imuno-Histoquímica. Linfócitos do Interstício Tumoral

## SUMMARY

Peixoto J [**Topographic distribution of lymphocyte infiltrate in triple-negative tumors and its impact on patient survival with breast cancer**]. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco].

Tumor-infiltrating lymphocytes – TILs, are normally measured through subjective methods, thus being incapable of differentiating subpopulations, or the location of cell immune to tumor microenvironment. Therefore identifying and the locating these cells is of great importance because they present different responses to immunologic stimuli. In this study, the density of the immune cells was analyzed and an objective method for counting TIL was described based on hematoxylin coloration and eosine (H&E), as well as immunohistochemistry with CD3 and CD8 markers. The objective is to evaluate that in patients with triple-negative breast cancer (TNBC) in the initial stage, the tumor-infiltrating lymphocytes microenvironment causes some impact in the overall survival (OS) of the patient. Patients diagnosed at the Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP-PE) between 2009 to 2013, were evaluated through the density of the lymphocytes according to the intra- and extra-tumoral location. In this study, 87 patients were studied, of which 22 patients presented event during the follow-up period. The evaluation of TIL by two pathologists, showed regular agreement among the evaluators with an intra-class correlation coefficient (ICC) of 0.574 and  $p= 0.001$ . CD3+ and CD8+ lymphocytes were found at a higher quantity in the intra-tumoral area in relation to those found in the outside edge of the tumor (extra-tumoral). When analyzing the association between the presence of the lymphocytes and the OS of the patient, a direct proportional relation was observed to the survival, in other words, the higher the quantity of lymphocytes, the lower the risk of death. Based on these results, there

seems to be a relation between the tumor-infiltrating lymphocytes of TNBC with an overall survival of patients, decreasing the numbers of deaths in accordance to an increase of TIL when the lymphocytes are identified as CD3+ and CD8+. TNBC has been a breast tumor with a bad prognosis and without a specific therapy, therefore an analysis of TIL could be explored as an indication of prognostic marker to treatment of patients with breast cancer.

**Key-words:** Breast Neoplasms. Triple Negative Breast Neoplasms. Survival Analysis. Immunohistochemistry. Lymphocytes, Tumor-Infiltrating



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Taxa de incidência e mortalidade estimada por idade em mulheres .....	1
<b>Figura 2</b>	Taxa de incidência e mortalidade distribuída por região geográfica e estimada por idade em mulheres .....	2
<b>Figura 3</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma .....	3
<b>Figura 4</b>	Distribuição dos subtipos de câncer de mama triplo negativos .	6
<b>Figura 5</b>	Tamanho do tumor .....	8
<b>Figura 6</b>	Classificação dos linfonodos .....	9
<b>Figura 7</b>	Grupos do Estadiamento .....	10
<b>Figura 8</b>	Fatores prognósticos relacionados ao câncer de mama.....	11
<b>Figura 9</b>	O ciclo imunológico do câncer .....	14

<b>Figura 10</b>	Mecanismo de evasão tumoral.....	15
<b>Figura 11</b>	Diagrama do ambiente imune no câncer de mama.....	16
<b>Figura 12</b>	Marcadores moleculares e subpopulações do infiltrado linfocitário tumoral.....	17
<b>Figura 13</b>	Composição de leucócitos no tumor em comparação com o tecido normal .....	19
<b>Figura 14</b>	Localização dos linfócitos em relação às células tumorais em aumento de 400x.....	20
<b>Figura 15</b>	Representação de lâmina com subdivisão de componentes ....	25
<b>Figura 16</b>	Abordagem padronizada para avaliação de TILs em câncer de mama .....	26
<b>Figura 17</b>	Padronização e diretrizes para avaliação de TILs.....	27
<b>Figura 18</b>	Fotomicrografia histopatológica do TIL em aumento de 400x....	28
<b>Figura 19</b>	Microscópio ZEISS Axio Imager 2.....	30

<b>Figura 20</b>	Delimitação dos componentes intra e extra tumoral .....	31
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografia de tecido mamário marcado por imunohistoquímica.....	32
<b>Figura 22</b>	Máscara em preto e branco gerada após análise de colorimetria .....	33
<b>Figura 23</b>	Máscara gerada após adição de cores à máscara em preto e branco.....	33
<b>Figura 24</b>	Porcentagem de objetos obtidos após adição de cores.....	33
<b>Figura 25</b>	Fluxograma da inclusão das pacientes no presente estudo .....	35
<b>Figura 26</b>	Fluxograma de eventos ocorridos .....	36
<b>Figura 27</b>	Distribuição dos pacientes de acordo com a cor da pele .....	39
<b>Figura 28</b>	Avaliação da concordância entre medidas do TIL dos dois avaliadores .....	40
<b>Figura 29</b>	Curva de sobrevida geral.....	41
<b>Figura 30</b>	Sobrevida global segundo a classificação do TIL .....	42

<b>Figura 31</b>	Distribuição dos pacientes de acordo com a média dos linfócitos.....	45
<b>Figura 32</b>	Distribuição dos percentuais de células com marcação de CD3+ e CD8+ segundo a localização no tumor (extra e intra tumoral).....	45
<b>Figura 33</b>	Distribuição dos percentuais de células com marcação de CD3+ segundo as características do tumor .....	46
<b>Figura 34</b>	Distribuição dos percentuais de células CD8+ segundo as características do tumor .....	47
<b>Figura 35</b>	Sobrevida geral segundo os percentuais de CD3+ extra tumoral: 6,2.....	48

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Características basais dos pacientes e tumores avaliados ....	37
<b>Tabela 2</b>	Características Tumorais .....	38
<b>Tabela 3</b>	Procedimentos Cirúrgicos Realizados .....	39
<b>Tabela 4</b>	Análise de concordância de TILs considerando dois pontos de corte .....	41
<b>Tabela 5</b>	Associação entre as variáveis clínicas e patológicas e porcentagem do TIL .....	43
<b>Tabela 6</b>	Risco de morte associado com o TIL .....	44
<b>Tabela 7</b>	Risco de óbito segundo os níveis de CD3 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> extra e intra .....	49
<b>Tabela 8</b>	Risco de óbito segundo as variáveis clínico-patológicas .....	50

## LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ACT</b>	Adriamicina Ciclofosfamida Taxotere
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Cancer Comitee</i>
<b>BLS</b>	Biópsia de Linfonodo Sentinela
<b>CD</b>	Cluster de Diferenciação
<b>CDI-SOE</b>	Carcioma Ductal Invasivo Sem Outra Especificação
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CMTN</b>	Câncer de Mama Triplo-Negativo
<b>CTLA-4</b>	Antígeno citotóxico associado a linfócitos T-4
<b>DAMPS</b>	Padrões Moleculares Associados a Danos
<b>ET</b>	Extra Tumoral
<b>FAC</b>	5-fluoracil Adriamicina Ciclofosfamida
<b>FISH</b>	<i>Fluorescent In Situ Hybridation</i>
<b>HCP</b>	Hospital de Câncer de Pernambuco
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HER-2</b>	Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
<b>HR</b>	<i>Hazard Ratio</i>
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança de 95%
<b>ICC</b>	Coeficiente de correlação intraclasse
<b>IDO</b>	Indoleamine 2,3 Dioxygenase
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>IL</b>	Inter Leucina
<b>IT</b>	Intra Tumoral
<b>ITWG</b>	<i>International TILs Working Group</i>
<b>LIKA</b>	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
<b>MHC</b>	Complexo de Histocompatibilidade
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>PD-L1</b>	Ligante de morte celular programada-1
<b>SAME</b>	Serviço de Atendimento Médico

<b>SLD</b>	Sobrevida Livre de Doença
<b>SG</b>	Sobrevida Global
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RH</b>	Receptores Hormonais
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>RR</b>	Risco Relativo
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento Transformante Beta
<b>TIL</b>	Infiltrado linfocitário tumoral
<b>T h</b>	T-helper
<b>TLS</b>	Tertiary Lymphoid Structure (Estrutura Linfóide Terciária)
<b>TN</b>	Triplo Negativo
<b>T reg</b>	T-regulatório
<b>VEFG</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b><math>\chi^2</math></b>	Qui <sup>2</sup>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia do Câncer de Mama.....	1
1.2	Tipos Histológicos .....	3
1.3	Classificação Molecular.....	4
1.4	Câncer de Mama Triplo Negativo .....	5
1.5	Diagnóstico.....	7
1.6	Tratamento .....	8
1.7	Fatores Prognósticos e Preditivos.....	11
1.8	Noções de Imunologia .....	12
1.9	Infiltrado Linfocitário Tumoral .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos .....	22
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
3.1	Pacientes.....	23
3.2	Coloração Hematoxilina-Eosina .....	24
3.3	Quantificado do Infiltrado Linfocitário Inflamatório.....	25
3.4	Imunomarcção com os anticorpos CD3+ e CD8+ .....	29
3.5	Histofometria Computadorizada .....	30
3.6	Análise Morfométrica Computadorizada.....	31
<b>4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>



<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

### **ANEXOS**

**Anexo 1** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

**Anexo 2** Carta de Anuência

### **APÊNDICES**

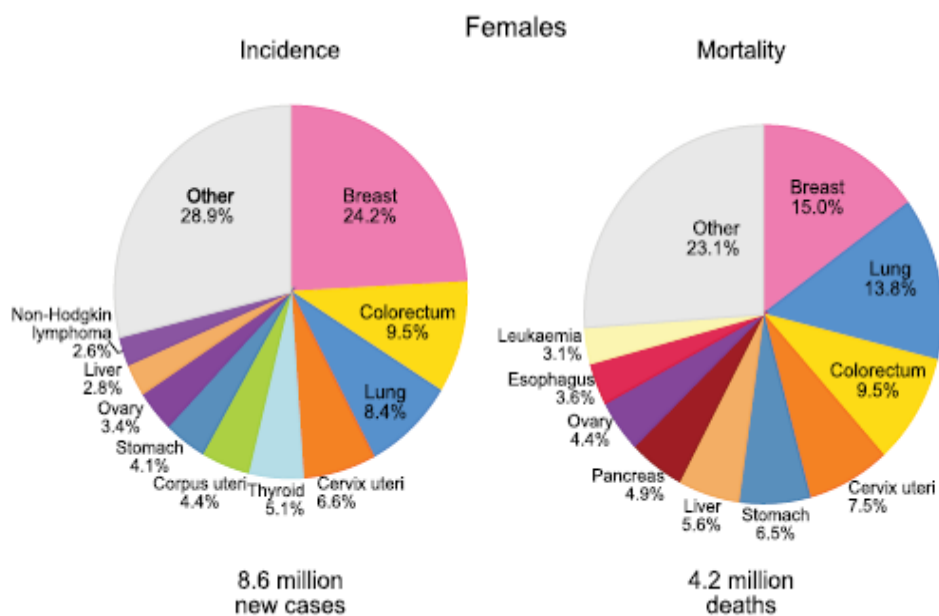
**Apêndice 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Apêndice 2** Técnica de Histofotometria Computadorizada

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

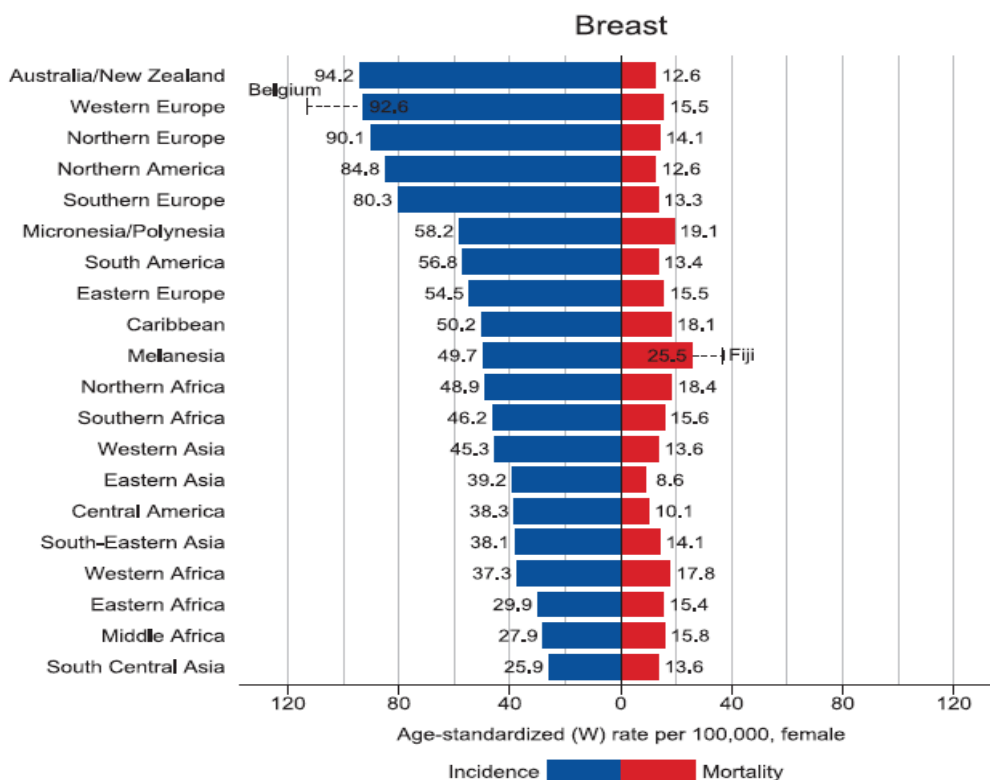
O câncer de mama é a neoplasia mais frequentemente diagnosticada no mundo e está relacionada à maior taxa de mortalidade. O GLOBOCAN estimou, para o ano de 2018, a detecção de 2,1 milhões de novos casos no mundo, e a ocorrência de aproximadamente 630 mil óbitos. Observam-se na Figura 1 que a incidência do câncer de mama é significativamente maior quando comparada a todos os outros tumores (BRAY et al. 2018).



Fonte: BRAY et al. (2018).

**Figura 1** - Taxa de incidência e mortalidade estimada por idade em mulheres.

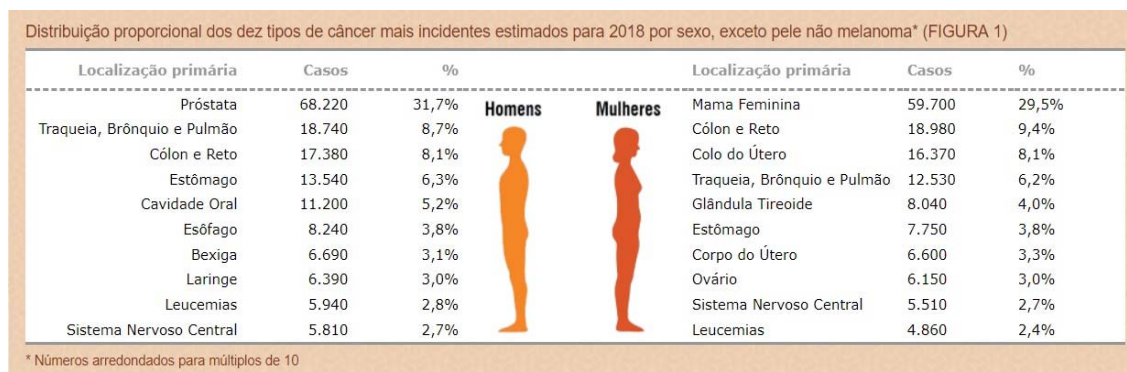
O câncer de mama é uma doença de grande incidência em países desenvolvidos.



Fonte: BRAY et al. (2018).

**Figura 2** - Taxa de incidência e mortalidade distribuída por região geográfica e estimada por idade em mulheres.

Os países localizados especialmente na América do Sul, Ásia e África, ainda não vivenciaram redução da mortalidade, uma vez que não estão disponíveis programas eficazes de rastreamento adequado ou terapia mais adequada. (SIEGEL et al. 2018). A estimativa para o ano de 2018, no Brasil, é de 59700 novos casos de câncer de mama, representando cerca de 30% dos tumores, enquanto que em Pernambuco é de 2680 novos casos (Ministério da Saúde 2018). (Figura 3).



**Fonte:** Ministério da Saúde (2018).

**Figura 3** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

No Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP-PE), em Recife - PE, durante o período do estudo, de 2009 a 2013, foram atendidos 3699 pacientes, 3345 desses casos foram diagnosticados como carcinoma invasivo de mama. Neste período, foram identificados 401 pacientes com câncer de mama triplo-negativo, sendo 87 com estadiamento inicial, os quais foram objeto do estudo.

