

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DO
INFILTRADO INFLAMATÓRIO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS CLÁSSICOS
NOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DO
CARCINOMA MAMÁRIO**

MAYARA CAROLINNE SILVA BOTELHO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Botelho, Mayara Carolinne Silva

Caracterização imunofenotípica do infiltrado inflamatório e sua associação com fatores prognósticos e preditivos clássicos nos diferentes subtipos moleculares do carcinoma mamário / Mayara Carolinne Silva Botelho - São Paulo, 2017.

137p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2. Sistema Imunológico/Immune System,3. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 4. Expressão Gênica/Gene Expression. 5. Prognóstico/Prognosis

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha família, meus pais Fernando e Mary e a minha irmã Taynara, meus maiores exemplos de perseverança e força na busca de conhecimento e que apesar de todas as dificuldades souberam transmitir toda a sabedoria, amor e apoio constante, principalmente quando a distância, que fez tudo parece mais difícil e amedrontador.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela oportunidade de estar aqui e viver todas essas experiências e aprendizado.

Aos meus pais, Fernando e Mary e minha irmã, Taynara por todo o amor, suporte, carinho e compreensão nesse período que passei longe de casa. Sem vocês eu jamais teria conseguido.

Ao meu orientador Dr. Victor Piana de Andrade por todos os ensinamentos que vou levar comigo para sempre e confiança em mim depositada.

Agradeço ao pessoal da patologia investigativa em especial a Msc Marina de França Resende e José Ivanildo Neves que me ajudaram ativamente nesse trabalho.

À Dra. Dirce Maria Carraro, Dra. Elisa Napolitano e Dra. Mabel Pinilla-Fernández pelos ensinamentos e acesso aos dados de expressão em larga escala.

Aos meus amigos André Lavorato Rocha, Bruno Vilela e Mariana Resende, que me acolheram desde o meu início aqui em São Paulo.

À Ágatha Nagli, Irina Bobrovnitchaia, Monize Provisor e Elen Alves que fizeram toda esta experiência mais leve e divertida, com nossas conversas, almoços e chás da tarde juntas.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Botelho MCS. **Caracterização imunofenotípica do infiltrado inflamatório e sua associação com fatores prognósticos e preditivos clássicos nos diferentes subtipos moleculares do carcinoma mamário.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O microambiente tumoral é um fator chave na agressividade tumoral e prevê a resposta a terapias modernas como imunoterapia em alguns tipos de tumores. O câncer de mama é altamente heterogêneo nos níveis clínico e molecular, com variação morfológica quanto às células inflamatórias infiltrando o estroma tumoral. A contagem de linfócitos e macrófagos não faz parte das diretrizes atuais devido à falta de dados prognósticos ou preditivos.

Objetivo: Avaliar a presença, o tipo e o valor prognóstico do infiltrado inflamatório em neoplasias mamárias de diferentes subtipos moleculares.

Métodos: Realizamos um estudo retrospectivo utilizando a análise da expressão gênica de um painel de 37 genes relacionados à inflamação em 101 amostras congeladas de câncer de mama Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo Negativo, além de imuno-histoquímica automatizada (IHC) em 663 amostras de pacientes de câncer de mama invasor emblocadas em parafina, organizadas em *Tissue Microarrays* teciduais com foco na detecção dos linfócitos B (PAX5), linfócitos T (CD3, CD4, CD8, FOXP3) e macrófagos (CD68, CD163). Avaliamos o número absoluto de células positivas em três campos de grande aumento (400x) do tumor invasivo e as variáveis contínuas foram dicotomizadas em baixa x alta por estatística de maximização dos pontos de corte. Realizamos as análises estatísticas nos softwares R v3.3.0. e SPSS incluindo análise de agrupamento não supervisionado sobre dados de expressão gênica para identificar subgrupos e conjuntos de genes, análise supervisionada para detectar diferenças entre subtipos moleculares e curvas de probabilidade de sobrevivência livre de doença e câncer-específica usando o método de Kaplan-Meier. **Resultados:** Os resultados da expressão gênica

dois subgrupos de tumores mamários com diferentes perfis dos genes relacionados ao infiltrado inflamatório, um deles enriquecido para cânceres não luminais, mas sem relação com a sobrevida. Utilizando IHC, os tumores TN foram enriquecidos para CD3 ($p < 0,001$), CD68 ($p = 0,001$) e CD163 ($p = 0,019$) e mostraram menos FOXP3 ($p < 0,001$) em comparação com os tumores Luminal A. Pacientes com alto CD8, CD68, CD163 e baixo FOXP3 apresentaram maior probabilidade de recorrência [$p < 0,005$; RR respectivamente 2,58 (IC 1,36-4,89) 2,03 (IC 1,21-3,41); 4,78, (IC 1,06-3,01); 0,554 (IC 0,321-0,955)], mas a alta contagem de CD8 isolada apresentou menores taxas de mortalidade ($p = 0,021$, RR 0,478, IC 0,25-0,90). Ao analisar cada subtipo separadamente, altas contagens de CD8, CD163, FOXP3 e PAX5 associaram-se com uma maior chance de recorrência das pacientes no subtipo Luminal A [$p < 0,05$ respectivamente 6,73 (IC 1,83-24,65); 4,24 (IC 1,58-11,39); 4,04 (IC 1,12-14,50); 2,27 (IC 0,84-6,15)]. Já as pacientes do subtipo Luminal B tiveram maior risco de vir a óbito quando havia pouca presença de CD8 e altas presenças de CD68 e CD163 [$p < 0,05$ respectivamente 0,33 (IC 0,12-0,92); 4,77 (IC 1,03-22,08); 4,51, (IC 0,577-35,271)]. E as pacientes triplo negativo tiveram maior chance de evoluir a óbito quando não havia presença das células CD3, CD4 e CD8 ($p < 0,05$ respectivamente 0,12 (IC 0,23-0,62); 0,15 (IC 0,03-0,75); 0,15 (IC 0,02-1,19)].

Conclusão: Os subtipos moleculares de câncer de mama estão associados a diferentes perfis de células inflamatórias e o valor prognóstico das células tumorais variam entre os subtipos moleculares. Alta expressão de genes de CD8 e alta infiltração de CD8 predominam nos tumores não-luminais e está associada com maior risco de recorrência tumoral.

Descritores: Neoplasias da Mama. Sistema Imunológico. Imuno-Histoquímica. Expressão Gênica. Prognóstico.

SUMMARY

Botelho MCS. **[Immunophenotypic characterization of the inflammatory infiltrate and its association with classical prognostic and predictive factors in the different molecular subtypes of mammary carcinoma]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Tumor microenvironment is a key factor in tumor aggressiveness and predicts response to modern therapies as immunotherapy in some tumor types. Breast cancer is highly heterogeneous at clinical and molecular levels, with great variation regarding inflammatory cells infiltrating the tumor. Lymphocyte counting is not part of current guidelines due to lack of prognostic or predictive data. **Objective:** To evaluate the intensity, cell types and prognostic value of inflammatory cells in breast neoplasms of different molecular subtypes. **Methods:** We conducted a retrospective study using gene expression analysis of a 22-gene panel related to inflammation on 101 frozen samples of Luminal A, Luminal B, HER2 and Triple Negative breast cancers. Yet, we performed automated immunohistochemistry (IHC) staining on 663 formalin fixed-paraffin embedded patient samples organized in Tissue Microarrays to detect B-cell (PAX5), T-cell (CD3, CD4, CD8, FOXP3) and macrophage (CD68, CD163) markers. We counted the absolute number of positive cells in three high power fields (400x) of the tumor and continuous variables were dichotomized in low x high by maximally selected long-rank statistic for cut-points. We conducted all statistical analysis on R software v3.3.0. including unsupervised “cluster”ing analysis on gene expression data to identify subgroups and gene sets, supervised analysis to detect differences across molecular subtypes and disease free survival and cancer specific survival using Kaplan-Meier method. **Results:** Gene expression identified two subgroups with distinct inflammatory profiles, one of them enriched for non-luminal cancers. Using immunohistochemistry, triple negative (TN) tumors were enriched for CD3 ($p < 0.001$), CD68 ($p = 0.001$) and CD163 ($p = 0.019$)

and showed less FOXP3 ($p < 0.001$) compared to Luminal A tumors. Tumors harboring the combination of high CD8, CD68, CD163 and low FOXP3 were more likely to recur [$p < 0.005$; RR respectively 2.58 (CI 1.36-4.89) 2.03 (CI 1.21-3.41); 4.78 (IC 1.06-3.01); 0.554 (CI 0.321-0.955)], but isolate high CD8 count had lower mortality rates ($p = 0.021$, RR 0.478, CI 0.25-0.90). Luminal A tumors with high CD8, CD163, FOXP3, and PAX5 counts showed higher likelihood of recurrence [$p < 0.05$, respectively, 6.73 (CI 1.83-24.65); 4.24 (IC 1.58-11.39); 4.04 (CI 1.12-14.50); 2.27 (IC 0.84-6.15)]. Luminal B subtype showed higher risk of death associated with low counts of CD8 and high counts of CD68 and CD163 ($p < 0.05$, respectively, 0.33 (CI 0.12-0.92); 4.77 (CI 1.03-22.08); 4.51, (IC 0.58-35.27)]. Triple Negative presented a higher risk of death in the absence of CD3, CD4 and CD8 cells ($p < 0.05$, respectively 0.12 (CI 0.23-0.62), 0.15 (CI 0.03-0.75); 0.15 (CI 0.02-1.19)]. **Conclusion:** Breast cancer molecular subtypes are associated with distinct inflammatory cell profiles and the prognostic value of each cell may vary across molecular subtypes. High CD8 gene expression and high CD8 infiltration is characteristic of non-luminal tumors and it is associated with higher risk of tumor recurrence.