## 1.2 TIPOS HISTOLÓGICOS

O câncer invasivo da mama constitui um grupo heterogêneo de lesões, que diferem na apresentação clínica, achados histopatológicos e moleculares, assim como potencial biológico. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a classificação deve ser baseada no padrão de crescimento e nas características citológicas das células tumorais invasivas, não indicando necessariamente o local de origem, dentro ou fora do ducto

mamário. O subtipo mais comum é o carcinoma mamário ductal invasivo (CMDI), porém, esse diagnóstico é considerado de exclusão, uma vez que não é possível enquadrá-lo em nenhuma das demais categorias de carcinoma mamário invasivo. Devido a essa característica, alguns autores o denominam como *carcinoma mamário invasivo ou infiltrativo sem outra especificação* (SOE) (CORBEN 2013). Os demais 20% a 30% dos carcinomas mamários invasivos apresentam características específicas e especiais em 90% do tumor, e são exemplificados pelos: carcinoma lobular, tubular, mucinoso, papilar, entre outros (ELLIS et al. 1992).

### **1.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR**

Foi evidenciado que tumores mamários com histologia e estadiamento clínico semelhantes, podiam evoluir com diferentes prognósticos, o que seria justificado pela existência de diferenças moleculares. Com a avaliação complementar através de microarranjos de ácido ribonucleico (RNA), e consequente análise de milhares de genes, foram identificados cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, superexpressão de HER-2, basalóide e mama-normal like (PEROU et al. 2000; SØRLIE et al. 2001). A imuno-histoquímica (IHQ), por sua vez, através da soma de resultados decorrentes da avaliação da positividade dos receptores hormonais, do HER-2 e do índice de proliferação celular (Ki67), permitiu identificar, de forma mais facilitada, quatro subtipos, sendo excluído o mama-normal like (RAKHA et al. 2010).

Os tumores luminais representam 70% de todos os tumores, se caracterizam pela positividade dos receptores hormonais, sendo elegíveis para terapia antiestrogênica. Em torno de 12% a 20% apresentam amplificação do gene HER-2 ou superexpressão da proteína, estando associados a um pior prognóstico, embora atualmente haja disponibilidade de terapia alvo anti-HER-2 (CAREY et al. 2006). Aproximadamente 10% a 15% não apresentam nenhum dos receptores positivos, sendo, portanto, classificados como triplo negativos (HAMMOND et al. 2010; WOLF et al. 2013).

#### **1.4 CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO**

O CMTN significa um grupo diverso de tumores, e classificá-los em subtipos é necessário para melhor identificar terapias moleculares de base. O CMTN geralmente surge em pacientes mais jovens, os tumores apresentam alto grau, elevada taxa de recorrência e lesões à distância, assim como óbito nos primeiro três a cinco anos do diagnóstico. O pior prognóstico desse tumor também se associa a ausência de terapia alvo.

Inicialmente, os tumores triplo-negativos foram classificados por *Lehmann*, baseado na expressão gênica em seis subtipos: basal-like 1 (BL-1), basal-like 2 (BL-2), imunomodulatory (IM), mesenchimal-like (M), mesenchimal-stem like (MSL-L) e luminal androgen receptor (LAR). Os seis subtipos identificados foram submetidos a terapias farmacológicas alvo, mostrando que a avaliação da assinatura gênica pode informar a terapia

selecionada. BL-1 e BL-2 têm altas taxas de lesões em gens responsáveis pelo ciclo celular, e respondem a tratamento com cisplatino. Os subtipos M e MSL são ricos em gens da transição epitélio-mesênquima, e em modelos celulares, responde a tratamento com desatinib e inibidores (pi3k/mTOR). O subtipo LAR inclui pacientes com receptores de andrógeno, sensíveis a bicalutamida (antagonista de receptor de andrógeno) (LEHMANN et al. 2011).

Recentemente, *Lehmann* revisou esta classificação e definiu a existência de apenas quatro subtipos: BL-1, BL-2, M e LAR, baseado na adição ao perfil de expressão gênica, a quantificação histopatológica e captura a laser. Foi identificada a presença de infiltrado linfocitário em todos os subtipos, em diferentes percentagens (Figura 4) (LEHMANN et al. 2016). Pode-se concluir, a partir dessa atualização, que o sistema imune exerce um importante papel na definição da progressão dos tumores triplo-negativos (SARAIVA et al. 2017).



Fonte: LEHMANN et al. (2011)



Fonte: LEHMANN et al. (2016)

**Figura 4** - Distribuição dos subtipos de câncer de mama triplo-negativo.

A abordagem terapêutica moderna para esses tumores é feita com a utilização de quimioterapia neoadjuvante na maior parte dos casos,

utilizando esquemas à base de antraciclina, taxanos e agentes alquilantes. Os princípios para terapia local são os mesmos dos tumores não triplo-negativos, podendo ser utilizado tratamento conservador com radioterapia quando indicados. Taxas de mastectomia estão aumentando nos Estados Unidos, nesse tipo de tumor (SHARMA 2018).

## **1.5 DIAGNÓSTICO**

Para o diagnóstico do câncer de mama, é essencial que a história clínica esteja associada ao exame físico detalhado. Os exames de imagens são de grande importância, representados principalmente pela mamografia e ultrassonografia. A ressonância magnética das mamas pode ser solicitada apenas em casos selecionados. Para confirmação diagnóstica, é essencial a realização da avaliação histopatológica, geralmente realizado por meio de biópsia, utilizando agulha grossa, de calibre 12 ou 14, acoplado a uma pistola automática, sendo retirados vários fragmentos para melhor avaliação histológica.

Em algumas lesões podem-se utilizar biópsias percutâneas através do mamótomo, um aparelho que utiliza cânulas calibre 8 ou 11 acoplados a um dispositivo a vácuo (AGUILLAR et al. 2009).

É possível utilizar, ainda, biópsia incisional, onde é retirada, de maneira cirúrgica, apenas uma parte da lesão para diagnóstico, ou biópsia excisional onde é retirada toda a lesão (ROSEN 1991). Em todos estes procedimentos é possível fazer uma avaliação do TIL presente nas margens invasivas do tumor.



## 1.6 TRATAMENTO

O tratamento do câncer de mama envolve algumas modalidades terapêuticas, dentre elas: a cirurgia e a radioterapia, como tratamento local; além da quimioterapia, hormonioterapia e terapia anti-HER-2, como tratamento sistêmico. O tratamento sistêmico, assim como a radioterapia, pode ser realizado antes da cirurgia, sendo considerada terapia neoadjuvante, ou após a cirurgia, sendo considerada terapia adjuvante.

A decisão do tipo de tratamento baseia-se principalmente no estadiamento da doença. O estadiamento do câncer de mama é baseado em três parâmetros. O “T” representa a medida do maior diâmetro do tumor, medido através do exame clínico, exame de imagem, ou avaliação anatomopatológica, sendo categorizado de acordo com a Figura 5.

T1	Tumor ≤20 mm in greatest dimension
T1mi	Tumor ≤1 mm in greatest dimension
T1a	Tumor >1 mm but ≤5 mm in greatest dimension (round any measurement >1.0–1.9 mm to 2 mm).
T1b	Tumor >5 mm but ≤10 mm in greatest dimension
T1c	Tumor >10 mm but ≤20 mm in greatest dimension
T2	Tumor >20 mm but ≤50 mm in greatest dimension
T3	Tumor >50 mm in greatest dimension
T4	Tumor of any size with direct extension to the chest wall and/or to the skin (ulceration or macroscopic nodules); invasion of the dermis alone does not qualify as T4
T4a	Extension to the chest wall; invasion or adherence to pectoralis muscle in the absence of invasion of chest wall structures does not qualify as T4
T4b	Ulceration and/or ipsilateral macroscopic satellite nodules and/or edema (including peau d'orange) of the skin that does not meet the criteria for inflammatory carcinoma
T4c	Both T4a and T4b are present
T4d	Inflammatory carcinoma (see section “Rules for Classification”)

Fonte: AMIN et al. (2017).

**Figura 5** - Tamanho do tumor.

O “**N**” representa a presença ou não de comprometimento axilar, a localização dos linfonodos ou comprometidos, ou se estão móveis ou fixos, uns aos outros (Figura 6). O “**M**”, por sua vez, representa o acometimento de órgãos a distância.

N Category	N criteria (clinical)
cN0	No regional lymph node metastases (by imaging or clinical examination)
cN1	Metastases to movable ipsilateral level I-II axillary lymph nodes
cN2	Metastases to ipsilateral level I-II axillary lymph nodes that are clinically fixed or matted, or to ipsilateral internal mammary nodes without axillary lymph node involvement <ul style="list-style-type: none"> <li>• cN2a: metastases to ipsilateral level I-II axillary nodes that are clinically fixed or matted</li> <li>• cN2b: metastases to ipsilateral internal mammary nodes without axillary nodal involvement</li> </ul>
cN3	Metastases to ipsilateral infraclavicular (level III axillary) lymph nodes, to ipsilateral internal mammary lymph nodes with level I-II axillary lymph node metastases, or to ipsilateral supraclavicular lymph nodes <ul style="list-style-type: none"> <li>• cN3a: metastases to ipsilateral infraclavicular (level III axillary) nodes with or without level I-II axillary nodal involvement</li> <li>• cN3b: metastases to ipsilateral internal mammary nodes with level I-II axillary nodal metastases</li> <li>• cN3c: metastases to ipsilateral supraclavicular nodes with or without axillary or internal mammary nodal involvement</li> </ul>

Fonte: AMIN et al. (2017).

**Figura 6** - Classificação dos linfonodos.

Após análise combinada desses três parâmetros, os tumores de mama são organizados em grupos com prognósticos semelhantes, sendo considerados tumores em estágio inicial aqueles pertencentes à categoria I e II (Figura 7).

When T is...	And N is...	And M is...	Then the stage group is...
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T0	N2	M0	IIIA
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Any T	N3	M0	IIIC
Any T	Any N	M1	IV

**Fonte:** AMIN et al. (2017).

**Figura 7** - Grupos do Estadiamento.

O tratamento sistêmico dos pacientes com tumores iniciais do câncer de mama resultou em melhoras na sobrevida livre de doença (SLD), e sobrevida global (SG), assim como realização de maior número de cirurgias conservadoras, devido à maior taxa de redução tumoral com o advento de novas terapias sistêmicas neoadjuvantes.

A escolha da terapia deve levar sempre em consideração os riscos e benefícios, uma vez que terapias mais agressivas associam-se muitas vezes a maior incidência de efeitos colaterais. Apesar dos avanços terapêuticos, destaca-se que tumores com grandes volumes ou linfonodos comprometidos tem chance maior de recorrência. (SCHWARTZ et al. 1994; BYCHKOVSKY e LIN 2017).

## 1.7 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS

O conhecimento desses fatores é importante para a seleção do tratamento mais adequado. Fatores prognósticos são aqueles que podem ser avaliados no momento do diagnóstico, sendo independentes do tratamento escolhido, fornecendo informações que permitem estimar o risco de recidiva e de morte (Figura 8). Já os fatores preditivos informam quais os pacientes mais propensos a responderem a determinado tratamento, sendo representados pelos receptores hormonais e HER-2 (SIMPSON et al. 2000).

Idade da Paciente
Status Menopausal
Raça
Tamanho do Tumor
Status Linfonodal
Invasão Linfovascular
Extensão Extra Capsular em Metástase Ganglionar
Grau Tumoral
Estágio do Tumor
Fenótipo Inflamatório
Marcadores de Proliferação (Ki67)
Receptores Hormonais
Status HER2

Fonte: HARRIES et al. (2010).

**Figura 8** - Fatores prognósticos relacionados ao câncer de mama.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas de perfil genômico tem identificado padrão de expressão gênica em tumores da mama com distintos perfis moleculares, status patológico e desenrolar clínico. Eles podem ser utilizados como ferramentas para avaliar prognóstico e predição

de resposta, sendo cada vez mais utilizados na prática clínica para decisões terapêuticas (SPARANO et al. 2018).

## **1.8 NOÇÕES DE IMUNOLOGIA**

O sistema imune é dividido em inato e adaptativo. A imunidade inata é ativada quando exposta a estruturas moleculares compartilhadas por grupos de microrganismos, e por moléculas expressas por células do hospedeiro danificadas. Já a resposta adaptativa é específica para cada agente agressor, sendo amplificada diante de exposições repetidas (memória imunológica). As células que realizam a maior parte das funções efetoras tanto da imunidade inata, quanto adaptativa, incluem fagócitos (representados pelos macrófagos e neutrófilos), as células apresentadoras de antígenos (incluem macrófagos e células dendríticas) e os linfócitos (ABBAS et al. 2015).

Os linfócitos B e T expressam receptores de antígenos diversos e específicos, e são diretamente responsáveis pela memória das respostas imunes adaptativas. Ambos os linfócitos se originam de um precursor na medula óssea. O desenvolvimento da célula B prossegue na medula óssea, enquanto os precursores da célula T migram e amadurecem no timo.

Após a maturação de ambos os linfócitos, eles migram para a circulação, sendo capazes de alcançar os tecidos linfóides periféricos. Ao serem novamente estimuladas por antígenos, às células B e T imaturas se tornam efetoras, e passam a desempenhar funções nas respostas imunes

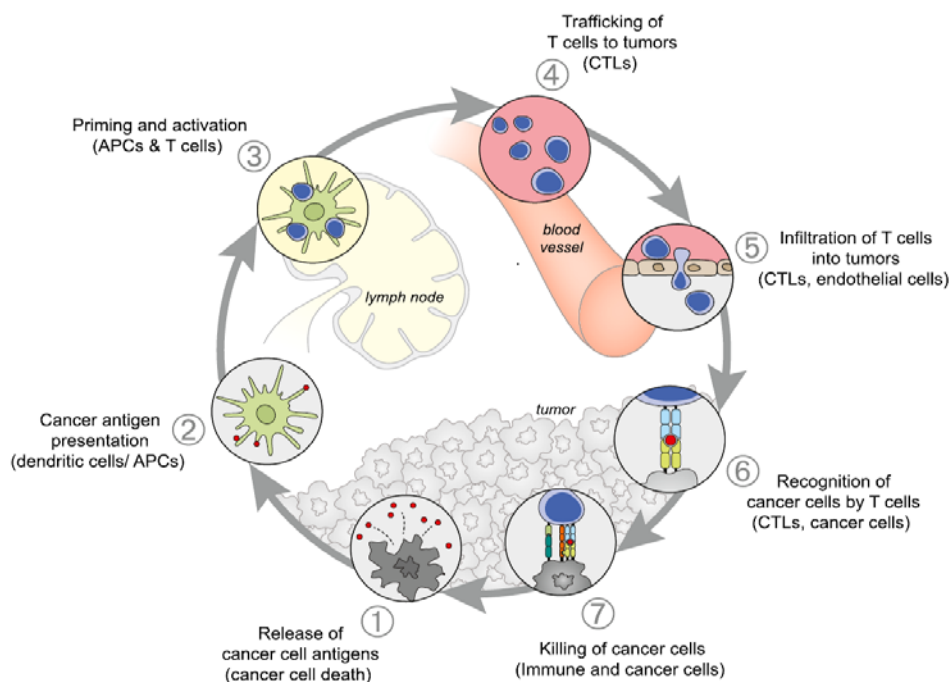
protetoras. Os linfócitos B efetores são plasmócitos secretores de anticorpos. Já os linfócitos T são representados pelas células T CD4<sup>+</sup>, secretoras de citocinas, e T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, capazes de matar as células contaminadas por vírus ou células tumorais (VAN ROOIJEN et al. 2015).

O principal mecanismo de proteção imune adaptativa contra tumores está na eliminação de células tumorais, por linfócitos CD8<sup>+</sup>, reconhecendo e destruindo células potencialmente malignas que expressam peptídeos derivados de antígenos tumorais, que são apresentados associados a moléculas do NHC de classe 1.

Esta resposta de células T CD8<sup>+</sup>, específicos para antígenos tumorais, pode exigir uma apresentação cruzada pelas células dendríticas.

A importância das células TCD4<sup>+</sup>, auxiliares na imunidade tumoral, pode estar associada à liberação de citocinas, para diferenciação de células TCD8<sup>+</sup> e de memória em linfócitos efetores.

A eliminação do tumor pelos mecanismos citados corresponde, ao que chamamos, de fase de eliminação (Figura,9) (CHEN e MELLMAN 2013).

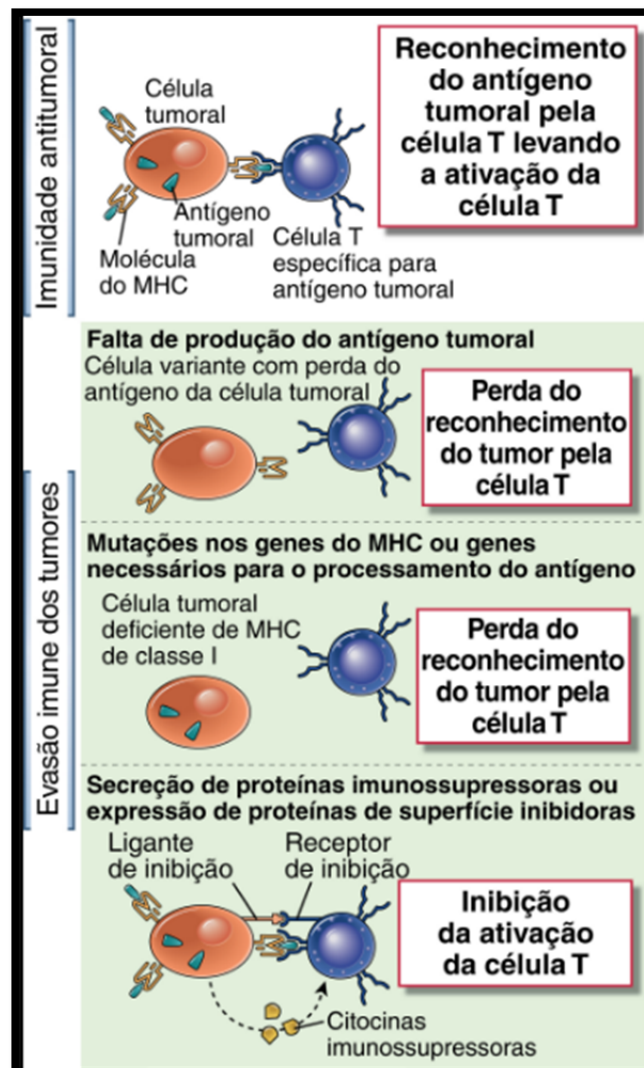


**Fonte:** CHEN e MELLMAN (2013).

**Figura 9** - O ciclo imunológico do câncer.

Algumas células tumorais podem sobreviver à fase de eliminação e entrar numa fase de equilíbrio, na qual o sistema imune mantém as células tumorais em um estado de latência, que podem persistir por décadas, antes, de eventualmente, reassumir o crescimento como tumor primário recorrente ou doença metastática. Muitos tumores malignos desenvolvem mecanismos que lhes permitem escapar das respostas imunes antitumorais.

Entre os mecanismos de crescimento do tumor, está a perda de expressão de antígeno, resultando na sobrevivência e crescimento de células tumorais variantes com imunogenicidade reduzida, e o outro corresponde à inibição da ativação das respostas imunes através de vias de sinalização, como CTLA – 4 e PD – 1, duas vias de inibição originadas das células T (SCHREIBER et al. 2011; ABBAS et al. 2015) (Figura 10).



Fonte: ABBAS et al. (2015)

**Figura 10** - Mecanismo de evasão tumoral.

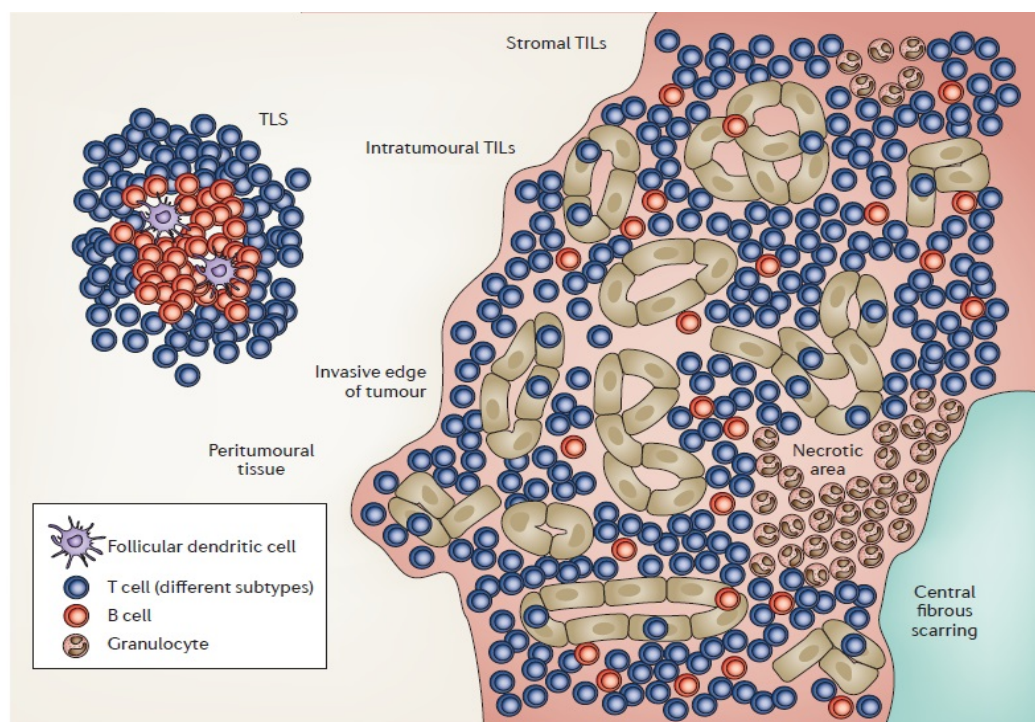
O mecanismo de evasão tumoral consiste da perda de expressão de antígenos ou moléculas do NHC, ou pela produção de ligantes para receptores inibidores das células T e citocinas imunossupressoras do reconhecimento do tumor e inibição da ativação da pela célula T.



Esta resposta imune tumoral está fortemente evidenciada em tumores em humanos, que correlacionam à quantidade, qualidade e distribuição espacial do TIL com a sobrevivência do paciente (SCHREIBER et al. 2011).

## 1.9 INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL

O microambiente tumoral é uma rede dinâmica que inclui células tumorais, tecido estromal (células imunes, fibroblastos, miofibroblastos, citocinas e tecido vascular) e matriz extracelular, conforme demonstrado na Figura 10.



Fonte: SAVAS et al. (2016).

**Figura 10** - Diagrama do ambiente imune no câncer de mama. TLS (estrutura linfóide terciária) localizada fora do tumor; Células T (em azul), localizadas intratumoral e estromal; Células B (em vermelho); e Granulócitos, principalmente localizados em área de necrose.

O TIL corresponde a um aglomerado de células imunes mononucleares, presentes dentro e ao redor dos tumores. Dentre as células imunes encontradas no tumor, estão as da imunidade adaptativa, representadas pelos linfócitos T, linfócitos B e as células dendríticas; e as da imunidade inata, representadas pelos macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e natural killer (NK). Foi identificado que o tumor mamário apresentava um infiltrado dominado por linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), incluindo tanto o T (CD8<sup>+</sup>), quanto o T (CD4<sup>+</sup>), e composto por proporção bem menor de linfócitos B. (Figura 12) (SAVAS et al. 2016).

Cell	Markers	Subtypes	Normal function	Checkpoint markers	Known/suspected function in tumour microenvironment	Proportion of TILs
Cytotoxic T cells	CD3, CD8	NA	Cytolysis of virally infected cells	PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM3, OX40	Cytolysis of tumour cells	~20%
Helper T cells	CD3, CD4	T <sub>H</sub> 1	Response to intracellular pathogens	OX40	Support CD8 <sup>+</sup> T cells by secreting IFN $\gamma$	~40%
		T <sub>H</sub> 2	Response to parasites	NA	Associated with ineffective antitumour immunity	
		T <sub>H</sub> 17	Response to fungi and extracellular bacteria	NA	Antitumour and protumour effects	
		T <sub>FH</sub>	B-cell help	NA	Role in tertiary lymphoid structures	
		T <sub>REG</sub>	Self-tolerance	CTLA-4	Tolerance of tumour antigens	
B cells	CD19, CD20	NA	Antibody production	NA	Antitumour antibodies Possible direct cytotoxic action	<20%
Macrophages	CD14, CD11b, HLA-DR	M1	Inflammation and response to intracellular pathogens	IDO	Secretion of antitumour cytokines	<5%
		M2	Wound response, angiogenesis	NA	Immunosuppressive cytokines, angiogenesis	
NK cells	CD16, CD56, NKG2D	NA	Innate immunity	IDO	Killing of tumour cells	<5%
Dendritic cells	CD135, Flt3, CD117, CD26, CD103	NA	Antigen presentation Co-stimulation	IDO	Cross presentation of tumour peptide antigens	1%

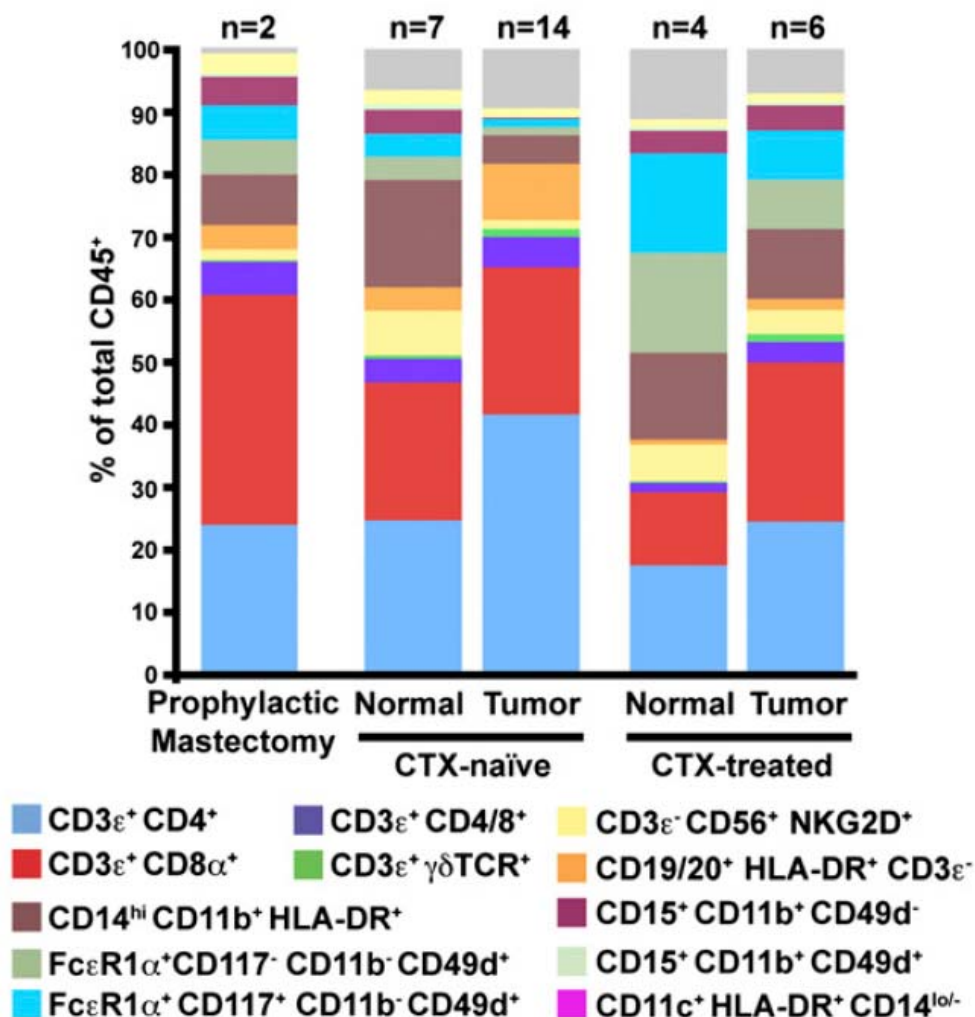
Fonte: SAVAS et al. (2016).

**Figura 12** - Marcadores moleculares e subpopulações do infiltrado linfocitário tumoral.

Existem varias maneiras de avaliação do TIL. Pode-se utilizar o método morfológico, comparando densidade em laminas de Hematoxilina & Eosina (H&E), sendo um método simples, de baixo custo, necessitando apenas o treinamento do patologista. A IHQ pode localizar subtipos celulares, porém, necessita de imagens, elevando o custo do método. Outros métodos utilizados são a imunofluorescência e a expressão gênica (DENKERT et al. 2016).

O tecido mamário normal não contém grandes quantidades de linfócitos. Os tumores de mama e seu estroma adjacente apresentam altos níveis de infiltrado celular imune. Os TILs são mais comumente encontrados em tumores triplos negativos (TN) e HER-2 positivo. Nos tumores TN, encontramos em média 20% de TIL (SAVAS et al. 2015).

Em um dos estudos que avaliou a composição dos leucócitos no câncer de mama, foi realizada uma comparação entre os tecidos normais e os tecidos neoplásicos (submetidos ou não à quimioterapia). As amostras teciduais foram avaliadas por meio de citometria de fluxo policromática, em combinação com imunofluorescência e imuno-histoquímica. O estudo revelou predominância de linfócitos no tumor, enquanto que no tecido normal houve maior identificação de células da linhagem mielóide (RUFFELL et al. 2012). (Figura 13).

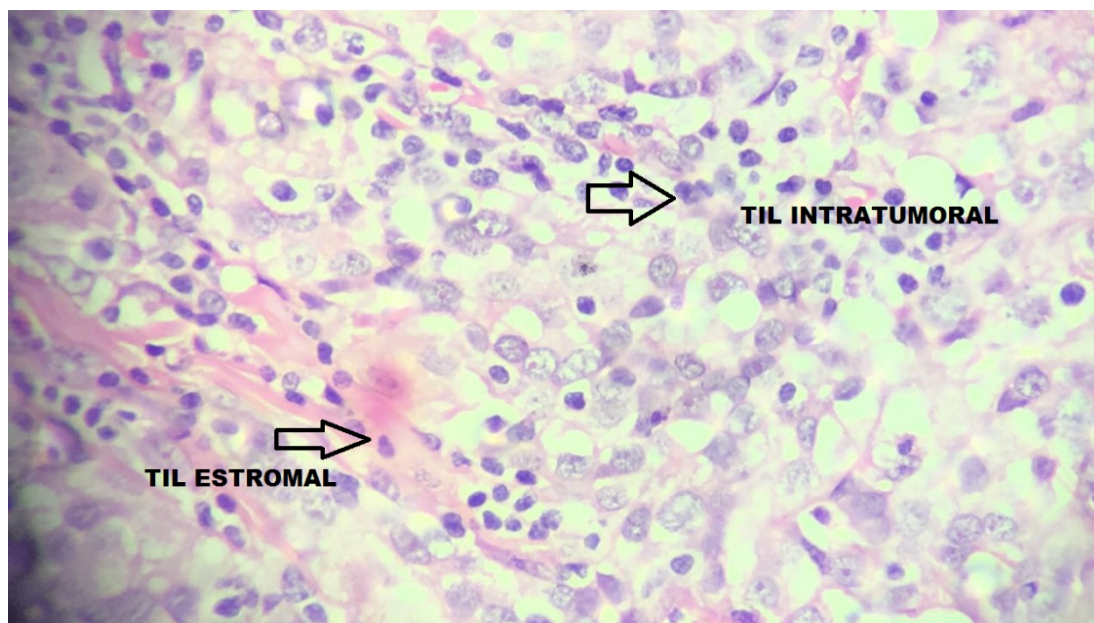


Fonte: RUFFELL et al. (2012).

**Figura 13** - Composição de leucócitos no tumor em comparação com o tecido normal. Linhagem linfóide: linfócitos T CD3<sup>+</sup>; linfócitos CD19; a linhagem mielóide: macrófagos CD14, mastócitos CD17, neutrófilos CD15, células dendríticas CD11.

A localização do infiltrado linfocitário tumoral (TIL) pode ser analisada segundo a proximidade com a célula maligna. Foi denominado TIL intratumoral (TIL IT), quando mantém contato célula a célula, interagindo diretamente com a célula maligna. Enquanto TIL estromal foi denominado quando localizado disperso no estroma, sem contato direto com a célula

maligna. Ambas as categorias representam TILs verdadeiros por se encontrarem no ambiente tumoral (HENDRY et al. 2017). (Figura 14)



Fonte: Acervo do HCP - PE.

**Figura 14** - Localização dos linfócitos em relação às células tumorais em aumento de 400x.

Os tumores TN, geralmente apresentam infiltrado linfocitário tumoral (TIL) mais evidente que os luminais, sendo um biomarcador de imunogenicidade robusto (RAKHA et al. 2010).

Vários estudos têm evidenciado que valores elevados dos TILs estão associados a um melhor desfecho clínico, podendo identificar aqueles que possuem maior capacidade de resposta à quimioterapia entre os tumores TN (CAREY et al. 2006; LEHMANN et al. 2011 2016; SARAIVA et al. 2017).

Vários esforços têm sido realizados a fim de encontrar uma terapia-alvo efetiva contra os tumores TN, onde a avaliação do TIL tem importância

como fator prognóstico e preditivo de resposta terapêutica (PRUNERI et al. 2016).

Muitos estudos retrospectivos têm mostrado associação positiva entre alto TIL e prognóstico, e resposta terapêutica, porém as evidências mais robustas tem sido de estudos prospectivos (SIMON et al. 2009).