Key words: Breast Neoplasms. Immune System. Immunohistochemistry. Gene Expression. Prognosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação clínica do câncer de mama invasivo com base na expressão do Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesterona e HER2.....	8
Figura 2	Características funcionais das células tumorais.....	22
Figura 3	Descrição dos passos da metodologia de análise de perfis diferenciais de RNA por microarrays usada pela Dra. Pinilla-Fernández, desde isolamento da amostra até a hibridação.....	37
Figura 4	Visão panorâmica de uma lâmina de Tissue Microarray corada por imuno-histoquímica	41
Figura 5	Exemplo dos gráficos obtidos pela metodologia de estimativa de maximização do ponto de corte pelo teste estatístico log-rank.....	45
Figura 6	Resultado gráfico (Heatmap) da análise de agrupamento hierárquico dos genes relacionados ao infiltrado inflamatório nas amostras de carcinoma mamário, revelando dois grupos com perfil de expressão diferentes	50
Figura 7	Curvas de SCE e SLD dos grupamentos da “clusterização” usando o método de Kaplan-Meier	53
Figura 8	“Heat-map” com genes marcados	55
Figura 9	Fluxograma dos critérios de exclusão das amostras na avaliação por IHQ.....	57

Figura 10	Fotomicrografias das colorações imuno-histoquímicas representando a heterogeneidade quanto as populações de células inflamatórias no câncer de mama. Anticorpos anti-CD3, anti-CD4, e anti-CD8, 100x	60
Figura 11	Fotomicrografias das colorações imuno-histoquímicas representando a heterogeneidade quanto as populações de células inflamatórias no câncer de mama. Anticorpos anti-CD68, anti-CD163, anti-FOXP3 e anti-PAX5, 100x.....	61
Figura 12	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD3 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário	63
Figura 13	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD4 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário	64
Figura 14	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD8 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário	66
Figura 15	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD68 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário.....	67
Figura 16	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD163 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário.....	69
Figura 17	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo FOXP3 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário.....	70

Figura 18	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo PAX5 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário.....	71
Figura 19	Curva de Sobrevida Câncer Específica para o câncer de mama em função do número de células CD8 positivas	76
Figura 20	Curvas mostrando a proporção de indivíduos Livre de Doença calculado pelo método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank em função das subpopulações de células inflamatórias	81
Figura 21	Curvas mostrando a proporção de indivíduos Livre de Doença calculado pelo método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank em função das subpopulações de células inflamatórias	84
Figura 22	Curvas de SLD com pontos de corte específicos para LA dos marcadores CD8, CD163, FOXP3 e PAX5	86
Figura 23	Curva de sobrevida câncer específica do marcador CD163 no subtipo LB	87
Figura 24	Curvas de SCE dos marcadores CD8, CD163 e PAX5 com ponto de corte específico para o subtipo LB	89
Figura 25	Curva de sobrevida câncer específica do marcador CD4 no subtipo TN	90
Figura 26	Curvas de SCE dos marcadores CD3, CD4 e CD8 com ponto de corte específico do subtipo TN	92
Figura 27	Curvas de SCE e SLD comparando os grupos Luminais versus não-luminais	94
Figura 28	Gráficos que mostram as diferenças de frequência dos marcadores nos grupos Luminais e Não-Luminais	96

Figura 29	Curvas das SCE e SLD comprando os grupos HER2 Positivo e HER2 negativo	97
Figura 30	Gráficos que mostram os as diferenças de frequência dos marcadores nos grupos HER2 positivos e HER2 negativos	99
Figura 31	Esquema de marcadores relacionados com os diferentes subtipos de linfócitos	101
Figura 32	Esquema de marcadores relacionados com os diferentes subtipos de macrófago	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Comparação entre as características moleculares dos macrófagos M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios)	15
Quadro 2	Células do sistema imune seus marcadores, subtipos e função	21
Quadro 3	Lista de alguns trabalhos de contagem do infiltrado inflamatório mostrando diferentes métodos de avaliação	30
Quadro 4	Características técnicas dos protocolos das reações de coloração imuno-histoquímica	43
Quadro 5	Lista de sondas de RNAm estudadas nas amostras, que estavam diferencialmente expressas entre os grupos da “clusterização”	54
Quadro 6	Quantificação das amostras nos diferentes subtipos.....	62
Quadro 7	Relação dos diferentes pontos de corte tanto em quando avaliamos todos os subtipos moleculares, como quando o cálculo foi feito para cada subtipo individualmente em relação a sobrevida câncer específica	82
Quadro 8	Relação dos diferentes pontos de corte tanto em quando avaliamos todos os subtipos moleculares, como quando o cálculo foi feito para cada subtipo individualmente em relação a sobrevida livre de doença	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínico-patológicas das amostras da Dra. Pinilla-Fernández	48
Tabela 2	Características clínico-patológicas das amostras que foram “clusterizados” formando o grupo A da Figura 7	51
Tabela 3	Características clínico-patológicas das pacientes usadas para imuno-histoquímica	58
Tabela 4	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD3 em cada subtipo molecular do câncer de mama	63
Tabela 5	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD4 em cada subtipo molecular do câncer de mama	65
Tabela 6	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD8 em cada subtipo molecular do câncer de mama	66
Tabela 7	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD68 em cada subtipo molecular do câncer de mama	68
Tabela 8	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD163 em cada subtipo molecular do câncer de mama ..	69
Tabela 9	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo FOXP3 em cada subtipo molecular do câncer de mama..	71
Tabela 10	Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo PAX5 em cada subtipo molecular do câncer de mama	72

Tabela 11	Comparação da proporção de indivíduos vivos (com ou sem doença; Sobrevida Câncer Específica) após 10 anos de seguimento, em função da presença de linfócitos CD8 positivos.....	74
Tabela 12	Modelo de regressão de Cox univariada para sobrevida câncer específica em função da ausência de linfócitos CD8 positivos.....	74
Tabela 13	Risco relativo para os fatores prognósticos clássicos e presença de linfócitos CD8 através da regressão de Cox multivariada aplicada à sobrevida câncer específica.....	75
Tabela 14	Comparação das proporções de indivíduos livre de doença aos 10 anos de seguimento, de acordo com ponto de corte maximizado em cada imunomarcador	77
Tabela 15	Risco relativo de sobrevida livre de doença obtido pela regressão de Cox univariada para os imunomarcadores selecionados pela significância estatística no método de Kaplan-Meier	78
Tabela 16	Risco Relativo de recorrência do câncer de mama em 120 meses segundo o modelo de regressão de Cox multivariada para os fatores prognósticos clássicos e marcadores imuno-histoquímicos com relevância estatística na análise univariada.....	79
Tabela 17	Modelo de regressão de Cox univariada aplicada à Sobrevida Livre de Doença no subtipo LA.....	85
Tabela 18	Modelo de regressão de Cox univariado aplicada à Sobrevida Livre de Doença com ponto de corte específico do subtipo LA.....	86
Tabela 19	Modelo de regressão de Cox univariada aplicada à sobrevida câncer específica no subtipo LB	88

Tabela 20	Modelo da regressão de Cox univariado aplicada à sobrevida câncer específica no subtipo LB com os pontos de corte específicos	90
Tabela 21	Modelo de regressão de Cox univariado aplicada à sobrevida câncer específica no subtipo TN	91
Tabela 22	Valores da regressão de Cox univariado aplicada à sobrevida câncer específica com os pontos de corte específicos do subtipo TN	93
Tabela 23	Valores médios de células imunomarcadores nas categorias Luminais e Não-Luminais.....	95
Tabela 24	Tabela de comparação dos marcadores nos subtipos HER2 positivos e HER2 negativos	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAT	antígeno associado a tumores
AJCC	do inglês, American Joint Committee on Cancer
APC	célula apresentadora de antígenos
CCR2	do inglês, receptor de quimiocina do tipo 2
CCR7	do inglês, receptor de quimiocina do tipo 7
CD	células dendríticas
CD	“cluster” de diferenciação
CK14	citoceratina 14
CK17	citoceratina 17
CK5	citoceratina 5
CM	Câncer de mama
CTLA-4	do inglês, antígeno 4 de linfócito T citotóxico
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGFR	do inglês, receptor do fator de crescimento epidérmico
FDR	“false discovery rate”
FOXP3	gene, forkhead box P3
HER2	“Human Epidermal growth factor Receptor 2”
HLA	antígenos leucocitários humanos
IFN	interferon
IFN-γ	interferon gamma
IHQ	imuno-histoquímica
IL	interleucina
IL-1α	interleucina 1 alfa
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-1R I	receptor 1 da interleucina 1
IL-1R II	receptor 2 da interleucina 1
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10

IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-23	interleucina 23
ILC1	células linfoides inatas 1
ILC3	células linfoides inatas 3
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iNOS	“Inducible nitric oxide synthase”
JNK	quinase c-Jun N-terminal
Ki-67	proteína Ki-67
KLF4	“Kruppel like factor 4”
LA	subtipo luminal A
LB	subtipo luminal B
LIT	linfócitos intra-tumorais
LN	linfonodos
LTA	linfócito T auxiliar
LTC	linfócito T citotóxico
LTHF	linfócito T helper folicular
LTH	linfócitos T helper
MAC	macrófago
MAT	macrófagos associados ao tumor
M	metástase
M1	macrófago do perfil 1
M2	macrófago do perfil 2
M2a	macrófago do perfil 2a
M2c	macrófago do perfil 2c
MUC1	gene, mucin 1
N	status linfonodal
NCCN	do inglês, “National Comprehensive Cancer Network”
NF-KB	fator nuclear kappa beta
NK	células natural killer
p53	proteína p53
p63	proteína p63

PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PAX5	gene, paired box 5
PD1	morte celular programada 1
RE	receptor de estrógeno
RNA	ácido ribonucleico
RORγt	ácido retinóico relacionado com o receptor órfão de receptor gamma T
RP	receptor de progesterona
SCE	sobrevida câncer específica
SEER	do inglês, Surveillance epidemiology, and End Results
SLD	sobrevida livre de doença
STAT-3	gene, ativador de transcrição e tradutor de sinal 3
T	tamanho do tumor
TAM	macrófago associado ao tumor
T-bet	fator de transcrição T-box do receptor específico de células T
TGF-β	fator de crescimento transformador- β
TLR	receptor toll-like
TMA	tissue microarray
TN	subtipo triplo negativo
TNF	fator de necrose tumoral
TRAIL	ligante indutor de apoptose relacionado com TNF
Treg	linfócito T regulatório
TLR	do inglês, "Toll-Like receptor"
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer de mama	1
1.1.1	Epidemiologia	1
1.1.2	Classificação	2
1.1.3	Tratamento	9
1.2	O sistema imune.....	12
1.2.1	Classificação	12
1.2.2	A Imunovigilância	21
1.2.3	O câncer de mama e o sistema imune	24
1.3	Justificativa	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	A expressão gênica	34
3.1.1	Casuística.....	34
3.1.2	Escolha dos genes para análise.....	38
3.2	Imuno-histoquímica	39
3.2.1	Casuística.....	39
3.2.2	A imuno-histoquímica	41
3.2.3	Quantificação da reação imuno-histoquímica.....	44
3.2.4	Análise estatística.....	44
4	RESULTADOS	47
4.1	A expressão gênica	47
4.1.1	Casuística.....	47
4.1.2	A análise da expressão gênica.....	49