Pacientes portadores de câncer de mama TN tem uma relação linear entre número de TIL e SG, como evidenciado nos *trials* no Big 2-98 e FinHER (LOI et al. 2013, 2014).

O TIL pode ser avaliado por imuno-histoquímica e os subtipos de linfócitos podem ser identificados tanto em quantidade, quanto em localização no ambiente tumoral.

Atualmente, os tumores triplo-negativos, além de apresentarem comportamento agressivo, não possuem terapia alvo. Sendo de grande importância a investigação de componentes do sistema imunológico no microambiente tumoral (FORTIS 2017).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a presença do TIL em tumores de mama estágio inicial do subtipo molecular triplo negativo, e a sua associação ao tempo de sobrevida global.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estimar a incidência de mulheres com diagnóstico histopatológico de câncer de mama do subtipo triplo negativo no período do estudo;
- Caracterizar a população do estudo de acordo com fatores biológicos, sociodemográficos e clínicos;
- Identificar a composição do TIL em lâminas através da coloração H&E em uma gradação percentual, avaliando concordância interobservador e relação com SG;
- Determinar os percentuais das células linfocitárias T CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, localizados dentro e fora da margem tumoral, através do método de imuno-histoquímica no infiltrado tumoral, correlacionando com SG.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 PACIENTES**

Inicialmente, foram selecionadas 89 pacientes com Câncer de Mama do tipo Triplo Negativo (CMTN) em estágios I e II, diagnosticadas entre janeiro de 2009 e dezembro de 2013, no Hospital de Câncer de Pernambuco, Recife – Pernambuco (HCP-PE). Para coleta dos dados das pacientes incluídas no estudo, foram solicitados os prontuários após autorização por parte do Serviço de Atendimento Médico (SAME), de acordo com o número CAAE 60457916300005205 (Anexo 1).

As amostras incluídas neste trabalho foram previamente classificadas através da imuno-histoquímica, para receptores hormonais (estrógeno e progesterona), e do receptor HER-2, para identificação do tipo de tumor mamário. As amostras que apresentaram HER-2 <sup>++</sup> foram encaminhadas para laboratório privado em São Paulo, para realização do FISH.

Nos critérios de inclusão dos pacientes com tumores triplo negativos, diagnosticados neste período, tivemos: os tumores com estágio inicial I, II; pacientes sem histórico de doença neoplásica anterior. E como critério de exclusão: pacientes com informações incompletas nos prontuários; pacientes de subtipo luminal ou HER 2 positivo; pacientes com interrupção do seguimento antes do ano de 2014; diagnóstico de câncer de mama prévio



ao ano de 2009; pacientes com lâminas em mau estado de conservação impossibilitando uma adequada avaliação do TIL.

No período entre março de 2017 e janeiro de 2018, as respectivas lâminas foram confeccionadas a partir de amostras tumorais provenientes de biópsias incisionais e excisionais, como também *core biopsy*, coradas com H&E, e submetidas à análise do TIL estromal por dois patologistas de modo cego e independentes (SWISHER et al. 2016).

Na etapa seguinte, essas lâminas foram submetidas a um processo de imuno-histoquímica para os linfócitos CD3 e CD8, marcando assim, as três áreas na margem invasiva do tumor.

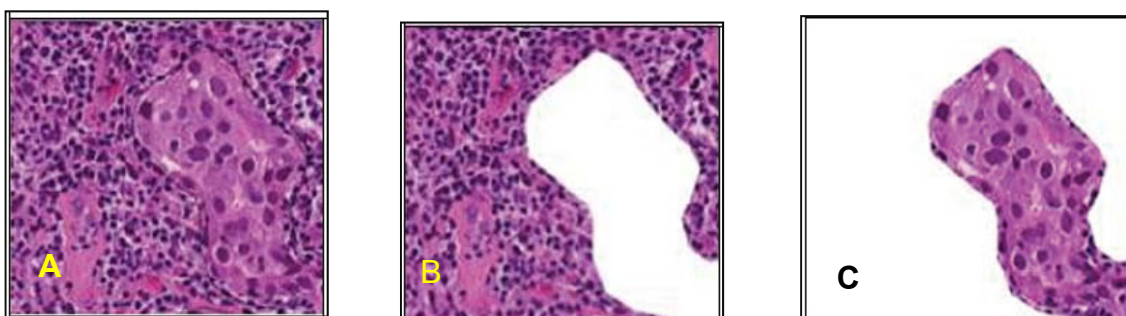
### **3.2 COLORAÇÃO HEMATOXILINA & EOSINA (H&E)**

Os blocos parafinizados foram resfriados a 10°C, e cortados na espessura de 4 µm utilizando o micrótomo (*Leika® - Jung RM 2025*). Em seguida, as lâminas com tecido foram mantidas em uma estufa, por 5 minutos, na temperatura de 60°C, para remover o excesso da parafina. Antes da coloração, foi necessário realizar uma nova diafanização, utilizando dois banhos de Xilol por cinco minutos, e um processo de hidratação do tecido, com sequência decrescente de concentração alcoólica, iniciando em álcool etílico a 100%, e dando sequência com álcool a 95%, 80%, 70% e 50%. Após a hidratação com álcool, os cortes foram corados com hematoxilina, lavados em água corrente e corados com eosina seguidos de sucessivas lavagens. Após a coloração, as lâminas passaram mais uma vez

por um processo de desidratação com alcoóis em sequência crescente, de 50% a 100%, e uma nova diafanização com Xilol, para remover outros resíduos, possibilitando a montagem das lâminas. As imagens das lâminas coradas foram analisadas por meio de microscopia óptica comum, em aumento de 400X.

### 3.3 QUANTIFICAÇÃO DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO INFLAMATÓRIO (TIL)

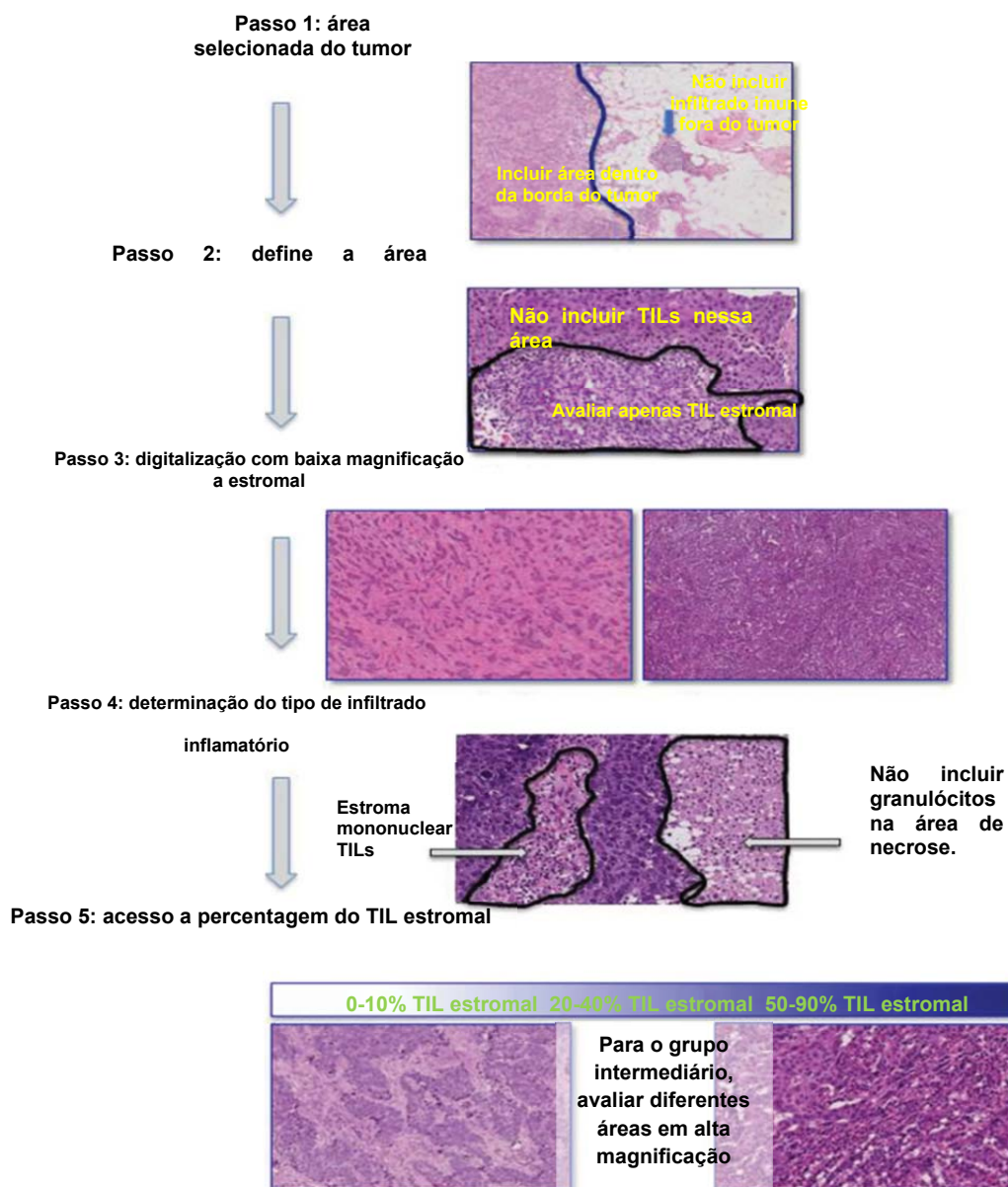
A área tumoral definida para análise é dividida entre compartimento estromal e compartimento intramural. O compartimento estromal é mais representativo e mais reprodutível, já que é mais abundante e menos heterogêneo, devendo ser quantificado e expresso em porcentagem. A Figura 15 ilustra ambos os compartimentos (SALGADO et al. 2015).



**Fonte:** SALGADO et al. (2015a).

**Figura 15** – Representação de lâmina com subdivisão de componentes: A) Lâmina com infiltrado predominantemente tumoral; B) Componente estromal do infiltrado; C) Componente intratumoral.

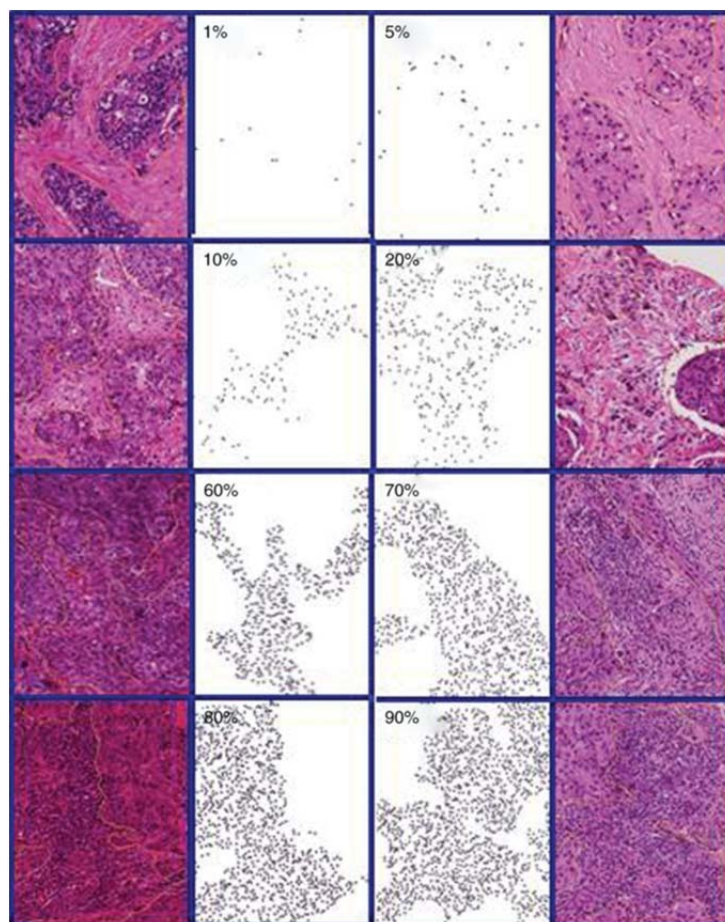
Na análise do infiltrado tumoral, foram excluídas áreas contendo carcinoma ductal *in situ*, bem como também áreas extensas de artefatos e necrose (Figura 16) (SALGADO et al. 2015).



Fonte: SALGADO et al. (2015).

**Figura 16** - Abordagem padronizada para avaliação de TILs em câncer de mama.

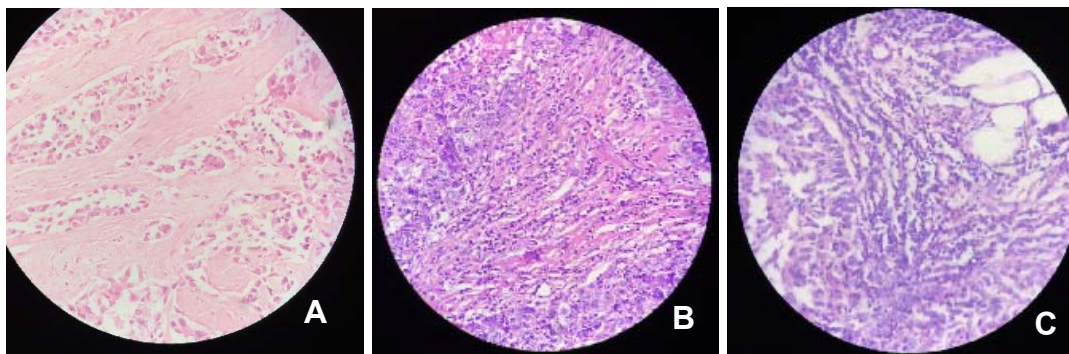
O percentual do TIL foi determinado seguindo os critérios de análise propostos seguindo as recomendações do TIGW (SALGADO et al. 2015) (Figura 17).



**Fonte:** SALGADO et al. (2015).

**Figura 17** - Padronização e diretrizes para avaliação de TILs. As imagens laterais, em púrpura, mostram a quantidade de TIL estromal em lâminas de H&E. Estando no centro da imagem, a representação do TIL em porcentagem.

Na avaliação histopatológica, a contagem das densidades extremas de TIL (alta e baixa densidades) se apresenta com melhor visualização do que as densidades intermediárias do TIL. (Figura 18).



**Fonte:** Acervo do HCP – PE.

**Figura 18** – Fotomicrografia histopatológica do TIL em aumento de 400x. A) exemplo de caso com TIL baixo (2%); B) exemplo de caso com TIL intermediário (40%); C) exemplo de caso com de TIL elevado (60%).

Para estudos com H&E, o TIL estromal tem se revelado um parâmetro superior e reproduzível. A principal razão é que o TIL IT estão tipicamente presentes em baixo número, são mais heterogêneos e de difícil visualização no método de H&E. O escore intra tumoral não fornece informações adicionais. O compartimento estromal tem uma clara vantagem porque a densidade e o padrão de crescimento da célula tumoral não afetam a contagem do TIL feito unicamente neste espaço (SALGADO et al. 2015).

Após avaliação dos patologistas, o TIL estromal foi definido como a percentagem do estroma tumoral ocupado por linfócitos, e categorizado como menos de 10%, de 10% a 50%, ou mais de 50% (SWISHER et al. 2016).

### 3.4 IMUNOMARCAÇÃO COM OS ANTICORPOS CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>

Lâminas silanizadas foram montadas utilizando cortes de espessura de 2µm. Os tecidos foram desparafinizados, e seus antígenos recuperados pelo PTLINK (Dako®) em solução tampão de pH baixo (Target Retrieval Solution Low, pH, 50x - Dako®) por 20 minutos. A seguir, realizou-se lavagem com solução tampão por 5 minutos, seguida de bloqueio por peroxidase endógena por 5 minutos (Peroxidase Blocker, Dako®), impedindo a interferência das enzimas endógenas e a ligação inespecífica dos anticorpos com proteínas do tecido, e nova lavagem com solução tampão por 5 minutos. Aplicou-se o anticorpo primário diluído CD3<sup>+</sup> (anticorpo policlonal coelho anti-CD3 humana (Ref: IR503, DAKO®, diluição 1:200) por 30 minutos para incubação. Após lavagem, aplicou-se o sistema de detecção *Envision Flex/HRP* (Dako®) – polímero de dextran acoplado a molécula de peroxidase e anticorpo secundário por 20 minutos. Em seguida, duas lavagens de 5 minutos foram realizadas seguidas da utilização do sistema substrato-cromogênio – *Envision Flex Substrate Working Solution DAB<sup>+</sup>*, solução tamponada contendo peróxido de hidrogênio (Dako®). Após lavagem, realizou-se contra-coloração com *Envision Flex Hematoxylin* (Dako®) e lavagem em água corrente. Após o processo descrito acima, as lâminas passaram mais uma vez por um processo de desidratação com alcoóis em sequência crescente, de 70% a 100%, e uma nova diafanização com Xilol, para remover outros resíduos e possibilitar a montagem das lâminas com lamínula e DAB, os três pontos localizados na margem foram

marcados por um patologista e encaminhadas para captura de imagem por histofotometria computadorizada.

### 3.5 HISTOFOTOMETRIA COMPUTADORIZADA

- CAPTURA DE IMAGENS

Para a obtenção das fotomicrografias foi utilizado o microscópio de campo claro Axio M2m (Zeiss) associado ao software de captura Zen Lite. (Figura 19).



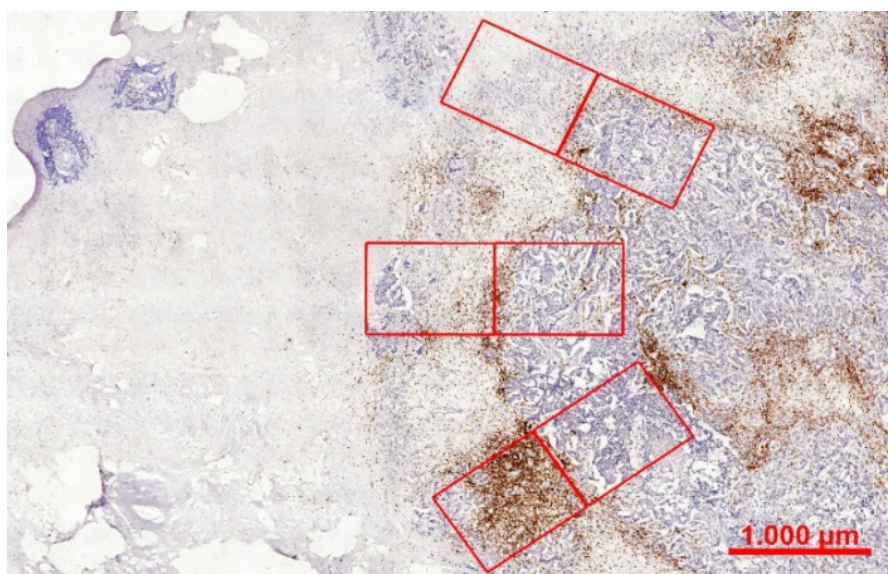
**Fonte:** Acervo do LIKA.

**Figura 19** - Microscópio ZEISS Axio Imager 2.

Determinou-se para a captura das imagens um critério sequencial, no qual foram obtidas duas imagens consecutivas com dimensões e aumentos iguais. O ponto referencial para a obtenção das imagens foi a margem invasiva, obtendo-se, dessa forma, uma imagem antes da margem invasiva



e outra imediatamente após a margem invasiva. A associação dos dois campos forma um retângulo com centro sendo representado pela fronteira da margem. Todas as imagens foram capturas em aumento de 200X. Para aumentar a representatividade das amostras foram capturadas seis imagens sendo três pré-margens e três pós-margens invasiva. (Figura 20).



**Fonte:** Acervo do HCP – PE.

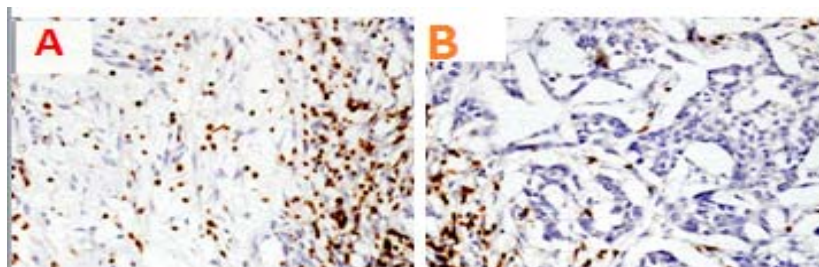
**Figura 20** – Delimitação dos componentes intra e extra tumoral. Foram utilizadas três lâminas retangulares de 447,63 µm X 335,40 µm ao longo das margens invasiva do tumor, imagem representativa em aumento de 100x.

### 3.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA COMPUTADORIZADA:

Para análise morfométrica, foram utilizadas as lâminas imunomarcadas com os anticorpos CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, avaliando-se a densidade do infiltrado linfocitário. As imagens foram capturadas pelo *Software Zen 2012/Zeiss* em aumento de 200X. As imagens digitalizadas foram enviadas para o programa *Image Pró-plus* versão 4.5, e as áreas reveladas com o



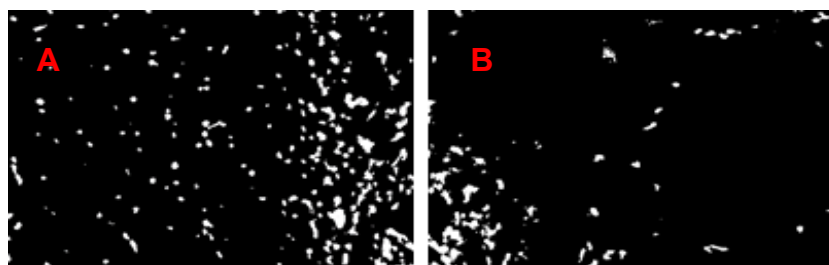
DAB foram selecionadas por meio da distribuição de cor como parâmetro discriminante. Após a definição do intervalo de cor, foi selecionada a área em marrom que representa a quantidade de linfócitos em cada campo. (Figura 21).



Fonte: Acervo do HCP - PE.

**Figura 21** - Fotomicrografia de tecido mamário marcado por imunohistoquímica. A) Linfócitos intra tumorais em aumentos de 200x. B) Linfócitos extra tumorais em aumento de 200x.

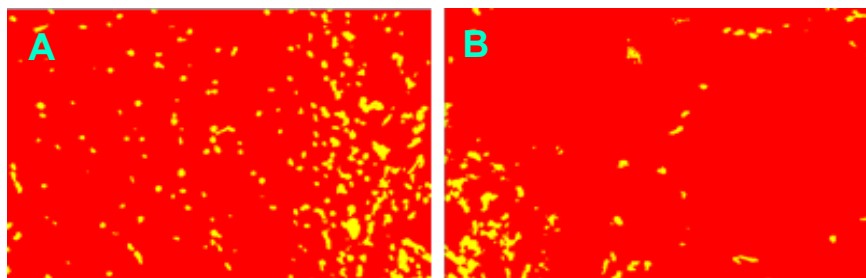
Em seguida, foi realizada a máscara que oferecia a área e a porcentagem de linfócitos presentes em cada campo da imagem, onde os espaços em branco representam os linfócitos marcados, e o espaço em preto, representa a área no entorno dos linfócitos (não selecionados pela colorimetria). (Figura 22).



Fonte: Acervo do HCP – PE.

**Figura 22** - Máscara em preto e branco gerada após análise de colorimetria. A) Objetos intra tumoral. B) Objetos extra tumoral.

Realização de máscara colorida para cálculo do valor da área ocupada pelas cores distintas, nas quais, os espaços em amarelo representa os linfócitos marcados, e os espaços em vermelho as áreas no entorno dos linfócitos não selecionados pela colorimetria. (Figura 23).



Fonte: Acervo do HCP - PE.

**Figura 23** - Máscara gerada após adição de cores à máscara em preto e branco. A) Objetos intra tumoral. B) Objetos extra tumoral.

Foi quantificado o percentual de linfócitos para cálculo da média, sendo utilizado o valor médio para classificar a densidade como baixa e alta, e correlacionar com a SG (OBERHOLZER et al. 1996) (Figura 24).

Range	Objects	%Objects	%Area
<b>A</b>	200	28.011204	68.371719
<b>B</b>	514	71.988792	31.628283

Fonte: HCP – PE.

**Figura 24** - Percentagem de objetos obtidos após adição de cores.

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações foram armazenadas em banco de dados próprio, criado exclusivamente para esta pesquisa, no programa estatístico Stata Versão 12.

Na análise das co-variáveis, utilizou-se do Teste Qui-Quadrado de Pearson para variáveis categóricas, e teste T de Student na comparação de médias, obtendo significância estatística de 5% ( $p < 0,05$ ).

Determinou-se o tempo de sobrevida global como tempo entre a biópsia e a data do óbito (HUDIS et al. 2007). De acordo com o método de Kaplan-Meier.

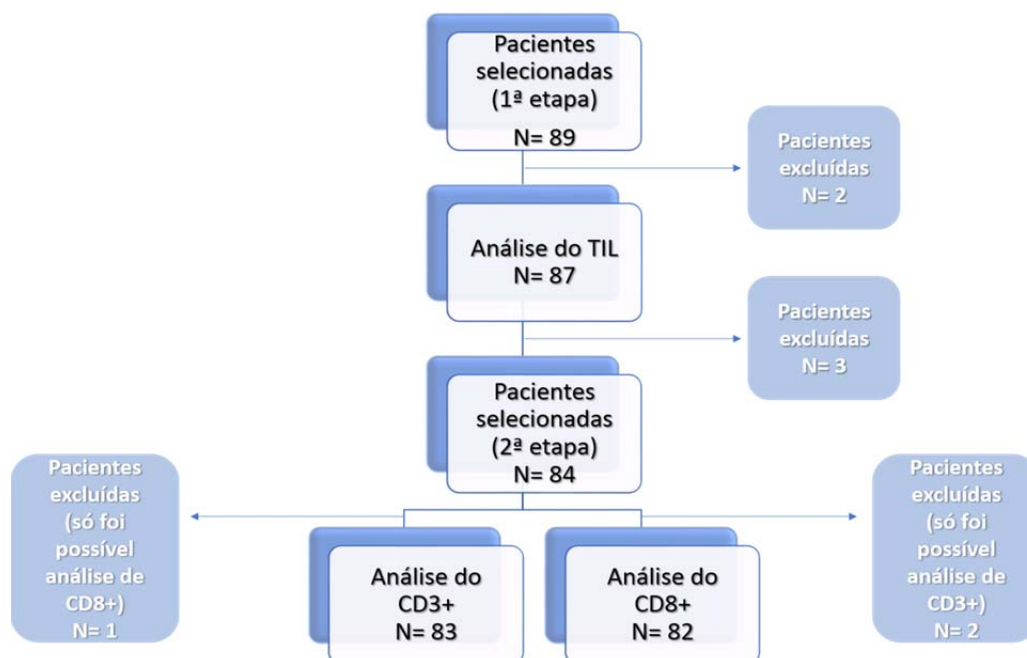
O Teste Log-rank determinou a diferença entre as funções de sobrevida, segundo a classificação do TIL.

Aplicação do modelo de regressão de Cox na predição da medida de Hazard Ratio (HR) e intervalo de confiança de 95%, na representação da associação do TIL e óbito.

A concordância inter-observador – Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) para o TIL quantitativo, e Coeficiente Kappa na análise da concordância para o TIL categorizado.

## 5 RESULTADOS

Dos 3345 pacientes atendidos no período do estudo 11,9% representavam tumores triplo negativos, dos quais 21,6% em estágio inicial. Foram incluídas no estudo 89 pacientes, das quais 2 foram excluídas devido a má conservação das lâminas e dificuldade no manuseio do prontuário. Na primeira fase da pesquisa, foram analisadas 87 lâminas referentes à quantificação do TIL. Na segunda fase, eliminou-se 3 lâminas devido a dificuldades técnicas para realização da imuno-histoquímica. Das 84 lâminas restantes, não foi possível medir o CD3 de uma unidade, e o CD8 de duas, devido a dificuldades para confecção de novos cortes nos blocos de parafina. (Figura 25).



**Figura 25** - Fluxograma da inclusão das pacientes no presente estudo.

O tempo médio de acompanhamento foi de 4,3 anos, com taxa de mortalidade de 4,5 óbitos a cada 100 pacientes tratadas por ano. Destes casos 22 mulheres apresentaram eventos, e 16 foram a óbito, sendo os eventos: 8 por metástases pulmonares, 4 por metástase cerebral 1 por metástase hepática e 1 por múltiplas metástases; 1 apresentou recidiva local que evoluiu para óbito, e 1 sem informação. Seis pacientes permanecem vivas após recidiva, que foram: 3 recidivas locoregionais 2 contralaterais e 1 em coluna. (Figura 26).



**Figura 26** - Fluxograma dos eventos ocorridos.

A Tabela 1 mostra as características basais dos pacientes avaliados. A idade média foi de 55,7 anos, a maior parte dos tumores eram pouco diferenciados, dois terços dos tumores mediam entre dois e cinco centímetros e 27,6% apresentaram comprometimento axilar.

**Tabela 1** - Características basais dos pacientes e tumores avaliados. Ajeitar na lista

<b>Características</b>	<b>Estatísticas</b>
Número de pacientes	87
Idade (em anos) - Mediana (Mínimo - Máximo)	55 (28 – 88)
Tabagismo	42,0%
Histórico familiar	48,3%
Hipertensão	57,0%
Diabetes	22,1%
Grau histológico do tumor	
Bem diferenciado	10,7%
Moderadamente diferenciado	14,3%
Pouco diferenciado	75%
Tamanho do tumor	
cT1	12,6%
cT2	77,0%
cT3	10,3%
Linfonodos regionais	
cN0	72,4%
cN1/cN1a	27,6%
Estadiamento	
IA	8,0%
IIA	63,2%
IIB	27,6%
III	1,2%

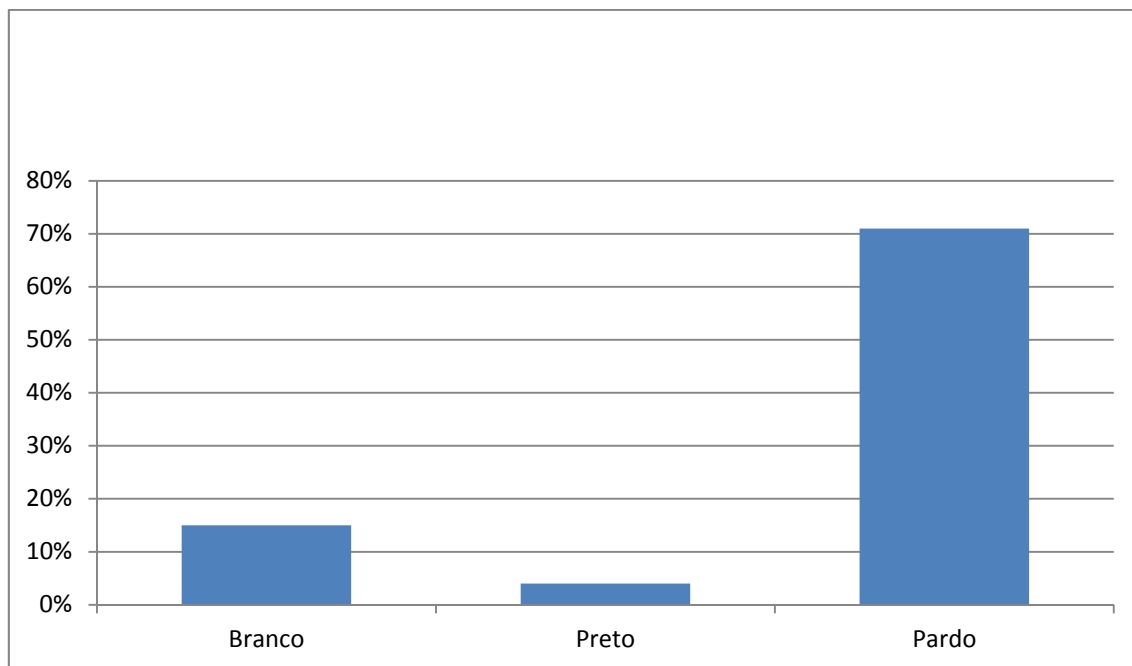
O método diagnóstico mais utilizado foi a *core biopsy*, correspondendo a 78,2% dos casos. Carcinoma ductal invasivo sem outras especificações (CDI-SOE) foi o tipo histológico predominante correspondendo a 95,5% dos casos. Os casos restantes foram de carcinoma medular, mucinoso e micropapilar (Tabela 2).