4.2	A Imuno-histoquímica	56
4.2.1	Casuística	56
4.2.2	Reação de imuno-histoquímica	59
4.2.3	Comparação dos imunomarcadores	62
4.2.4	Análise de Sobrevida	73
4.2.4.1	Sobrevida câncer específica	73
4.2.4.2	Sobrevida livre de doença	75
4.2.5	Comparação dos subtipos moleculares	82
4.2.6	Avaliação dos grupos	93
4.3	Associação da expressão em larga escala e expressão imuno- histoquímica	100
4.3.1	Linhagem linfocitária	100
4.3.2	Linhagem mieloide	102
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÃO	111
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-
Comitê de Ética em Pesquisa
- Anexo 2** Tabela de classificação dos carcinomas mamários
segundo o TNM de acordo com o preconizado pelo AJCC
de 2010.
- Anexo 3** Tabela de classificação do estadiamento do paciente
segundo o AJCC de 2010
- Anexo 4** Descrição passo a passo da metodologia usada pela Dra.
Palheiros

APÊNDICES

- Apêndice 1** Tabela com todos os genes e sondas usados para avaliar o infiltrado inflamatório na expressão gênica
- Apêndice 2** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e modelo de regressão de Cox univariado para todas as pacientes
- Apêndice 3** Curvas de Sobrevida Livre de Doença e modelo de regressão de Cox univariado para todas as pacientes
- Apêndice 4** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Luminal A
- Apêndice 5** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença e modelo de regressão de Cox univariado com os pontos de cortes específicos do subtipo Luminal A
- Apêndice 6** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Luminal B
- Apêndice 7** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença e modelo de regressão de Cox univariado com os pontos de cortes específicos do subtipo Luminal B
- Apêndice 8** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Triplo Negativo
- Apêndice 9** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença e modelo de regressão de Cox univariado com os pontos de corte específicos do subtipo Triplo Negativo
- Apêndice 10** Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença para o subtipo HER2

Apêndice 11 Curvas de Sobrevida Câncer Específica e Sobrevida Livre de Doença com os pontos de corte exclusivos do subtipo HER2

Apêndice 12 Curvas de Sobrevida Livre de Doença para o modelo de associação CD8/FOXP3

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA

1.1.1 Epidemiologia

O projeto Globocan/IARC, realizado em 2012 indicou que, dos 14 milhões de novos casos de câncer estimados no mundo, mais de 60% ocorreriam em países em desenvolvimento, como o Brasil. Para a mortalidade, a situação é ainda mais delicada visto que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreriam nesses mesmos países (FERLAY et al. 2013). Ao explorarmos o câncer de mama (CM), classificamos como o segundo mais frequente no mundo, com cerca de 1,7 milhões de novos casos, perdendo apenas para o câncer de pulmão. Ainda assim, ele é o de maior incidência e mortalidade em mulheres, representando 12% de todos os novos tipos de câncer e 25% de todos os cânceres em mulheres, além de ser o responsável por, aproximadamente, 500 mil mortes ocorridas em 2012 (FERLAY et al. 2013).

Segundo os dados do programa *Surveillance Epidemiology, and End Results-SEER* (2018), do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos, durante os anos de 1990 a 2000, a taxa de incidência de câncer de mama aumentou cerca de 3% ao ano. Baseando-se na estimativa de câncer de mama dos anos 2011 a 2013, aproximadamente 12% das mulheres serão diagnosticadas com essa doença ao longo da vida. Em 2018, o Instituto

Nacional do Câncer (INCA) estimou 57.960 casos novos de câncer de mama, com um risco de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. Apenas em 2016 foram estimados 40.000 óbitos devido a esse câncer (Ministério da Saúde 2018).

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico quando diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade por câncer da mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. A sobrevida média após cinco anos tem apresentado um discreto aumento na população de países desenvolvidos, atualmente é de 85%, entretanto nos países em desenvolvimento, como no Brasil, a sobrevida continua com valores entre 50 e 60% (Ministério da Saúde 2018).

Segundo a OMS, o número de mortes relacionadas ao câncer no Brasil aumentou em 31% entre os anos de 2000 e 2015. Em 2015 foram estimadas 223.400 mortes, sendo o CM o maior responsável pelas mortes relacionadas a câncer nas mulheres (Ministério da Saúde 2018).

1.1.2 Classificação

O CM é altamente heterogêneo tanto na apresentação clínica, como no microscópico e nos achados moleculares e na evolução em cada paciente (World Health Organization-WHO 2012). Os fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico, que servem como preditores da sobrevida do paciente. No câncer de mama, são consideradas as características demográficas (idade, menopausa entre outros) características do tumor (tamanho tumoral, comprometimento

linfonodal, tipo histológico) e marcadores biológicos como o padrão de expressão dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona), bem como a amplificação gênica e/ou aumento de expressão da proteína HER2 (MUGGERUD et al. 2010).

O sistema de estadiamento utilizado para o câncer de mama é o sistema TNM da American Joint Committee on Cancer. O sistema TNM utiliza três critérios do momento diagnóstico para avaliar o estágio do câncer e estimar o risco de óbito pela doença: o tamanho do tumor, o status dos linfonodos regionais e a presença de disseminação sistêmica. Os grupos de estágio anatômico do TNM estão associados com sobrevida global (OS) e SLD (SOBIN et al. 2012).

O tamanho do tumor (T) é um parâmetro que mostra excelente correlação com a sobrevida global e risco de recorrência. Quanto maior a lesão, pior o prognóstico, desde que todas as outras variáveis permaneçam comparáveis. Pacientes com tumores < 1,0 cm têm uma sobrevida geral próxima de 99% comparado com 89% para tumores entre 1,0 e 3,0 cm e 86% para tumores entre 3 e 5 cm (CARTER et al. 1989). Das pacientes com tumores menores do que 1,0 cm e sem comprometimento linfonodal e que foram acompanhadas por 10 anos, 90% estavam livres da doença (FITZGIBBONS et al. 2000; NAROD 2012).

O status dos linfonodos (N) axilares é avaliado por ressecção cirúrgica e posterior análise anatomopatológica, que permite estabelecer o comprometimento metastático neles (CARTER et al. 1989). Estudos têm descrito que seis linfonodos (LNs) são o mínimo necessário para avaliar

adequadamente as metástases linfonodais (KATZ et al. 2008), mas geralmente são avaliados 10 ou mais LNs (SCHIFFMAN et al. 2011). O número de linfonodos comprometidos é importante, porque se tem demonstrado que existe uma associação entre quantidade de linfonodos positivos e o aumento da mortalidade (SCHIFFMAN et al. 2011). Já a metástase sistêmica (M) informa se houve ou não migração por via sanguínea com implantação e crescimento em órgãos distantes da mama, um achado que diminui significativamente a chance de cura e o tempo de sobrevida das pacientes (EDGE et al. 2010). No Anexo 2 temos a Tabela de classificação dos tumores mamários de acordo com o TNM.

Ao avaliarmos as categorias T, N e M agrupadas em combinações pré-estabelecidas elas ficam distribuídas em estádios que variam de I a IV, segundo critérios da AJCC de 2010. Estes estádios podem ser subclassificados em A e B, para expressar o nível de evolução da doença. Dessa forma podemos avaliar melhor a gravidade da doença. Esta é uma avaliação importante porque prediz a taxa de sobrevida em 5 anos: 95, 85, 70, 52, 48 e 18% para os estádios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV, respectivamente (NEWMAN 2009). A descrição da classificação dos estadiamento está no Anexo 3.

O perfil genético do tumor tem tido um impacto considerável na compreensão biológica do CM já que nos últimos 15 anos, 4 subtipos moleculares intrínsecos de câncer de mama foram caracterizados. No painel da 8 edição da AJCC, que será válido a partir de 2018, os especialistas em mama incluíram a incorporação de fatores biológicos como o grau de

diferenciação histológica do tumor, a expressão de receptores hormonais e HER2, além dos painéis prognósticos e preditivos multigênicos para o estadiamento, concluindo que o progresso no entendimento da biologia, do diagnóstico e da terapêutica tornava obrigatória a incorporação da biologia no atual sistema de estadiamento (GIULIANO et al. 2017).

Os 4 subtipos moleculares do CM mostram diferenças significativas em termos da incidência, dos fatores de risco, do prognóstico e da sensibilidade aos tratamentos disponíveis. Por meio da análise do perfil de expressão gênica os CM são categorizados em luminais (A e B), superexpressor de HER2 e basal-símile (PEROU et al. 2000):

1. Luminal A (LA): Tumores com alta expressão de citoceratinas usualmente expressas na célula luminal, como 8 e 18 e receptores hormonais e/ou genes relacionados à função destes; além de possuírem baixa expressão de HER2, genes relacionados ao ciclo celular e os usualmente associados à diferenciação das células mioepiteliais, como as citoceratinas de alto peso molecular 5, 14 e 17, ou ainda o gene EGFR. Neste grupo, concentram-se os tumores de pacientes na pós-menopausa, com menor agressividade biológica, com boa resposta à hormonioterapia (Tamoxifeno ou Inibidores de Aromatase) e relativa resistência à quimioterapia.
2. Luminal B (LB): Perfil transcricional similar ao anterior, porém com uma maior expressão de genes relacionados ao ciclo celular, sendo um grupo com apresentação clínica e evolução biológica mais heterogênea, sendo

a hormonioterapia indicada, e a sensibilidade à quimioterapia maior que nos tumores LA.

3. Enriquecido para HER2 (HER2): tumores com baixa expressão de receptores hormonais e hiperexpressão do gene HER2 ou de genes relacionados à função deste, tendo como resultado um alto índice proliferativo. Representam cerca de 15-20% dos cânceres da mama e exibem sensibilidade a quimioterapia e resposta a terapias que bloqueiem HER2, como o Trastuzumabe, Pertuzumabe, Lapatinibe.
4. Basal-símile: Tumores que não expressam receptores hormonais ou proteína HER2 e exibem alta expressão de genes relacionados ao ciclo celular. Este grupo representa cerca de 15% dos tumores mamários e está mais presente nas pacientes jovens em tumores de caráter hereditário. Possuem um comportamento biológico agressivo com metástases hematogênicas mais frequentes do que os demais tipos de tumores mamários e menor propensão a metástases linfática.

Essa identificação dos subtipos moleculares de câncer de mama e do desenvolvimento de assinaturas moleculares prognósticas e preditivas, através de perfis de expressão gênica, resultou em um melhor entendimento da heterogeneidade biológica do câncer de mama (WEIGELT et al. 2010). Embora o padrão-ouro para a classificação molecular do câncer de mama continue sendo a expressão gênica, por questões de custo e logística a imuno-histoquímica tem sido utilizada para a classificação molecular, sendo reconhecida pelos consensos mundiais, estudos comparativos e de meta-análises (WIRAPATI et al. 2008; HAIBE-KAINS et al. 2008; KIM e PAIK 2011)

como uma ferramenta útil no estabelecimento prognóstico e terapêutico do câncer de mama. Baseando-se nela e utilizando 4 marcadores (Receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 e o índice proliferativo mensurado pela expressão de Ki-67) os tumores de mama são classificados como representadas na Figura 1 (UNTCH et al. 2013 – Consenso de St Gallen):

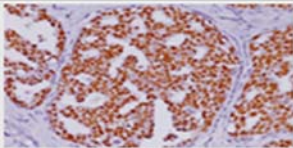
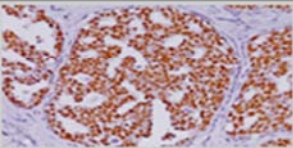
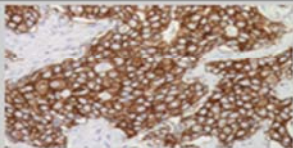
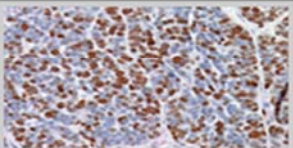
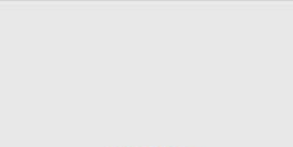
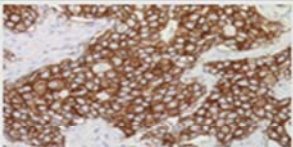
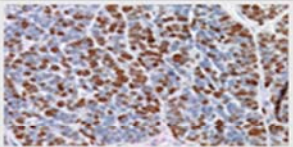
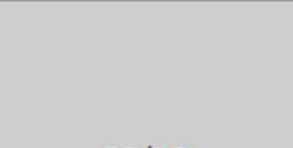
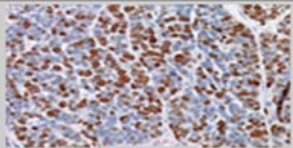
Luminal A	 RE/RP	HER-2	KI-67	• Idosas • Bom prognóstico • Hormônio • Poucas mutações
Luminal B	 RE/RP	 HER-2	 KI-67	• Idade variável • Prognóstico variável • Hormônio e QT • Carga mutacional
HER-2	 RE/RP	 HER-2	 KI-67	• Idade variável • Pior prognóstico • Anti-HER e QT • Alta carga mutacional
Triplo Negativo	 RE/RP	HER-2	 KI-67	• Jovens • Pior prognóstico • QT • Alta carga mutacional

Figura 1 - Classificação clínica de câncer de mama invasivo com base na expressão de Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP) e HER2. A expressão de RE, RP e HER2 é observada utilizando imuno-histoquímica. Os cânceres da mama são geralmente classificados como Luminal A: expressor de RE e/ou RP com baixo índice mitótico (Ki-67 baixo). Luminal B: expressor de RE e/ou RP com expressão de HER2 ou alto índice proliferativo. HER2: expressor de HER2 com índice mitótico variável. Triplo-Negativo: não expressa RE, RP ou HER-2. Ampliação original, ×40. Características da faixa etária das pacientes, prognóstico, tipos de tratamento responsivos e carga mutacional em cada subtipo.

Segundo a classificação de St Gallen de 2013 (Consenso de St Gallen 2013) e a ASCO/CAP os subtipos são divididos segundo as seguintes percentagens (HAMMOND et al. 2010):

1. LA: Positivo para RE ($\geq 1\%$) e RP ($\geq 20\%$), Negativo para HER2, Ki-67 $\leq 20\%$;
2. LB: Positivo para RE ($\geq 1\%$) com qualquer das 3 situações: RP ($< 20\%$), HER2 positivo ou Ki-67 $\geq 20\%$;
3. HER2: Negativo para RE e RP, positivo para HER2, qualquer Ki-67 (usualmente $> 20\%$);
4. TN: Negativo para RE, RP e HER2, qualquer Ki-67 (usualmente $> 20\%$).

1.1.3 Tratamento

O tratamento varia de acordo com o tipo e estágio do tumor. Assim, a definição terapêutica é determinada caso a caso, sendo que quando mais cedo for descoberta a doença, maiores serão as chances de cura.

A terapia local é composta pela cirurgia que é a modalidade de tratamento mais antiga e, quando o tumor se encontra em estágio inicial e em condições favoráveis para a retirada, a mais efetiva (HAMAKER et al. 2013). Já a radioterapia utiliza a radiação ionizante e é muito utilizada como terapia adjuvante para reduzir o risco de recorrência loco-regional para tumores localizados, combinada com cirurgias conservadora ou para tumores que não podem ser retirados totalmente por cirurgia, (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group et al. 2014).

Há, também, as terapias sistêmicas adjuvantes como a quimioterapia a hormônioterapia ou as terapias-alvo, que utilizam medicamentos orais ou intravenosos com o objetivo de destruir, controlar ou inibir o crescimento das células tumorais que por ventura tenham se disseminado e, portanto, não são alvos da cirurgia ou radioterapia. (National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2016). A hormonioterapia tem como objetivo impedir a ação dos hormônios e age bloqueando ou suprimindo os efeitos proliferativos deles sobre as células neoplásicas da mama (TEVAARWERK et al. 2014). Por fim, a terapia-alvo que é um tipo de tratamento que usa drogas ou outras substâncias que atacam especificamente às células cancerígenas bloqueando alvos moleculares responsáveis pela agressividade tumoral e provocam menos danos às células normais (NCCN 2016).

A quimioterapia neoadjuvante tem sido a estratégia de tratamento padrão para pacientes com câncer de mama localmente avançado, inflamatório, inoperável ou com metástase para linfonodos regionais comprovada. É administrada antes da cirurgia para tentar reduzir o tamanho do tumor de modo que ele possa ser retirado com uma cirurgia menos extensa. Além disso, administrar o quimioterápico antes do tumor ser removido, permite avaliar como o tumor responde ao tratamento. Se o primeiro esquema de medicamentos quimioterápicos não reduzir o tumor, o médico saberá que outras drogas serão necessárias (NAMURA et al. 2018).

Ainda assim, mesmo com todas essas possibilidades de tratamento, a mortalidade por câncer de mama é alta, o que leva a necessidade de novas pesquisas sobre tratamentos. Recentemente, uma nova modalidade

terapêutica ganhou espaço no tratamento das neoplasias. A imunoterapia, cujo intuito é estimular o sistema imunológico a reconhecer e destruir o tumor, foi aprovada para tratar pacientes com melanoma, tumores de pulmão, bexiga, linfomas e carcinomas de cabeça e pescoço. tem sido estudada para as pacientes de câncer de mama (DENARDO et al. 2011).

Várias vacinas foram criadas usando peptídeos tumorais, como MUC1, CEA e mesmo o HER2. Cada uma dessas foram consideradas seguras e imunogênicas, mas sua eficácia e vantagens para sobrevivência do paciente foram muito variáveis (MILANI et al. 2014). Porém, nos últimos anos, a imunoterapia sofreu uma revolução, Os antagonistas do ponto de controle imune específicos para CTLA-4, PD-1 e PD-L1 revolucionaram a terapia do câncer, induzindo respostas objetivas duráveis que às vezes se traduzem em um benefício de sobrevivência global em vários tipos de câncer embora vários medicamentos sejam agora aprovados pela FDA para cânceres múltiplos, nenhum ainda foi aprovado para câncer de mama. Mesmo assim, os antagonistas de CTLA-4 tremelimumabe e ipilimumabe foram testados em pequenos trials clínicos de câncer de mama, com evidência de modulação imunológica. Além disso, dados acumulados sugerem que os antagonistas da sinalização PD-1 / PD-L1 podem induzir respostas clínicas duradouras em alguns pacientes com CM TN metastático e provavelmente também têm atividade clínica significativa em alguns pacientes ER+ HER2- também (EMENS 2018). No câncer de mama, esse campo ainda tem muito a ser explorado, como: quais as células presentes que realmente participam da

eliminação do câncer, qual a relação com cada subtipo e em qual caso a imunoterapia tem uma melhor resposta (MACCALLI et al. 2017).

1.2 O SISTEMA IMUNE

1.2.1 Classificação

A homeostasia é a tendência existente em organismos para que haja o equilíbrio e conservação de elementos fisiológicos e do metabolismo através de alguns mecanismos de regulação. Homeostasia ocorre quando substâncias químicas estão em concentrações adequadas, a temperatura é estável e a pressão é apropriada. PRADEU et al. (2013) propuseram que o sistema imunológico é ativado por uma mudança da homeostasia que é mantida por uma rede de ativadores e supressores que possuem atividades pro e anti-inflamatórias (EBERL et al. 2015).

Participam da homeostasia o sistema imune inato e o adaptativo. O sistema imune inato utiliza o reconhecimento de padrões de patógenos, inespecífico e mais restrito. Dentre os receptores encontram-se o receptor Toll-like (TLR), o receptor de lectina do tipo C, receptor do tipo NOD (CAO et al. 2016). No sistema imune adaptativo, células dendríticas fagocitam, processam e apresentam fragmentos (antígenos) dos patógenos as células-T, que induzem proliferação policlonal, com um complexo processo de recombinação e edição dos genes dos receptores de antígenos diferente em cada clone, gerando receptores de reconhecimento mais com afinidades diversas aos antígenos apresentados. Os clones com baixa afinidade aos

antígenos são induzidos a apoptose e aqueles com alta afinidade permanecem por mais tempo e geram células ativadas para produzir em grande escala os anticorpos de alta eficiência contra o patógeno em questão. Em paralelo, células de memória com mesma capacidade são geradas e serão ativadas no caso de reexposição aos mesmos patógenos no futuro, gerando uma imunidade duradoura. Este mecanismo, apesar de mais complexo, gera respostas mais específicas para o agressor do momento, com potencial para reconhecer uma gama mais diversificada de antígenos (BOEHM 2011).