**Tabela 2 - Características Tumorais.**

<b>Coleta da Amostra</b>	<b>Estatísticas</b>
<i>Core Biopsy</i>	68 (78,2%)
Biópsia Incisional	10 (11,5%)
Biópsia Excisional	9 (10,3%)
<hr/>	
<b><u>Subtipos Histológicos</u></b>	<b><u>Estatísticas</u></b>
Carcinoma Ductal Invasivo SOE	83 (95,5%)
Carcinoma Medular	2 (2,3%)
Carcinoma Mucinoso	2 (1,1%)
Carcinoma Micropapilar	1 (1,1%)

**Fonte:** HCP – PE.

Dos pacientes examinados sessenta e nove (69) são de cor parda, quinze (15) são brancos e três (3) são pretos. (Figura 27)



**Figura 27** - Distribuição dos pacientes de acordo com a cor da pele.

Apesar da indicação clínica de tratamento conservador, cerca de 59,8% foram submetidas a alguma modalidade de mastectomia. (Tabela 3)

**Tabela 3** - Procedimentos Cirúrgicos Realizados.

Mastectomia Radical Modificada	49 (56,2%)
Mastectomia Simples	1 (1,2%)
Quadrantectomia com Linfadenectomia Axilar	18 (21,8%)
Quadrantectomia com BLS	16 (18,4%)
Mastectomia Simples com BLS	1 (1,2%)
Mastectomia Radical com Reconstrução	1 (1,2%)

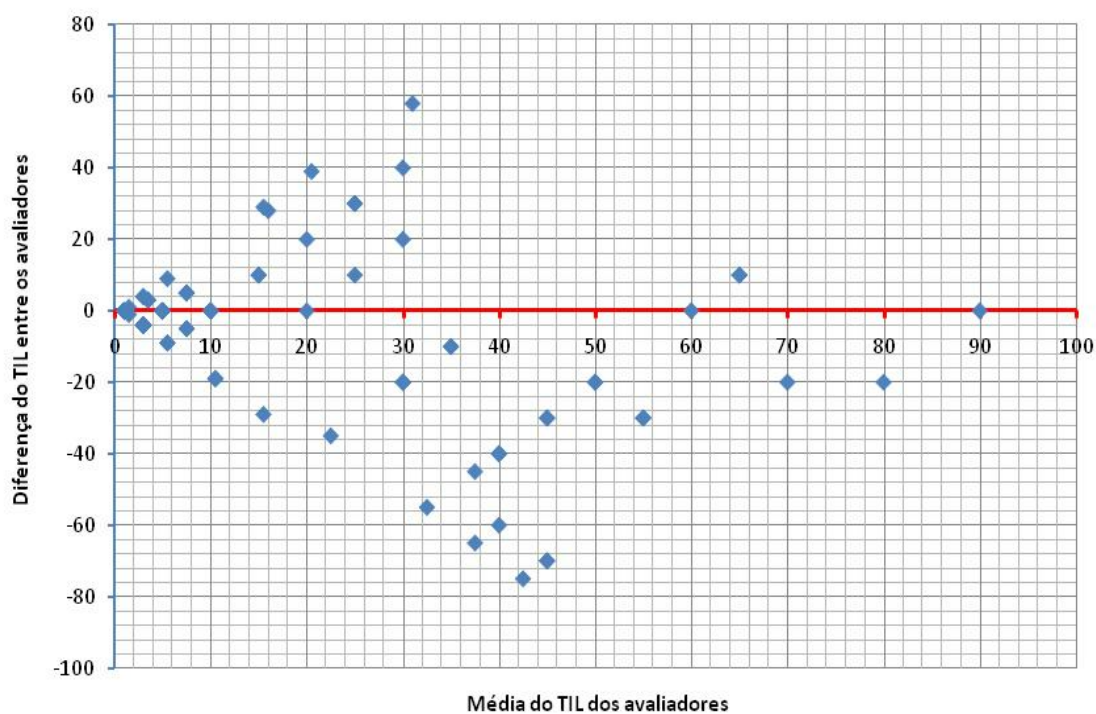
**Fonte:** HCP – PE.

Das 87 pacientes, 77% realizaram tratamento quimioterápico adjuvante; 16% neoadjuvante e 7% não realizaram tratamento quimioterápico sistêmico. O esquema terapêutico FAC, foi utilizado em 47%



dos casos, ACT em 23%, e outros esquemas foram utilizados 30% dos pacientes.

Após a avaliação feita por dois patologistas, de maneira independente, foi avaliada a concordância entre os valores do Infiltrado Linfocitário Tumoral, observando-se que os valores dispostos nos extremos, foram os que apresentaram melhor concordância (Figura 28). O Valor do coeficiente de correlação intraclassa (ICC) foi de 0,574 (IC95%;0,1842 – 0,9551) –  $p = 0,001$ , correspondendo a uma concordância regular entre os avaliadores.



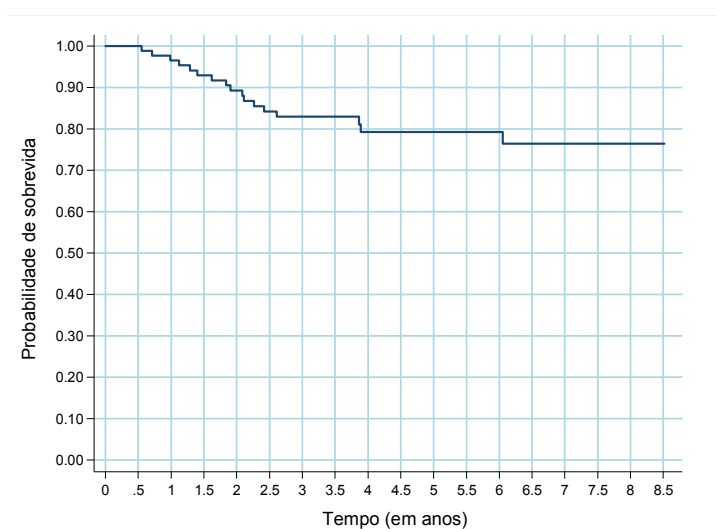
**Figura 28** - Avaliação da concordância entre medidas do TIL dos dois avaliadores.

A concordância estimada pelo coeficiente Kappa foi de 0,392, considerando dois pontos de corte - 10% e 50% (Tabela 4), ou seja, razoável segundo os critérios de Landis & Koch (LANDIS e KOCH 1977).

**Tabela 4** - Análise de concordância de TILs considerando dois pontos de corte.

Avaliador 2	Avaliador 1			Concordância geral (%)	Kappa (IC95%)	p-valor
	≤ 10%	11 – 50	>50%			
≤ 10%	40	7	1			
11 - 50%	6	11	1			
>50%	7	8	5	65,1%	0,392 (0,257 – 0,527)	<0,001

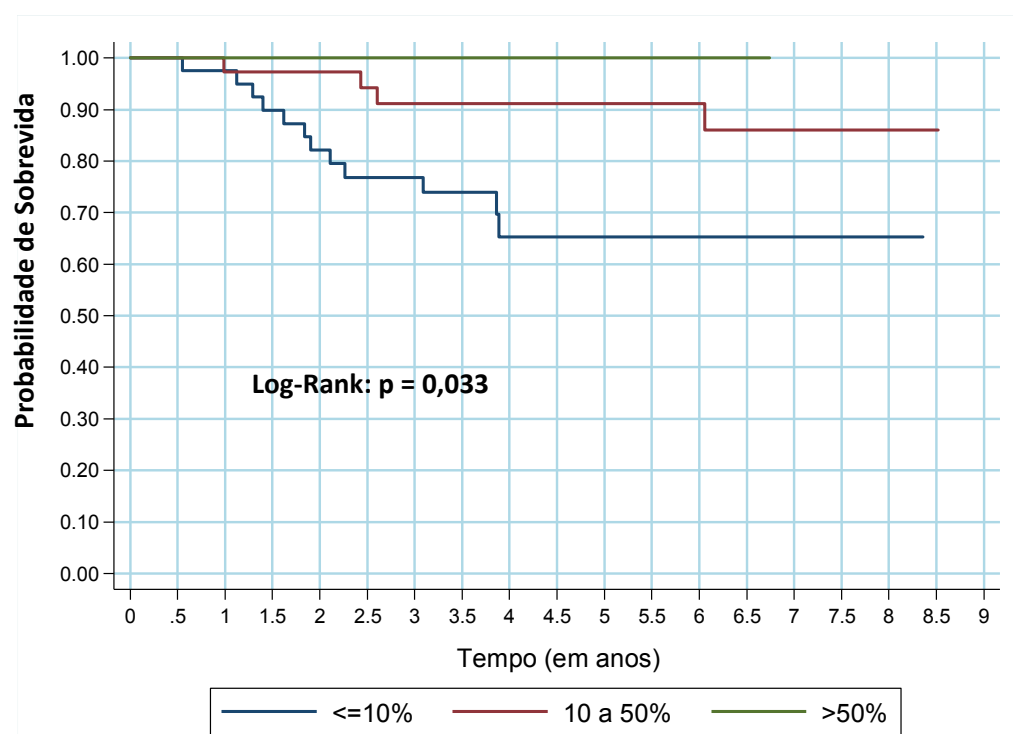
Considerando a média dos dois avaliadores, observou-se uma curva descendente até os 4 anos, seguido de um platô. (Figura 29).



- Tempo médio de acompanhamento (mínimo – máximo) = 4,3 anos (90 dias - 8,5 anos)
- Taxa de mortalidade (IC95%) = 4,5 óbito a cada 100 tratadas por ano (2,6 – 6,9)
- Probabilidade de óbito em até 1 ano de doença = 2,4%

**Figura 29** - Curva de Sobrevida Global.

Na avaliação, considerando o TIL em três categorias, não houve óbito entre os pacientes pesquisados com mais de 50%. Sendo que os pacientes que apresentavam uma média inferior a 10%, apresentaram um maior número de óbito em relação aos encontrados entre 10 e 50%. Sendo a diferença estatisticamente significativa, com o  $p=0,033$ . (Figura 30).



**Figura 30** - Sobrevida global segundo a classificação do TIL (considerando a média do TIL dos dois avaliadores). Concordância abaixo de 10%, 40 pacientes; concordância entre 11 e 50% 11 pacientes; concordância acima de 50%, 5 pacientes.

Analisando um possível ajuste na associação do nível de TIL com o risco de morte, entre as variáveis elegíveis para o modelo multivariado foram tabagismo, histórico de câncer, tamanho do tumor e estadiamento patológico. Apenas a variável tabagismo apresentou significância com o

valor  $p=0,037$ . Não se utilizou a classificação do TIL acima de 50% por não ocorrer algum evento (Tabela 5).

**Tabela 5** - Associação entre as variáveis clínicas e patológicas e porcentagem do TIL.

Características	População em geral (n = 87)	Classificação do TIL		p-valor
		≤ 10% (n = 41)	> 10% (n = 46)	
<b>Biológicos</b>				
Idade: média ± dp	55,3 ± 13,0	54,4 ± 12,8	56,0 ± 13,2	0,562
IMC: média ± dp	29,1 ± 4,1	28,8 ± 5,1	29,3 ± 4,1	0,626
<b>Hábitos</b>				
Etilismo	11 (13,9%)	5 (13,2%)	6 (14,6%)	0,850
Tabagismo: fumante e ex-fumante	34 (42,0%)	21 (53,8%)	13 (31,0%)	0,037
<b>Procedência do caso</b>				
Recife	12 (14,3%)	4 (9,8%)	9 (18,6%)	0,409
Região metropolitana	25 (28,6%)	11 (26,8%)	14 (30,2%)	
Interior de Pernambuco	50 (57,1%)	26 (63,4%)	24 (51,2%)	
<b>Comorbidades</b>				
História de câncer*	29 (48,3%)	17 (53,1%)	12 (42,9%)	0,427
HAS	49 (57,0%)	22 (55,0%)	27 (58,7%)	0,730
DM	19 (22,1%)	9 (22,5%)	10 (21,7%)	0,932
<b>Relacionado ao câncer</b>				
<b>Lateralidade</b>				
Direita	39 (44,8%)	19 (46,3%)	20 (43,5%)	0,789
Esquerda	48 (55,2%)	22 (53,7%)	26 (56,5%)	
<b>Grau histológico</b>				
Bem diferenciado	9 (10,7%)	4 (10,0%)	5 (11,4%)	0,361
Moderadamente Diferenciado	12 (14,3%)	8 (20,0%)	4 (9,1%)	
Mal diferenciado	63 (75,0%)	28 (70,0%)	35 (79,5%)	
<b>Tamanho do tumor</b>				
cT1/	11 (12,7%)	3 (7,3%)	8 (17,4%)	0,347
cT2	67 (77,0%)	34 (82,9%)	33 (71,7%)	
cT3	9 (10,3%)	4 (9,8%)	5 (10,9%)	
<b>Linfonodos regionais</b>				
cN0	63 (72,4%)	30 (73,2%)	33 (71,4%)	0,881
cN1;cN1a	24 (27,6%)	11 (26,8%)	13 (28,6%)	
<b>Estadiamento</b>				
IA/IIA	62 (71,3%)	28 (68,3%)	34 (73,9%)	0,563
IIB	25 (28,7%)	13 (31,7%)	12 (26,1%)	

\*27 pacientes sem informação

Ajustando o risco da morte tendo como variável explicativa do TIL, observou-se que há uma relação de risco independente, tomando como referência a redução de 5% ou 10% nos nível de TIL. Essa associação foi estatisticamente significativa ao nível de 5% e 10% ( $p = 0,046$ ). Com relação com diminuição escalonar de 10% do TIL, existe um risco de morte quatro vezes maior, com o  $p=0,016$ . (Tabela 6).

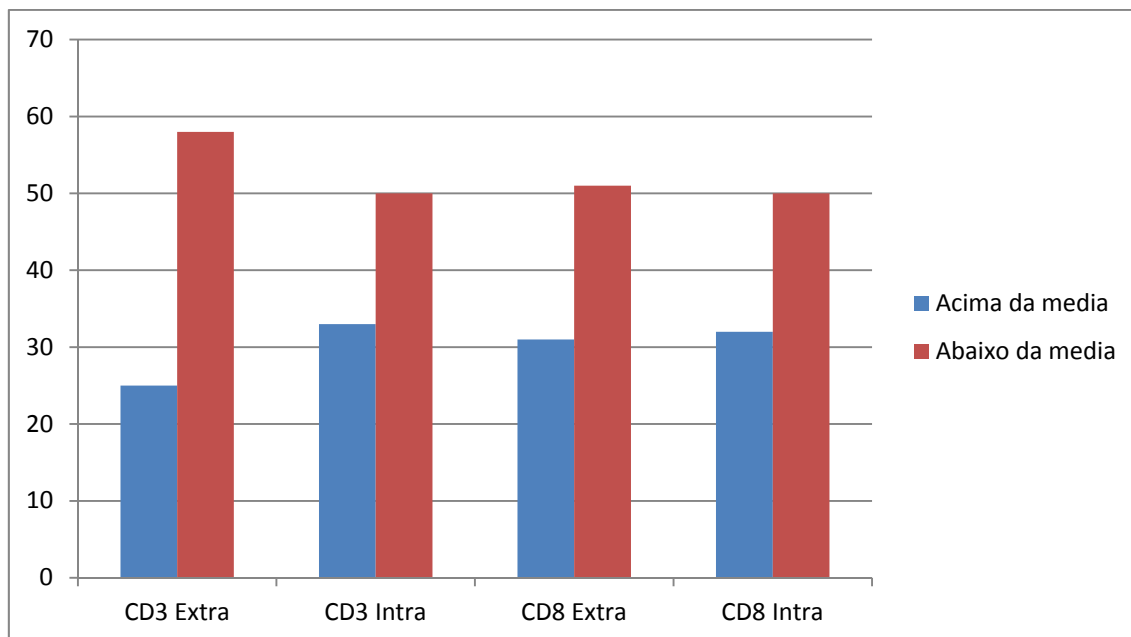
**Tabela 6** - Risco de morte associado com o TIL.

Nível de TIL	HR (IC95%)	HR Ajustado	p-valor
<b>TIL quantitativo</b>			
Redução de 5%	1,18 (1,00 – 1,40)	1,19 (1,01 – 1,40)	0,046
Redução de 10%	1,40 (1,00 -1,97)	1,41 (1,01 – 1,97)	0,046
<b>TIL</b>			
>10%	Referência	Referência	
≤10%	3,93 (1,26-12,2)	4,08 (1,30 – 12,5)	0,016

Observou-se que dos 84 pacientes diagnosticados, obteve-se as seguintes médias nas planilhas dos resultados da imuno-histoquímica, segundo tabela a seguir. Os pacientes que se encontravam com o valor semelhante à média foram incluídos nos valores abaixo da média.