Dentre as células do sistema imune inato, destaca-se a presença dos macrófagos.

Os macrófagos participam em funções variadas incluindo o desenvolvimento, a homeostase, a reparação de tecidos e a imunidade (SICA e MANTOVANI 2012). Existem vários tipos e estágios de ativação dos macrófagos e com limitações das classificações que não conseguem representar o complexo ambiente vivo para a maioria dos macrófagos, em que muitas citocinas e fatores de crescimento interagem para definir o estado diferenciado final. O Projeto de Genoma Imunológico mostra que populações de macrófagos residentes em um tecido possuem alta diversidade transcricional com sobreposição mínima, sugerindo que existem muitas classes de macrófagos (GAUTIER et al. 2012). De forma simplificada, a classificação dos macrófagos em M1/M2 é a mais utilizada. Os macrófagos foram categorizados em macrófagos M1 "pró-inflamatórios" ou M2 "anti-inflamatórios" dependendo de uma grande diversidade na liberação de

citocinas, marcadores de superfície celular e diferentes perfis de transcrição (MANTOVANI e SICA 2010; TIAN e CHEN 2015; CHEN e MELLMAN 2017).

Os macrófagos de perfil M1, expressam CD80 e CD86, são geralmente envolvidos em resistência a agentes patogênicos intracelulares e a tumores no contexto das respostas conduzidas por linfócitos T auxiliares (TH1), sendo caracterizado como inflamatório, pois produz várias citocinas pró-inflamatórias como: IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, IL-1 β , e TNF- α . Além de expressarem altos níveis de CCR7, NOS2, calprotectina e CCR2 (ROSTAM et al. 2017). Essas citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos M1 ativados são componente importante da defesa do hospedeiro, mas podem causar danos extensivos ao hospedeiro. Por exemplo, IL-1, IL-6 e IL-23 foram associados ao desenvolvimento e expansão de células TH17 que doenças autoimunes (MOSSER e EDWARDS 2010).

Em contraste, o ambiente de reparo de lesões se associa com a presença de macrófagos para o estado anti-inflamatório M2 com aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, aliviando a inflamação, e promovendo reparação e remodelação de tecidos (BROWN et al. 2009). Macrófagos M2 secretam altos níveis de IL-10 e TGF- β , e expressam CD163, CD206 e IL-1RA (ROSTAM et al. 2017). Os macrófagos M2 podem ser subdivididos em M2a e M2c dependendo de suas funções e perfis de expressão gênica (GAUTIER et al. 2012). Os macrófagos M2a são células pró-fibróticas e de cicatrização de feridas, produzindo colágeno tipo VI, fibronectina e TGF- β , enquanto que os macrófagos M2c são predominantemente responsáveis pela regulação imune que está associada

à função T-reguladora (Treg) (NOVAK e KOH 2013). Podemos observar melhor as diferenças entre M1 e M2 no Quadro 1.

Quadro 1 - Comparação entre as características moleculares dos macrófagos M1(pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios).

Propriedades	M1 (IFN e lipossacarídeos)	M2 (IL-4 e IL-13)
Fatores de transcrição e mediadores de sinal	1. STAT1 2. IRF5 3. SOCS1 4. NFκβ	5. STAT6 6. IRF4 7. SOCS3 8. KLF4 9. PPARγ 10. Proto-oncogene c-Myc
Receptores de superfície e citocinas	1. IL-12, IL-23, TNF, IL-1, (HLA)-DR, CD80, CD86, CD169, TLRs 2 e 4	2. IL-10, antagonista de sinal IL-1 e IL-1R2
MicroRNA	1. miR-29, miR-33, miR-127, miR-155	2. miR-146a, miR-222, miR-223, let-7c

Fonte: Adaptado de UDALOVA et al. (2016) e TAKEYA e KOMOHARA (2016)

Entre parênteses seus principais ativadores. STAT1-Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1α. IRF5 – Fator regulatório de interferon 5. SOCS1 – Supressor da sinalização de citocina 1. NFκβ – Fator nuclear κβ. STAT6 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6. IRF4 – fator regulatório de interferon 4. SOC3 - Supressor da sinalização de citocina 3. PPARγ - Receptor ativado por proliferação de peroxisoma. miR – micro RNA. TLR – receptores Toll-like.

A resposta imune adaptativa normalmente inclui 3 etapas: reconhecimento e processamento de antígenos, a ativação de células T e B e um estágio efetor. Muitos tipos de células imunes estão envolvidos na imunidade adaptativa, incluindo células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (DCs), células T e células B.

Todos os linfócitos tem origem comum em uma célula tronco sediada na medula óssea mas se desenvolvem e executam suas funções de forma

muito variada e podem ser agrupados segundo sua ontogenia e função em linfócitos B e T, respectivamente relacionados aos órgãos onde primeiro foram descritos, B - Bursa de Fabricius, o órgão das aves correlato a medula óssea nos humanos e T – Timo, órgão onde acontece a maturação final dos linfócitos T.

Os linfócitos B agem produzindo anticorpos que são secretados e circulam pelo sangue para reconhecer os patógenos e facilitar sua destruição por fagócitos, por isto são relacionados a imunidade humoral. Defeitos no desenvolvimento, seleção e função das células B levam a autoimunidade, malignidade, imunodeficiências e alergias (PIEPER et al. 2013). Esses defeitos já haviam sido reconhecidos por Paul Ehrlich em 1897, que descreveu que a resposta imune contra auto-antígenos representa uma ameaça para o organismo, mesmo sem saber da existência dos anticorpos.

Todos os linfócitos citados nesta tese apresentam antígenos (CD) que são proteínas expressas na superfície das células imunológicas, e funcionam como receptores dessas células e caracterizando-as. As duas funções mais comumente atribuídas às várias moléculas CD são estimulação e adesão intercelulares e transdução de sinais que levam à ativação dos linfócitos (ABBAS e LICHTMAN 2005). Os linfócitos B têm como marcador principal o CD20, altamente específico e sensível (ALVES et al. 1999), que representa a maioria ou todos os linfócitos B (ABBAS e LICHTMAN 2005). Na linhagem T, a molécula proteica CD3 é um dos marcadores mais sensíveis e específicos para demonstração de diferenciação T (ALVES et al. 1999), presente em todos os linfócitos T (marcador pan-T), incluindo os linfócitos Th, T

regulatórios (Treg) e T citotóxicos. Os marcadores CD4 e CD8 são também marcadores de linfócitos T, sendo CD4 expresso em cerca de 60% das células T maduras CD3+, caracterizando os chamados linfócitos T auxiliares ou Helper, enquanto o CD8 é expresso em cerca de 30% das células T CD3+ (KUMAR et al. 2005; NEDERGAARD et al. 2007), caracterizando os linfócitos T citotóxicos. O antígeno CD4 é também expresso nos linfócitos Treg, monócitos, macrófagos e DC (NEDERGAARD et al. 2007), mas é possível distinguir os linfócitos T auxiliares das demais células CD4+. As células NK têm como marcador principal o CD 56.

Funcionalmente os linfócitos podem ser divididos conforme o tipo de resposta que participam em linfócitos adaptativos que incluem células T convencionais e células B e o grupo mais heterogêneo de linfócitos inatos que incluem células NK, células T invariantes associadas à mucosa, linfócitos intraepiteliais, células T $\gamma\delta$. A ampla diferenciação de linfócitos em subconjuntos inatos e adaptativos com base em sua função efetora tem sido muito útil para atribuir características-chave às respectivas populações de linfócitos (BEDOUI et al. 2016).

Os linfócitos T CD4+ apresentam papel auxiliar, ativando ou modulando a intensidade da resposta inflamatória por meio de subconjuntos de células T helper (LTH) que participam das repostas TH1, TH2, TH17 e TH9, bem como linfócitos T helper foliculares (LTHF) e linfócitos T regulatórios induzidos (LTreg) (JOSEFOWICZ et al. 2012), cada uma das quais serve uma função especializada e está adaptada para reagir a uma classe específica de

patógeno ou para contrabalançar a ativação excessiva do sistema imunológico (ZHU et al. 2010).

Os linfócitos T CD8⁺ apresentam função citotóxica e menor diversidade funcional, mas mais recentemente outros marcadores fenotípicos tem sido cada vez mais reconhecida e pode distinguir a eficácia das populações de células T CD8⁺ em diferentes microambientes. As células T CD8⁺ efetoras podem exibir heterogeneidade na sua capacidade de produzir citocinas individuais, tais como IFN- γ , TNF ou IL-2 ou β -quimiocinas ou coprodução de múltiplas citocinas e quimiocinas, o que se correlaciona com melhor proteção contra infecção e imunidade antitumoral aumentada (SEDER et al. 2008; YUAN et al. 2008).

Dependendo das citocinas liberadas, os linfócitos T CD4⁺ podem se diferenciar predominantemente em dois tipos: T-helper (TH) TH1 e TH2. Linfócitos T CD4⁺ tipo TH1 secretam principalmente interferon gama (IFN- γ) e IL-12, cuja função principal é estimular a defesa mediada por fagócitos contra as infecções, especialmente por microrganismos intracelulares. Já os linfócitos tipo Th2 secretam interleucina (IL4, IL-5), cujas funções principais são estimular reações imunes mediadas por mastócitos/eosinófilos e imunoglobulina E (IgE) (processos alérgicos e parasitários), além de regular para baixo as respostas de Th1 (MURPHY e REINER 2002; ABBAS e LICHTMAN 2005).