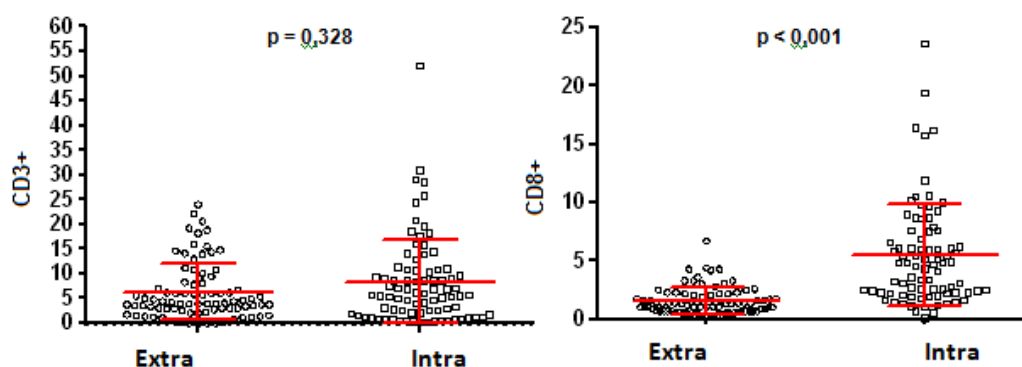
Verificou-se que a média de CD3<sup>+</sup> extra tumoral (ET) foi de 6.2, correspondendo a 58 pacientes abaixo da média, e 25, acima da média. Em CD3<sup>+</sup> intra tumoral (IT), a média foi de 8.2 onde se encontravam 50 pacientes abaixo da média e 33 acima da média.

Na marcação CD8<sup>+</sup> ET, a média foi de 1.5, onde foram encontrados 51 pacientes abaixo da media e 31 acima da media. Em CD8<sup>+</sup> IT, a média foi 5.4, estando 50 pacientes abaixo da média e 32 acima da média. (Figura 31)



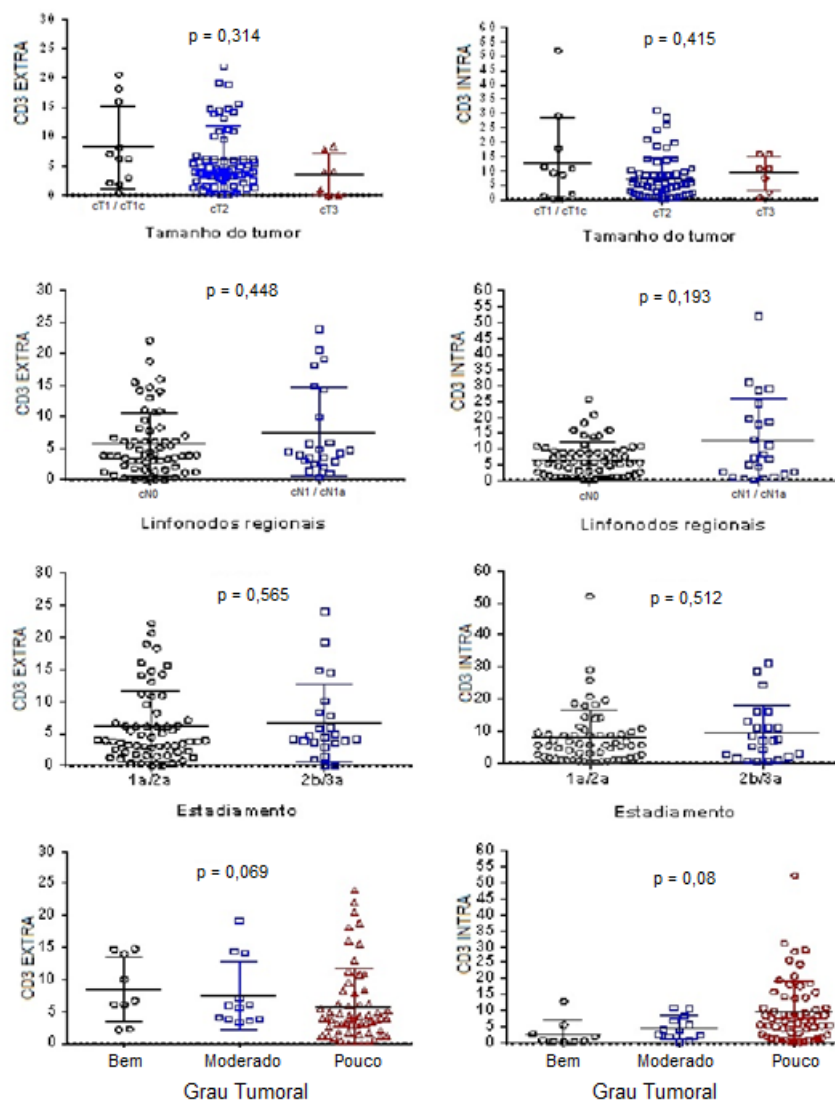
**Figura 31** - Distribuição dos pacientes de acordo com a média dos linfócitos. CD3+ET média 6,2. Abaixo da média 58. Acima da média 25 pacientes. CD3+IT média 8,2. Abaixo da média 50. Acima da média 33 pacientes. CD8+ET média 1,5. Abaixo da média 51, Acima da média 31 pacientes. CD8+IT média 5,4. Abaixo da média 50. Acima da média 32 pacientes.

As lâminas marcadas com CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram contadas separadamente intra e extra tumoral, e mostraram em relação ao CD3<sup>+</sup> uma semelhança, e em relação ao CD8<sup>+</sup> uma quantidade maior dentro do tumor. Na média, o IT foi maior em ambos os tipos celulares. (Figura 32)



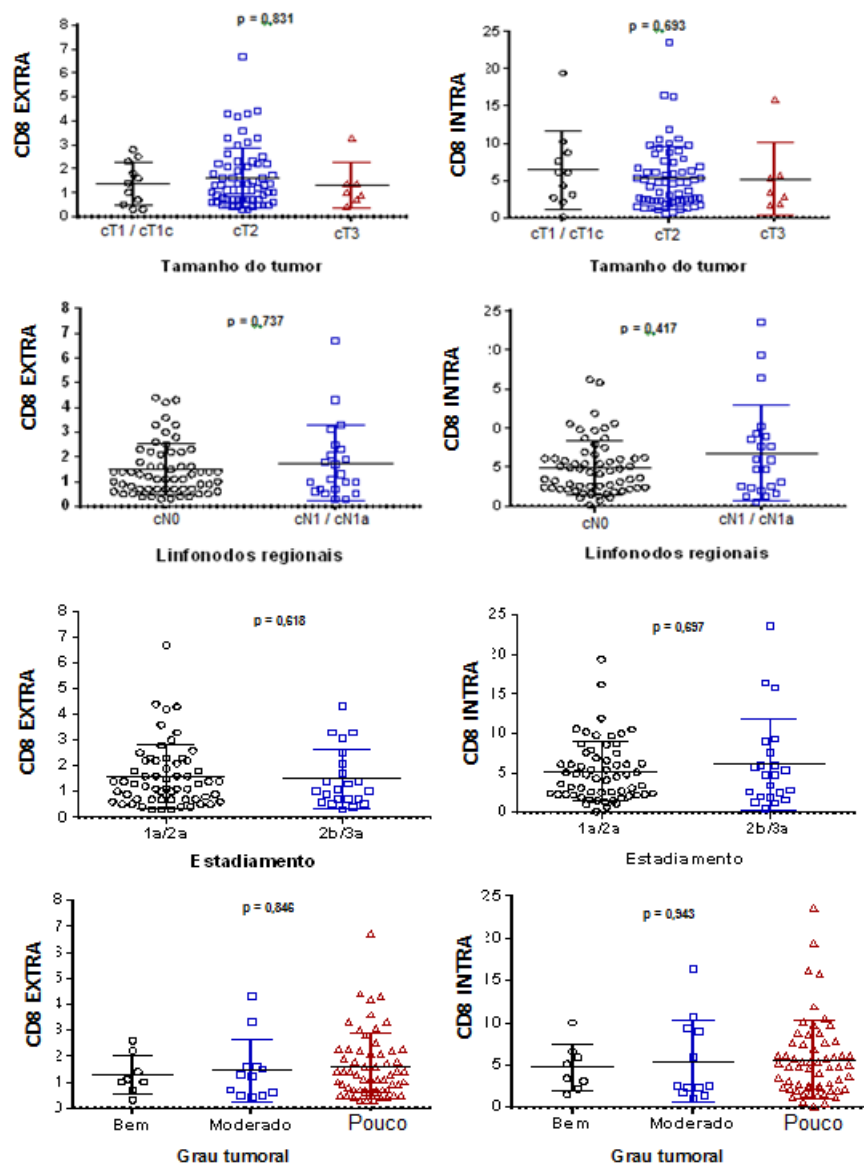
**Figura 32** - Distribuição dos percentuais de células com marcação de CD3+ e CD8+ segundo a localização no tumor (extra e intra tumoral).

Avaliando o tamanho do tumor, observa-se que a quantidade de CD3 ET é maior do que do CD3 IT. Não há diferença entre a quantidade de CD3 IT e ET em relação aos linfonodos regionais, estadiamento e grau tumoral. (Figura 33).



**Figura 33** - Distribuição dos percentuais de células com marcação de CD3+ segundo as características do tumor.

Em relação ao CD8+ existe uma equivalência entre a quantidade de linfócitos e o subgrupo de tamanho, estadiamento e grau. (Figura 34).

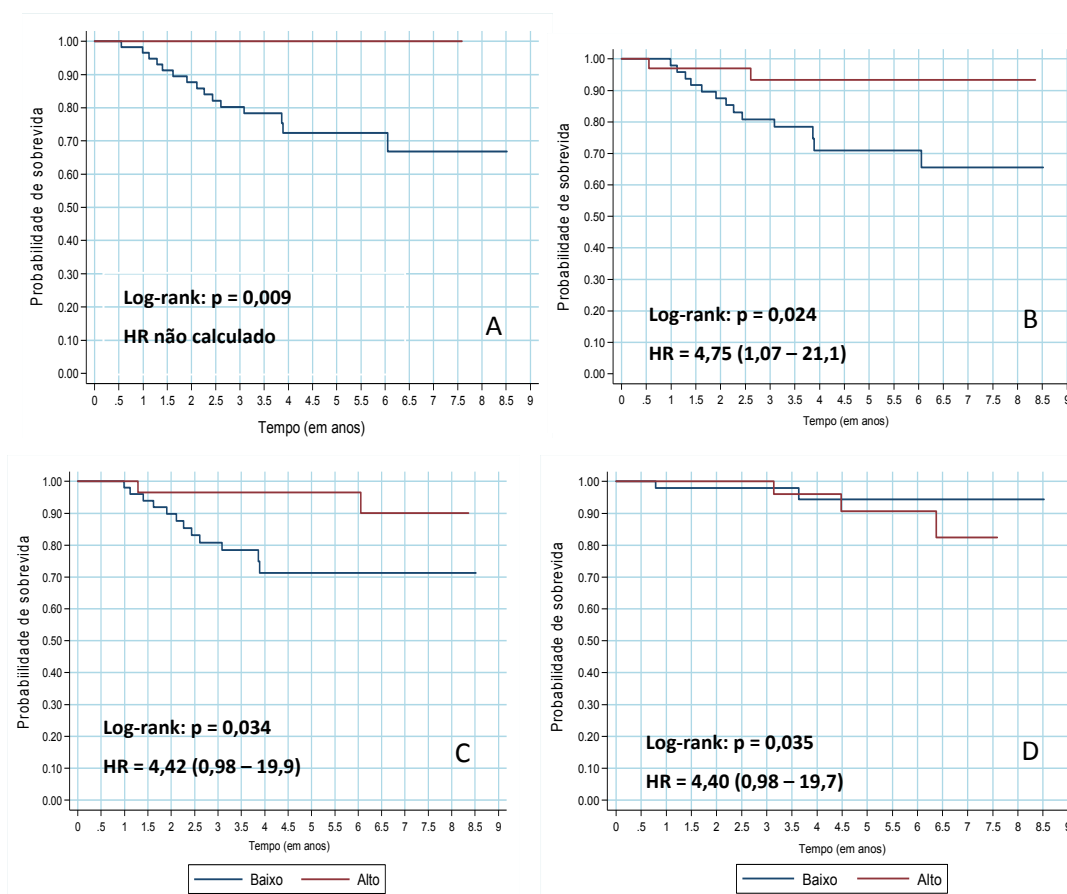


**Figura 34** - Distribuição dos percentuais de células CD8+ segundo as características do tumor.

A associação entre CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi examinada separadamente intra e extra tumoral, com SG usando o valor médio para delinear densidade



baixa e alta. Análise retrospectiva no total de 94 pacientes com seguimento, revelou que tumores de paciente com intervalo de sobrevida maior, apresentam altas densidades de células imune CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> intra e extra tumoral, do que em comparação com tumores com baixa densidade de células imune CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> intra e extra tumoral. (Figura 35).



**Figura 35** - Sobrevida geral segundo os percentuais de CD3<sup>+</sup> extra tumoral: 6,2. (A); CD3<sup>+</sup> intra tumoral: 8,2 (B); CD8<sup>+</sup> extra tumoral: 1,5 (C); CD8<sup>+</sup> intra tumoral: 5,4 (D).

Quando a densidade de CD3 intra tumoral e extra tumoral esteve acima da média, não ocorreram óbitos entre a amostragem do número de pacientes. Os 13 óbitos ocorreram quando ambas as densidades estavam abaixo da média (8,2). Quando as densidades intra e extra tumoral dos

linfócitos CD8 estiveram altas (5,4), ocorreram 2 óbitos. E com as duas densidades abaixo da média (1,5), ocorreram 12 óbitos. Sem ser estatisticamente significantes. (Tabela 7).

**Tabela 7** - Risco de óbito segundo os níveis de CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> extra e intra tumoral.

Fatores	Número de óbitos (n = 16)	HR (IC 95%)	p-valor
<b>CD3 extra</b>			
Alta	0	Referência	-
Baixa	15	Não calculado	-
<b>CD3 intra</b>			
Alta	2	Referência	-
Baixa	13	<b>4,76 (1,07 – 21,1)</b>	<b>0,04</b>
<b>CD8 extra</b>			
Alta	2	Referência	-
Baixa	12	<b>4,42 (0,98 – 19,9)</b>	<b>0,052</b>
<b>CD8 intra</b>			
Alta	2	Referência	-
Baixa	12	<b>4,40 (0,98 – 19,7)</b>	<b>0,053</b>
<b>CD3 extra/CD3 intra</b>			
Alta/Alta	0	Referência	-
Baixa/Baixa	13	Não calculado	-
Alta/Baixa	2	Não calculado	-
Baixa/Alta	0	Não calculado	-
<b>CD8 extra/CD8 intra</b>			
Alta/Alta	2	Referência	-
Baixa/Baixa	12	<b>3,84 (0,85 – 17,4)</b>	<b>0,081</b>
Alta/Baixa	0	Não calculado	-
Baixa/Alta	0	Não calculado	-

Não houve correlação entre o risco de óbito e as variáveis analisadas na Tabela 8.

**Tabela 8** - Risco de óbito segundo as variáveis clínico-patológicas.

Fatores	Número de óbitos (n = 16)	HR (IC 95%)	p-valor
<b>Grupo etário:</b>			
> 65 anos	3	0,70 (0,20 – 2,47)	0,583
<b>Tabagismo: Sim</b>	5	0,77 (0,26 – 2,30)	0,64
<b>Etilismo: Sim</b>	1	0,46 (0,06 – 3,55)	0,46
<b>Histórico familiar</b>	4	1,04 (0,26 – 4,18)	0,95
<b>HAS</b>	10	1,11 (0,40 – 3,05)	0,841
<b>DM</b>	3	0,73 (0,21 – 2,57)	0,627
<b>Grau histológico do tumor</b>			
<b>Bem diferenciado</b>	3	Referência	-
<b>Moderadamente diferenciado</b>	3	0,32 (0,09 – 1,19)	0,089
<b>Mal diferenciado</b>	9	0,57 (0,11 – 2,84)	0,493
<b>Tamanho do tumor</b>			
<b>cT1/cT1c</b>	2	Referência	-
<b>cT2</b>	12	1,01 (0,22 – 4,51)	0,992
<b>cT3</b>	2	1,03 (0,15 – 7,31)	0,976
<b>Linfonodos regionais</b>			
<b>cN0</b>	10	Referência	-
<b>cN1/cN1a</b>	6	1,61 (0,58 – 4,43)	0,356
<b>Estadiamento</b>			
<b>IA</b>	1	Referência	-
<b>IIA</b>	9	0,99 (0,12 – 7,86)	0,995
<b>IIB/IIIA</b>	6	1,47 (0,18 – 12,2)	0,722

## 6 DISCUSSÃO

O HCP atendeu 3699 pacientes com câncer de mama no período de 2009 a 2013, dos quais apenas 10,8% eram CMTN e 2,6% em estágio inicial.

Em geral o CMTN acomete pacientes jovens, sendo mais comum em mulheres abaixo de 40 anos, e tem características histopatológicas desfavoráveis, alto grau histológico e tumores maiores (BAUER et al. 2007). No presente estudo, apenas 13% das pacientes tinham tumores abaixo de 2 cm, concordando com a literatura, e a idade média dos pacientes foi de 55 anos. Em relação a características patológicas, notou-se que 75% tinham grau histológico alto, e linfonodos acometidos em 27,6% dos casos. Na literatura, os tumores triplo-negativos não parecem ter maior relação com o comprometimento axilar (CRABB et al. 2008).