A formação da resposta imune TH1 é determinada principalmente por características do antígeno, o tipo de célula dendrítica apresentando o antígeno e pelo perfil de citocinas das células envolvidas na polarização de

linfócitos TH naíve. Os linfócitos CD4⁺ TH1 produzem IFN γ , IL-2 e linfotóxina α , que medeiam à imunidade celular (ZHU e PAUL 2008). No corpo humano, os linfócitos TH1 podem ativar monócitos e células NK secretando IFN γ e aumentar significativamente sua capacidade de eliminar os patógenos intracelulares. A resposta imune TH1 resulta na formação de um grupo das células citotóxicas CD8⁺ (Tc). Essas células reconhecem antígenos específicos na superfície da célula juntamente com o principal complexo de histocompatibilidade (MHC) classe I, e quando ativadas, secretam um conjunto de proteínas que induzem à apoptose, como perforina, granzima, linfotóxina α , IFN- γ entre outros (ZHANG et al. 2014).

Além dos linfócitos, os macrófagos de perfil M1 são células-chave para a resposta TH1 e sua principal função é sua atividade fagocítica como descrito na página 14. Um macrófago adquire o fenótipo M1 em resposta às citocinas TH1: IFN γ , TNF e de alguns componentes bacterianos (ROSTAM et al. 2017). Sendo caracterizados pela produção de fatores pró-inflamatórios como IL-6, IL-12, IL-23 e TNF. Além disso, os macrófagos M1 têm alta expressão das moléculas MHC de classe II que são necessárias para a apresentação do antígeno. Devido a isso, os macrófagos são um elo de conexão entre o sistema imune inato e adaptativo. Além disso, macrófagos ativados com fenótipo M1 podem produzir CXCL10 (Ligante de quimiocina 10 (motivo CXC)), que é um atrativo para células CD8⁺ e CD4⁺ TH1 (MARTINEZ e GORDON 2014).

A resposta TH2 é composta por linfócitos TH2, linfócitos B, macrófagos de perfil M2 e neutrófilos e fibroblastos. A diferenciação de linfócitos TH2 é

principalmente induzida por IL-4, sendo as células TH2 capazes de produzir IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Além disso, os linfócitos TH2 expressam o ligante de CD40 ligado à membrana (CD40L), que interage com o receptor CD40 (CD40R) nos linfócitos B, ativando-os, e levando à produção de anticorpos (ZHU e PAUL 2008).

No corpo humano, a diferenciação de macrófagos M2 é induzida, principalmente, por IL-4, IL10 e IL-13 e podem ser subdivididos em subtipos M2a, M2b, M2c e M2d. A diferenciação para M2 também pode ser induzida por parasitas, complexos imunes, sistema complemento, células apoptóticas, e o fator estimulante de colônia de macrófagos (MCSF) e TGF β (MARTINEZ e GORDON 2014). IL-10 secretada por macrófagos M2 e linfócitos TH2 mostrou aumentar a expressão do ligante 1 do receptor de morte celular programada (PDL1), que finalmente resulta em redução da citotoxicidade e supressão da proliferação de células CD8⁺ (KUANG et al. 2009). No Quadro 2 temos um resumo das diferentes células imunes e suas funções.

Quadro 2 - Células do sistema imune.

<i>Célula</i>	<i>Marcador</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Função</i>
LTC	CD3, CD8	-	Citólise de células infectadas
LTA	CD3, CD4, CXCR3	TH1	Resposta a patógenos intracelulares
	CD4, CCR4, Crth2	TH2	Resposta a parasitas
	CD25, FOXP3, CTLA-4	Treg	Auto tolerância
	Bcl6, IL-21,	Tfh	Auxilia o linfócito B
	IL-6, IL17, IL-23	TH17	Resposta a fungos e bactérias extracelulares
B	CD19, CD20, CD21, IgM	-	Produção de anticorpos
M	CD80	M1	Inflamação e resposta patógenos intracelulares
	CD163	M2	Angiogênese e resposta anti-inflamatória

Seus marcadores, subtipos e função. LTC - linfócito T citotóxico. LTA - linfócito T auxiliar. LTH1 – linfócito T helper de resposta 1. LTH2 – linfócito T helper de resposta 2 LTreg - linfócito T auxiliar regulador. LB - Linfócito B. M – macrófagos. M1 – macrófagos de perfil M1. M2 - macrófagos de perfil M2.

1.2.2 A Imunovigilância

Há mais de um século, a ideia de que o sistema imune pode interferir no câncer tem sido debatida. Foi Paul Enrich que citou uma possível relação entre câncer e o sistema imune, enfatizando a importância da resposta imune na eliminação do câncer (EBERL 2016).

Esse avanço forneceu a base sobre a qual BURNET (1957) construiu sua hipótese de imunovigilância do câncer, um conceito que formalmente prevê a imunidade adaptativa como responsável pela prevenção de desenvolvimento do câncer em hospedeiros imunocompetentes.

Modelos de camundongos nocaute tornaram-se comuns, permitindo aprofundar no entendimento do papel da imunidade no controle do câncer. A descoberta do interferon- γ (IFN- γ) na rejeição de células tumorais

transplantadas gerou interesse na imunossupressão causada pelo câncer (DIGHE et al. 1994). Outros experimentos com camundongos demonstraram que aqueles que não possuíam a IFN- γ eram mais suscetíveis à formação de tumores primários espontâneos e induzidos por carcinógenos (KAPLAN et al. 1998; SHANKARAN et al. 2001). Outros estudos começaram a relatar resultados semelhantes e coletivamente esses achados documentaram que o sistema imunológico pode funcionar como um supressor tumoral extrínseco (SMYTH et al. 2000; GIRARDI et al. 2001; STREET et al. 2002).

O conjunto de avanços sobre o tema nas últimas décadas levou a incorporação da relação da célula tumoral com o sistema imune na lista de características essenciais das células tumorais no artigo clássico escrito por HANAHAN e WEINBERG (2011).



Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2011)

Figura 2 - Características funcionais das células tumorais. As setas indicam aqueles diretamente relacionados com o conceito de imunovigilância.

A depender de vários fatores do tumor e do hospedeiro a imunovigilância pode resultar em 3 desfechos: eliminação, equilíbrio ou fuga, que podem inclusive serem fases sequenciais ao longo do desenvolvimento de um tumor (MOHME et al. 2017). A eliminação representa o conceito original de imunossupressão de câncer pelo qual o sistema imune detecta e elimina as células tumorais que se desenvolveram quando mecanismos de supressão de tumor intrínsecos falharam. Diz-se que a fase de eliminação está completa, quando todas as células tumorais são erradicadas com sucesso, ou incompleta, quando apenas algumas das células tumorais são eliminadas (DUNN et al. 2004; SWANN e SMYTH 2007; CAVALLO et al. 2011).

Na fase de equilíbrio, o sistema imune do hospedeiro e qualquer variante de célula tumoral que sobreviveu à fase de eliminação entram num equilíbrio dinâmico, levando a uma imunoedição, na qual as células imunitárias e as suas citocinas exercem uma potente e implacável pressão de seleção nas células tumorais, sendo o suficiente para restringir, mas não extinguir completamente células tumorais geneticamente instáveis e mutantes. Embora muitas das variantes de células tumorais originais sejam destruídas, podem surgir novas variantes com mutações diferentes que lhes proporcionam maior resistência ao ataque imunitário. As células tumorais que eventualmente resistirem ao cerco imunológico do hospedeiro na fase de equilíbrio possuem alta heterogeneidade e instabilidade genética, sendo possivelmente as principais forças que permitem sua sobrevivência. O resultado final do processo de imunoedição é uma nova população de clones

tumorais com reduzida imunogenicidade (SWANN e SMYTH 2007; CAVALLO et al. 2011).

Durante a fase de escape, o sistema imunológico não é capaz de restringir o crescimento do tumor. Esta capacidade das células cancerosas de evadir à rede protetora do sistema imunológico é considerada uma das 10 características essenciais do câncer (CAVALLO et al. 2011; BIDWELL et al. 2012).

1.2.3 O câncer de mama e o sistema imune

A relação entre o sistema imune e o câncer de mama teve o foco nos linfócitos nos seus primeiros estudos, realizados em meados de 1980 por diferentes pesquisadores (BHAN e DESMARAIS 1983; ROWE e BEVERLEY 1984; HURLIMANN e SARAGA 1985). As células dendríticas, também foram muito estudadas posteriormente, principalmente com relação aos antígenos associados aos tumores (AATs) e reforçando a ideia da importância da resposta dependente de antígeno (GABRILOVICH et al. 1997; COVENTRY et al. 2002; MCDERMOTT et al. 2002-2003). Embora o câncer de mama tenha menos antígenos novos que outros tumores, ainda é possível encontrá-los e associá-los a respostas imunes adaptativas (SCHUMACHER e SCHREIBER 2015). Novos AATs foram descobertos, como o receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), mucina 1 (MUC-1), antígeno carcinoembriônico (CEA), a transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) e o gene do tumor de Wilms (WT1), sendo todas essas proteínas normais superexpressas no câncer de mama (CRISCITIELLO 2012).

Estudos verificaram que o número de linfócitos intratumorais CD3+ da biopsia pré-tratamento eram significativamente maiores nos pacientes que tinham resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante (HORNYCHOVA et al. 2008; DENKERT et al. 2010). Estudos descobriram que linfócitos estromais e intratumorais têm valor preditivo para indicar uma melhor resposta patológica e que linfócitos estromais podem prever a resposta ao tratamento no cenário neoadjuvante (DENKERT et al. 2010; WEST et al. 2011; YAMAGUCHI et al. 2012; ISSA-NUMMER et al. 2013; DENKERT 2013).

A presença histológica dos linfócitos em meio ao tumor indica que há um reconhecimento do corpo frente ao tumor, provavelmente na intenção de erradicá-lo, porém essa resposta é ineficaz. Uma evidência de que tal falha existe é a atividade citotóxica causada por PRF1 e GZMA, citocinas provenientes de LTC, e que no CM não é maior que a atividade encontrada no tecido mamário normal (ROONEY et al. 2015). Existem várias explicações para a falha imune, entre elas a expressão de PD1 e CTLA-4 pelos tumores de mama que e suprimem a função do sistema imune (VARN et al. 2016), além da capacidade do tumor de suprimir a expressão de antígenos mais imunogênicos e do HLA que auxilia na apresentação dos antígenos (SCANLAN e JÄGER 2001; KIM et al. 2007).