O carcinoma ductal invasivo do tipo SOE foi diagnosticado em 95,4% dos casos, o mesmo percentual apresentado por KOHLER et al. em 2015. Os CMTN apresentam disseminação sistêmica precoce com predileção para pulmão e cérebro (GADIYARAM et al. 2009). Neste caso, entre as pacientes estudadas com metástases, 54% das mesmas evoluíram com metástase pulmonar ou cerebral.

Após a leitura independente dos dois patologistas, foi realizada a correlação entre os resultados, utilizando o CCI, cujo valor foi de 0,574 (IC95%, 0,1842-0,9551)  $p=0,001$ , observando-se concordância regular entre

os avaliadores, sendo os valores extremos que apresentaram maior concordância entre os patologistas. Considerando os pontos de corte 10%, entre 10% e 50% e acima de 50%, o coeficiente de Kappa foi de 0,392, considerado intermediário (HIDA e OHI 2015).

Estudos apresentados após o ITWG mostraram que houve concordância entre os avaliadores, em tumores triplo-negativos, onde um dos estudos mostrou ICC de 0,65 e um coeficiente de Kappa de 0,57 (SWISHER et al. 2016). TRAMM et al. (2018) apresentaram resultados de ICC de 0,71 (95% CI 0,65-0,77), considerado aceitável. Posteriormente, CABUK et al. em 2018, apresentaram estudo com valor de Kappa 0,38, considerado fraco ou moderado. Estes resultados foram semelhantes ao evidenciado no presente estudo.

Vários estudos mostram a associação da presença do TIL com a SG em câncer de mama (ADAMS et al. 2014; PRUNERI et al. 2016). Observou-se, que ocorre uma redução de 17 % do risco de morte, com o aumento de 10% da quantidade do TIL (LOI et al. 2013). Outro estudo avaliou dois ensaios clínicos randomizados, onde foi identificado que dentre os 506 tumores de mama avaliados, que a cada 10% da diminuição do TIL, havia um aumento de 14% do risco de recorrência ou morte (DENKERT et al. 2016).

Os resultados obtidos no presente estudo, mostram maior sobrevida em pacientes que apresentam alto nível de TIL com o  $p= 0,033$ , estatisticamente significativo, corroborando os resultados apresentado na literatura até o presente momento.

No presente estudo, verificou-se a correlação do TIL medido por densidade e correlacionado com a SG. Há um crescimento no interesse da contagem de subpopulação de linfócitos e na sua localização espacial no microambiente tumoral (FRIDMAN et al. 2012). Foi demonstrado que os linfócitos CD3+ e CD8+ estão localizados predominantemente no compartimento intra tumoral, em relação aos linfócitos localizados no lado externo (extra tumoral) da margem invasiva.

Foi realizada a contagem de células positivas para os marcadores CD3+ e CD8+ por imuno-histoquímica, no compartimento intra e extra tumoral. Na média, a contagem de linfócitos IT foi maior do que a contagem linfócitos ET, tanto de CD3+ quanto de CD8+. A diferença de linfócitos CD8+ foi estatisticamente significativa, com  $p < 0,001$ .

O método utilizado contando a densidade de linfócitos em 3 áreas previamente determinadas, e utilizando a média dos três componentes mostrou uma correlação com a SG nos pacientes com CMTN. Não foi encontrado na literatura atual, referências da utilização de medidas extra tumorais em câncer de mama e correlacionada a SG.

Em estudo sobre câncer de mama onde se analisa a distribuição intratumoral de células imunes, localizadas no centro do tumor ou na margem invasiva, com significado prognóstico de acordo com sua localização (FORTIS et al. 2017).

Os linfócitos CD3+ e CD8+ medidos por quantidade ou densidade, estão correlacionados com melhor SG e resposta ao tratamento com

antraciclinas em câncer de mama (WEST et al. 2011; MAHMOUD et al. 2011; RATHORE et al. 2014).

Avaliando a localização espacial dos linfócitos, mostramos que as células CD3+ e CD8+ estavam localizadas principalmente no compartimento intra tumoral, e com densidades abaixo da media, em sua maior parte, concordando com dados da literatura em tumor de cólon (ALLARD 2012).

Em estudo com câncer de cólon, GALON et al. (2006), avaliaram a localização e densidade do TIL em relação à margem dos tumores, mostrando que os dados imunológicos (tipo, densidade e localização de células dentro do ambiente tumoral) são melhores preditores de SG que os dados clínicos patológicos usados correntemente no câncer de cólon.

De maneira inédita mostramos em nosso trabalho que a quantidade de linfócitos localizados ao redor do tumor estavam correlacionados com a SG do paciente.

Após análise retrospectiva dos 94 pacientes com seguimento foi revelado que pacientes com intervalo de sobrevida maior, apresentavam altas densidades de células imunes CD3+ e CD8+ em comparação com pacientes que apresentavam baixa densidade de células imunes intra e extra tumoral.

A combinação dos resultados da densidade de CD3+, intra e extra tumoral, mostrou um risco elevado de óbito, quando as duas medidas eram abaixo da media. Em relação ao CD8+, a associação das duas densidades também mostrou correlação com o risco de óbito, porém com significância estatística.

Estes resultados mostram que os linfócitos localizados no ambiente fora da margem tumoral e sua associação com os da parte interna da margem, podem estar associados com a SG.

Esta pesquisa apresentou algumas limitações em relação à disponibilidade de prontuários e resgate de blocos de parafina para a avaliação de imuno-histoquímica. Várias lâminas de H&E não estavam em boas condições para o estudo e foram montadas novamente e avaliadas com as colorações. O tamanho da amostra e o fato desse estudo ter sido realizado em pacientes de apenas uma única instituição pode trazer um viés a pesquisa, apesar da instituição atender um grande número de pacientes. Uma limitação importante neste estudo é a falta de um ponto de corte uniformemente definido na literatura.

Como contribuição deste estudo, têm-se informações sobre o padrão de apresentação destes tumores em Pernambuco e a possibilidade da utilização de um método desenvolvido para contagem de linfócitos de forma mais objetiva.



## 7 CONCLUSÃO

- 1 No presente estudo, mulheres com tumores que apresentaram TIL elevado tiveram maior SG;
- 2 No período do estudo, observou-se que dos 3699 pacientes, 401 (21,4%) foram do tipo CMTN, sendo 87 em estágio inicial;
- 3 A população estudada foi composta por mulheres de meia idade (aproximadamente 55 anos) e predominantemente de cor parda, tabagistas, com tumores pouco diferenciados e linfonodos axilares negativos;
- 4 A intensidade de TIL predominante no presente estudo foi abaixo de 10%, sendo a avaliação interobservador classificada como aceitável;
- 5 Neste estudo, os percentuais linfocitários de CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, foram significativamente maiores na região intra tumoral. As densidades linfocitárias de CD3<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, intra e extra tumoral estavam correlacionadas com SG.
- 6 Nesse estudo observou-se de forma inédita que a densidade de linfócitos localizados ao redor do tumor estavam correlacionados com a SG.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas A, Lichtman A, Pillai S. **Imunologia celular e molecular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. Propriedades e visão geral das respostas imunes. p.1-12.

Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. **J Clin Oncol** 2014; 32:2959-66.

Aguillar VLN, De Pace Bauab S; Maranhão NM. **Mama: diagnóstico por imagem: mamografia, ultra-sonografia, ressonância magnética**. São Paulo: Revinter; 2009. Procedimentos invasivos mamários orientados por imagem. p.587-633.

Allard MA, Bachet JB, Beauchet A, et al. Linear quantification of lymphoid infiltration of the tumor margin: A reproducible method, developed with colorectal cancer tissues, for assessing a highly variable prognostic factor. **Diagn Pathol** 2012; 7:156.

Amin MB, Edge S, Greene F, et al. **AJCC cancer staging manual**. 8ª ed. New York: Springer-Verlag; 2017. Breast; p.347-76.

Bauer K, Brown M, Cress R, Parise C, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: A population-based study from the California Cancer Registry. **Cancer** 2007; 109:1721-8.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Bychkovsky BL, Lin NU. Imaging in the evaluation and follow-up of early and advanced breast cancer: When, why, and how often? **Breast** 2017; 31:318-24.

Cabuk FK, Aktepe F, Kapucuoglu FN, Coban I, Sarsenov D, Ozmen V. Interobserver reproducibility of tumor-infiltrating lymphocyte evaluations in breast cancer. **Indian J Pathol Microbiol** 2018; 61:181-6.

Carey LA, Perou CM, Livas CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **J Am Med Assoc** 2006; 295:2492-502.

Chen DS, Mellman I. Oncology meet Immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity** 2013; 39:1-10.

Corben AD. Pathology of invasive breast disease. **Surg Clin North Am** 2013; 93:363-92.

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.

Denkert C, Wienert S, Poterie A, et al. Standardized evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: results of the ring studies of the international immuno-oncology biomarker working group. **Mod Pathol** 2016; 29:1155-64.

Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1992; 20:479-89.

Fortis SP, Sofopoulos M, Sotiriadou N, et al. Differential intratumoral distributions of CD8 and CD163 immune cells as prognostic biomarkers in breast cancer. **J Immunother Cancer** 2017; 5:39.

Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:298-306.

Gadiyaram V, Kurian S, Abraaham J, et al. Predominance of brain and lung metastasis in triple-negative breast cancer patients [abstract]. **Cancer Res** 2009; 69(24 suppl). [Presented at Thirty-Second Annual CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium; 2009; Dec 10-13; San Antonio, TX]

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science** 2006; 313:1960-4.

Hammond ME, Hayes DF, Wolf AC et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. Guideline recommendation for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Oncol Pract** 2010; 6:195-7.

Harries J, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. **Diseases of the breast**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. Prognostic and predictive markers. p.443-58.

Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method From the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma In Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. **Adv Anat Pathol** 2017; 24:235-51.

Hida AI, Ohi Y. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer proposal of a simpler method. **Ann Oncol** 2015; 26:2351.

Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, et al. Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials. the steep system. **J Clin Oncol** 2007; 25:2127-32.

Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, et al. Annual report to the nation on the status of cancer 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107:djv048.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** 1977; 33:159-75.

Lehmann B, Jovanović B, Chen X, et al. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. **PLoS ONE** 2016; 11:e0157368.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest** 2011; 121:2750-67.

Loi S, Michiels S, Salgado R, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. **Ann Oncol** 2014; 25:1544-50.

Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. **J Clin Oncol** 2013; 31:860-7.

Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:1949-55.

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

Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H, Briihlmann M. Methods in quantitative image analysis. **Histochem Cell Biol** 1996; 105:333-55.

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

Pruneri G, Vingiani A, Bagnardi V, et al. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. **Ann Oncol** 2016; 27:249-56.

Rakha EA, Reis-Filho J S, Ellis I O, Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 120:293-308.

Rathore AS, Kumar S, Konwa R, et al. CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. **Indian J Med Res** 2014; 140:361-9.

Rosen PP. Pathological assessment of nonpalpable breast lesions. **Semin Surg Oncol** 1991; 7:257-60.

Ruffell B, Au A, Rugo HS, Esserman LJ, Hwang ES, Coussens LM. Leukocyte composition of human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2012; 109:2796-801.

Salgado R, Denkert C, Campbell C, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and associations with pathological complete response and event-free survival in HER2-positive early-stage breast cancer treated with lapatinib and trastuzumab: a secondary analysis of the NeoALTTO trial. **JAMA Oncol** 2015a; 1:448-54.

Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILS Working Group 2014. **Ann Oncol** 2015b; 26:259-71.

Saraiva D, Cabral M D, Jacinto A, Braga S. How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. **ESMO Open** 2017; 2:e000208.

Savas P, Salgado R, Denkert C, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. **Nat Rev Clin Oncol** 2016; 13:228-41.

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

Schwartz GF, Birchansky CA, Komarnicky LT, et al. Induction chemotherapy followed by breast conservation for locally advanced carcinoma of the breast. **Cancer** 1994; 73:362-9.

Sharma P. Update on the treatment of early-stage triple-negative breast cancer. **Curr Treat. Options in Oncol** 2018; 19:22.

Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics 2018. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:7-30.

Simon RM, Paik S, Hayes DF. Use of archived specimens in evaluation of prognostic and predictive biomarkers. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:1446-52.

Simpson JF, Gray R, Dressler RG, et al. Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. **J Clin Oncol** 2000; 18:2059-69.

Sørli T, Perou C M, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, et al. Adjuvant chemotherapy guided by a 21-gene expression assay in breast cancer. **N Engl J Med** 2018; 379:111-21.

Swisher SK, Wu Y, Castaneda CA, et al. Interobserver agreement between pathologists assessing tumor-infiltrating lymphocytes (tils) in breast cancer using methodology proposed by the International TILs Working Group. **Ann Surg Oncol** 2016; 23:2242-8.



Tramm T, Di Caterino T, Jylling A-MB, et al. Standardized assessment of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: an evaluation of inter-observer agreement between pathologists. **Acta Oncol** 2018; 57:90-94.

Van Rooijen JM, Stutvoet TS, Schroder CP, De Vries EGE. Immunotherapeutic options on the horizon in breast cancer treatment. **Pharmacol Ther** 2015; 156:90-101.

West NR, Milne K, Truong PT, et al. Tumor infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. **Cancer Res** 2011; 13:R126.

Wolf AC, Hammond MEH, Hicks DG, et al. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol** 2013; 31:3997-4013.

## Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Heterogeneidade do infiltrado linfocitário tumoral e seu impacto na sobrevida do câncer de mama

**Pesquisador:** JOSE PEIXOTO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 60457916.3.0000.5205

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.770.465

## Anexo 2 - Carta de Anuência

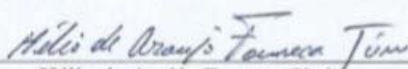


### CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins que aceitaremos o pesquisador Dr. José Peixoto a desenvolver o projeto de pesquisa intitulado **“Heterogeneidade do infiltrado linfocitário tumoral e seu impacto na sobrevida do câncer de mama”**, que tem como objetivo Avaliar a presença do TIL detectado através da coloração hematoxilina-eosina e imunohistoquímica em mulheres com diagnóstico histopatológico de câncer de mama do subtipo triplo negativo e a sua associação ao tempo de sobrevida livre de doença.

A aceitação está condicionada ao cumprimento do pesquisador aos requisitos da Resolução Nº 466/12 e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde (CNS) que trata da pesquisa envolvendo seres humanos, comprometendo-se a utilizar os dados e materiais coletados, exclusivamente para os fins da pesquisa. O projeto só poderá ser iniciado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco.

Recife, 26 de Setembro de 2016.



Hélio de Araújo Fonseca Júnior  
Superintendente Geral  
Hospital de Câncer de Pernambuco

Hélio de Araújo Fonseca Júnior  
Superintendente Geral  
Hospital de Câncer de Pernambuco

## Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DE CÂNCER DE PERNAMBUCO



### DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Venho por meio desta, informar ao Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer/ Hospital de Câncer de Pernambuco, que o projeto de pesquisa intitulado: HETEROGENEIDADE DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL E SEU IMPACTO NA SOBREVIDA DO CÂNCER DE MAMA, não utilizará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme previsto na resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde por se tratar de uma pesquisa que será conduzida através de dados extraídos de prontuário hospitalar. O autor da pesquisa compromete-se em resguardar os dados pessoais dos pacientes e informa que estes serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho exposto acima, incluídos sua aplicação na literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos.

Recife, 26 de Setembro de 2016.

  
Dr. José Peixoto

## Apêndice 2 - Técnica de Histofotometria Computadorizada.

- 1- Processar o material e marcar com técnica de imuno-histoquímica.
- 2- Usar o Software Zen – Lite (versão 5.0) para capturar as imagens.
  - a) Fotografar o material usando aumento de 100 X (objetiva de 20 X);
  - b) Resolução 2040 x 1536 (pixel);
  - c) Fazer o “Auto White Balance”;
  - d) Clicar em “SNAP” para capturar a imagem e “SAVE” para arquivar imagem;
- 3- Programa **Image Pró-plus** (versão 4.5):
  - a) Selecionar “process” e clicar em “segmentation”;
  - b) Selecionar a ferramenta de cor (conta gotas);
  - c) Selecionar “histogram Based” clicar no tom mais escuro da imagem selecionando-a.
  - d) Fazer o “New Mask”
  - e) Ir em “process” e clicar em “segmentation”;
  - f) Clicar em w”;
  - g) Para finalizar, ainda no programa **Image Pró-plus** (versão 4.5), clicar em “Histogram” e arrastar a linha na direção da esquerda até o eixo “X” para calcular a área e a porcentagem de células marcadas com (DAB).
  - h) Clicar em “View”, Clicar em “Range statistics”, Clicar em “Export Data”