O CM é infiltrado com uma grande variedade de tipos celulares do sistema imune, desses os linfócitos T são os mais estudados. A quantidade de células T presentes nos tumores varia de 1 a 45% da massa celular tumoral nos diversos tumores (LEE et al. 1985). Elas foram separadas em 3 grupos,

as células T citotóxicas (CD8+), as células T auxiliar (CD4+) e as células T regulatórias (CD4+, FOXP3+ e CD25+), mas as quantidades certas de cada grupo ainda são motivos de discórdia na literatura (BAXEVANIS et al. 1994; STEWART e HEPPNER 1997; GENTLES et al. 2015).

Os LTCs estão associados com o fenótipo basal e alto grau histológico e, mesmo associado a marcadores de pior prognóstico, está correlacionado com uma resposta patológica completa à quimioterapia neoadjuvante por vários estudos (MAHMOUD et al. 2011; LIU et al. 2012; BROWN et al. 2014; VARN et al. 2016). Estudos mostram que o LTC de memória pode ser um fator associado a uma melhor resposta do tumor a quimioterapia, logo, relacionado a um melhor prognóstico (VARN et al. 2016).

Já os LTAs podem ativar as outras células do sistema imune e estão aumentados no câncer de mama. Porém a sua polarização faz toda a diferença na resposta tumoral, pois enquanto os LTH1 promovem a resposta antitumoral pela secreção de IFN- γ , os LTH2 estão envolvidos com a imunossupressão e promoção da anergia e exaustão de células T pela secreção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (ZHU e PAUL 2008). Além dessas atividades, as células T CD4+ podem desenvolver uma propriedade de células T CD8+, potencial de células T citotóxicas mediada por granzima também é exercida por células T CD4+. No entanto, as condições que induzem a produção de granzimas pelos LTH não são inteiramente compreendidas (DONNARUMMA et al. 2016).

Os LTreg são responsáveis pela imunossupressão, contribuindo para o escape tumoral estando presentes em maior número no tumor que no tecido

normal. Aumento do número de Tregs foi correlacionado com menor tempo de recorrência e SCE, além de estar associado a fatores prognósticos negativos, como baixo grau de diferenciação tumoral, envolvimento linfonodal e negatividade de estrógeno (BATES et al. 2006).

Até hoje, as pesquisas que correlacionam o sistema imune, diagnóstico, prognóstico e sobrevivência de câncer de mama têm sido limitadas a respostas mediadas pelas respostas de células T. Em sua definição do escore imune, FRIDMAN et al. (2011) raramente mencionam células B ou células plasmáticas. No entanto existem provas consideráveis da presença destas células em tumores, especialmente no câncer da mama (CORONELLA et al. 2002). Mais recentemente, dois estudos independentes forneceram informações úteis sobre o papel prognóstico das células B no câncer. SCHMIDT et al. (2008, 2012) relataram dados convincentes que validam a assinatura de células B como o fator prognóstico mais robusto no câncer de mama e em outros tumores humanos.

Os macrófagos compõem a maior parte das células inflamatórias nos tumores de mama e contribuem com aumento dos níveis de fatores de crescimento, hormônios e citocinas (REED e SCHWERTFEGGER 2010; COUSSENS e POLLARD 2011; HODSON et al. 2013). O aumento do número de macrófagos associados aos tumores (MAT) é observado no tecido da mama (MUKHTAR et al. 2012; BHATELIA et al. 2014), contribuindo para o escape de células tumorais do sistema imunológico residente (DENARDO e COUSSENS 2007). O aumento da densidade de macrófagos em biópsias pré-tratamento de pacientes com câncer de mama correlaciona-se com uma

redução da sobrevida livre de recorrência e sobrevida global (LEEK et al. 1996; BINGLE et al. 2002; MAHMOUD et al. 2012). Portanto, os esforços se concentraram na compreensão dos mecanismos pelos quais os macrófagos contribuem para o crescimento e progressão do câncer de mama e esses tópicos foram revisados extensamente (BALKWILL et al. 2005; CONDEELIS e POLLAND 2006; QIAN e POLLARD 2010; SICA e MANTOVANI 2012). Em estudos recentes utilizando técnicas de imagem intravital, LOHELA et al. (2014) demonstraram que a depleção prolongada de células supressoras derivadas mieloides em um modelo de câncer de mama resultou em crescimento tardio do tumor, diminuição da angiogênese e menos metástases pulmonares. Além disso, a produção de fatores de crescimento e remodelação do câncer de mama por MATs têm sido implicados na promoção da resistência do câncer a agentes quimioterapêuticos, tais como Paclitaxel, Doxorubicina e Etoposide (RUFFELL e COUSSENS 2015). Finalmente, numerosos estudos têm proporcionado evidências de MATs interagindo com células do sistema imune adaptativo, principalmente linfócitos T CD4+ e CD8+, suprimindo direta e indiretamente seus efeitos antitumorais (DENARDO et al. 2009; DOEDENS et al. 2010; RUFFELL et al. 2014).

Como podemos observar no Quadro 3, mesmo com tantos estudos relacionando o sistema imune e o câncer de mama, não é possível encontrar na literatura um consenso de qual é o melhor método de avaliação do infiltrado inflamatório, quais células a serem analisadas, o cut-off ideal delas e se todos ou apenas um subtipo específico de câncer de mama têm essas células correlacionadas com valores prognósticos e predição de desfecho. Ainda há

muito a ser explorado no câncer de mama como quais as células inflamatórias presentes que apresentam eficiência na eliminação do câncer, qual a relação com cada subtipo e em quais casos a imunoterapia induz uma melhor resposta (MACCALLI et al. 2017).

Quadro 3 - Lista de alguns trabalhos de contagem do infiltrado inflamatório mostrando diferentes métodos de avaliação.

Autor	Subtipo avaliado	Número de casos	Método	Células avaliadas	Cut off usado
Adams et al. 2014	TN	481	HE	E	0; 10; 20-40; 50-80%
Ali et al. 2014 *	Todos	12439	TMA, IHQ	E e intratumoral (I); CD8 e FOXP3	
Baker et al. 2011	Todos	1953	IHQ	E e I; CD8	0
Buisseret et al. 2016	Todos	125	Citometria e IHQ	E, CD4, CD8 e CD19	<84; 85-275; > 276 TIL/mg IHQ – Mediana
Denkert et al. 2010	Todos	-	IHQ e PCR	E e I; CD3; CD20	0; 1-10%; 11 – 30%; 31-60%; 61-100%
Denkert et al. 2016	Todos	120	HE		60%
Eiró et al. 2012	Todos	102	IHQ	E; CD3, CD20 e CD68	Média de 5 áreas. Classificados pela mediana.
Hornychova et al. 2008	Todos	73	HE biopsia	E; CD3, CD68	Média
Lee et al. 2013	Todos	175	He e IHQ	E; CD4, CD8 e FOXP3	0; <10%; > 10 e < 1/3; > 1/3
Liu et al. 2012	Todos	3992	TMA, IHQ	E; CD8	0
Loi et al. 2013	Todos	2009	HE	Estroma (E)	10%
Loi et al. 2014	Todos	934	HE	E	Presença/ausência
Mahmoud et al. 2011	Todos	1334	TMA, IHQ	E e I; CD8	2 células
Mani et al. 2016	Todos	93	IF	E; CD3, CD8 e CD20	Média
Murri et al. 2008	Todos	168	IHQ	E; CD4, CD8 e CD68	Volume do infiltrado/área total.
Nabholtz et al. 2014	TN	47	HE e IHQ	E; CD8	Continua
Oda et al. 2012				E; CD8, FOXP3 e IL-17F	Média de 5 áreas
Safonov et al. 2017	Todos	817	RNA-Seq	E	FDR
Salgado et al. 2015	Todos	1058	HE	E	Porcentagem
Schalper et al. 2014	Todos	636	IF de RNA	PD-1	0; <30%; > 30 e < 60%; > 60%
Schmidt et al. 2012		845	IHQ e Expressão	IGCK	Brier Score
West et al. 2011	Todos	255	TMA, IHQ	E; CD3, CD8, CD4, CD20, TIA-1.	10%

Podemos observar células avaliadas, cut-off empregado, local de avaliação e anticorpos usados. HE = Hematoxilina Eosina. E = estroma. I = intratumoral. TMA = tissue microarray. IHQ = imuno-histoquímica. PCR = reação em cadeia da polimerase. Estudos com “*” são estudos de metanálise.

1.3 JUSTIFICATIVA

Com esse trabalho, buscamos melhor caracterizar o infiltrado inflamatório no carcinoma mamário e achar uma forma de avaliar essas células que possa ser aplicável na rotina diagnóstica. Como mostrado acima, a interface entre o câncer de mama e os sistemas imune inato e adaptativo começou a ser caracterizado, porém muito ainda precisa ser estudado, já que na literatura não há consenso sobre a melhor forma de avaliação do sistema imune e de qual ou quais células contribuem substancialmente para a “assinatura imunitária” tumoral. Ainda não foi houve um trabalho que avaliasse tantos subtipos de linfócitos e macrófagos com diferentes marcadores em uma casuística grande e representativa da descrita na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o infiltrado inflamatório imunofenotipicamente, através de expressão gênica e proteica, e associá-lo a fatores prognósticos e preditivos clássicos nos diferentes subtipos moleculares do carcinoma mamário

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar as características morfológicas e de marcações das células presentes no infiltrado inflamatório tumoral.
2. Caracterizar o microambiente inflamatório em cada subtipo molecular do câncer de mama.
3. Testar a associação dos elementos do infiltrado inflamatório com os fatores prognósticos clássicos, SLD e SCE.

3 METODOLOGIA

O estudo realizado foi do tipo retrospectivo com duas abordagens, expressão gênica e imuno-histoquímica, e duas populações diferentes de pacientes com câncer de mama. E foi aprovado pelo comitê de ética sob o número 2024/15 (Anexo 1).

O estudo da expressão gênica foi realizado previamente pela Dra. Mabel Pinilla-Fernández, sob orientação da Dra. Dirce Carraro, por ocasião da sua tese de Doutorado na Fundação Antônio Prudente que avaliou o perfil genético e sua relação com o acometimento linfonodal no câncer de mama. Obtivemos os dados brutos resultantes do seu experimento, que utilizou RNA extraído de amostras microdissecadas, para a reanálise focada no componente inflamatório destes tumores.

O estudo imuno-histoquímico foi realizado nas lâminas originadas da coleção de Tissue Microarrays (TMAs) construídos entre 2007 e 2016 no Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center para diferentes finalidades. O total de casos avaliáveis entre os TMAs foi de 663 casos. Os dados clínicos de seguimento foram atualizados até dezembro de 2016.

3.1 EXPRESSÃO GÊNICA

Na expressão gênica executamos a reanálise dos dados da tese da Dra. Mabel Pinilla-Fernández para avaliar a importância do infiltrado inflamatório no câncer de mama. A técnica de microdissecção não permite separar os linfócitos intraepiteliais e o resultado do nosso estudo se refere mais aos linfócitos intraepiteliais. Como DENKERT et al. (2010) descreveu que não há diferença entre a avaliação de linfócitos estromais ou intraepiteliais, a realização da microdissecção a laser realizada para a análise da Dra. Pinilla-Fernandez, é uma interferência que não deve causar um impacto significativo na interpretação.

3.1.1 Casuística

Para as análises da expressão gênica a Dra. Pinilla-Fernández escolheu 101 casos de carcinoma ductal invasivo de mama coletados entre 2002 e 2010 provenientes do biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido no momento da coleta.

As amostras foram divididas, baseadas na expressão IHQ dos receptores hormonais ER e PR, do HER2 e Ki-67, e foram considerados, quando existiam, os dados de FISH relacionado ao gene HER2. Os grupos foram então denominados como (PEROU et al. 2000; HAMMOND et al. 2010):

1. Luminal A: Positivo para RE ($\geq 1\%$) e RP ($\geq 20\%$), Negativo para HER2, Ki-67 ($< 15\%$).

2. Luminal B: Positivo para RE ($\geq 1\%$) e HER2 positivo.
3. Luminal B': Positivo para RE ($\geq 1\%$), HER2 negativo com RP e Ki-67 ($\geq 15\%$).
4. HER2: Negativo para RE e RP, positivo para HER2, qualquer Ki-67 (usualmente $>15\%$)
5. TN: Negativo para RE, RP e HER2, qualquer Ki-67 (usualmente $>15\%$).

A metodologia usada pela Dra. Pinilla-Fernández será descrita resumidamente (PINILLA-FERNÁNDEZ 2015). A Dra. Pinilla-Fernández selecionou áreas de tecido normal e tumoral, as excluiu por micro-dissecção a laser a área estromal. Depois extraiu os RNAs das amostras, converteu-os em cDNA e os amplificou-os.

As amostras tumoral e normal foram marcadas com cianinas fluorescentes diferentes então misturadas e hibridadas em uma mesma lâmina para realização do “microarray” competitivo. Nessa hibridação as amostras “competem” pelas sondas. Uma vez excitadas as cianinas emitem um sinal proporcional ao número de moléculas hibridadas, que é captado pelo “scanner”. Caso não exista nenhum material que se hibrida com a sonda, não há emissão de cor, caso haja a mesma quantidade de cDNAs provenientes de cada uma das amostras, a cor emitida é amarela. Se houver mais da amostra normal, a cor que se sobressai é a verde e se ocorrer de ter mais da amostra tumoral, a cor mais destacada é a vermelha. Logo, os valores de fluorescência obtidos revelam níveis relativos de expressão de cada transcrito na amostra comparada com a amostra referência. No total, havia 244mil sondas, compreendendo regiões intrônicas e exônicas tanto da fita molde de

DNA, quanto da fita oposta. No Anexo 4 encontram-se os detalhes da metodologia. A Figura 4 mostra os principais passos da metodologia.

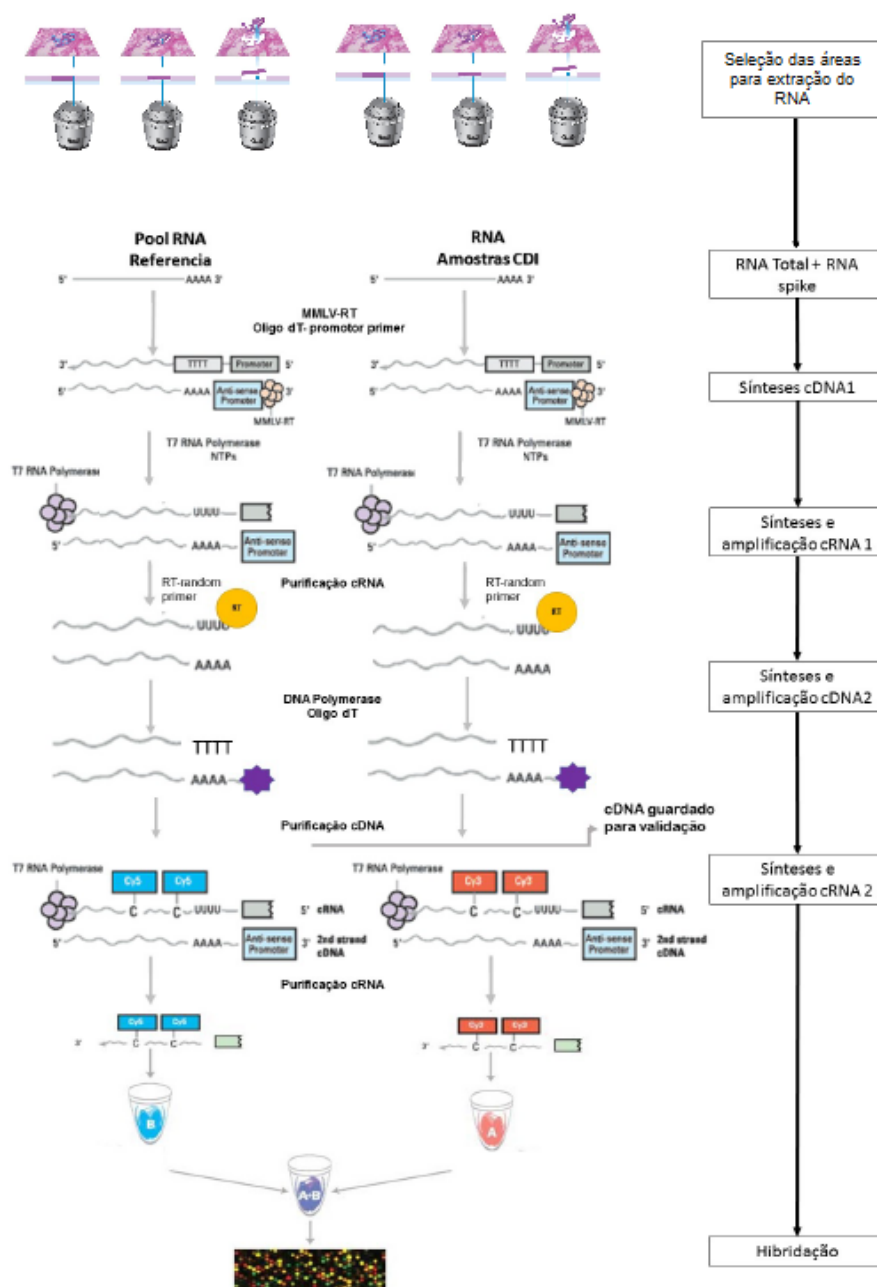


Figura 3 - Descrição dos passos da metodologia de análise de perfis diferenciais de RNA por microarrays usada pela Dra. Pinilla-Fernández, desde isolamento da amostra até a hibridação. Primeiramente houve a seleção das áreas tumoral e normal para microdissecção a laser. Ambos os RNAs foram marcados, e convertidos em cDNA. Ambos os cDNAs foram amplificados e convertidos em cRNA. O cRNA tumoral foi marcado com Cy3 e o cRNA normal foi marcado com Cy5. Depois ambos foram colocados na lâmina de hibridação e competiram pelas sondas

3.1.2 Escolha dos genes para análise

Para avaliarmos o infiltrado inflamatório através da expressão gênica no câncer de mama, escolhemos os genes relacionados a antígenos de superfície linfocitários ou dos macrófagos, fatores de transcrição específicos das linhagens ou estágios maturativos ou ainda produtos da secreção destas células baseando-nos na literatura, (ZHU e PAUL 2008; FU et al. 2008; BINDEA et al. 2013; CHARBONNEAU et al. 2014; CORLISS et al. 2016), conforme lista abaixo:

1. Comum às linhagens de macrófagos e linfócitos: CD48 e TMEM173
2. Células NK: CXCL9, iNOS, IRF1, IRF4, PIN1, PRF1, SIGIRR, TLR1, TLR2 e TLR4
3. Macrófagos: CD68, CD86, CD163, CD206, IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-R1 I, IL-R1 II e TGF- β
4. LB: CD19, CD20, CXCL13 e IL-6
5. LTA: CCL1, LCK, CD4 e CD28
6. LTreg: CCL20, CD4, CD274 e SNCA
7. LTC: CCL1, CCL5, CCL15, CCL18, CD8a, GZMA, GZMB, LCK

A descrição de função de todos esses genes encontra-se no Anexo 6.

A partir da lista dos genes selecionados para a análise citados acima, identificamos suas sondas correspondentes na plataforma Array e a partir dos dados estabelecidos, geramos uma tabela com as respectivas informações. Os genes selecionados em nossa lista que não estavam disponíveis na plataforma, como o CTLA-4, FOXP3 e TNF- α foram excluídos da análise.

Os dados de expressão gênica foram analisados usando o programa Multi Experiment Viewer (MeV) e apresentados como “heatmap” (<http://mev.tm4.org/>).

O MeV é um software com licença gratuita desenvolvido especialmente para realizar diversas análises de dados genômicos de larga escala. Possui diversos algoritmos desenvolvidos para análises estatísticas, visualização e exploração de dados de microarray, descoberta de padrões biológicos e agrupamento de dados (MeV - TM4).

Para a análise estatística utilizamos a distância euclidiana. Todos os agrupamentos foram testados por cem “bootstraps” para verificar a força do agrupamento gerado. Consideramos os valores de p e de FDR significativos quando esses foram menores que 0,05.

3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.2.1 Casuística

Foram usados oito TMAs previamente construídos sob estratégias variadas do Departamento de Patologia do AC Camargo Cancer Center. Todos os TMAs foram construídos com 2 amostras de 1mm em cada tumor, selecionadas para representar a heterogeneidade tumoral, e continham áreas de tumor e estroma de permeio, mas na construção original do TMA não houve a intenção de representar áreas enriquecidas para o infiltrado inflamatório. Obtivemos 663 casos de carcinoma mamário diagnosticados entre 2000 e 2012 e com seguimento variando de 4 a 220 meses. (Mediana:

75 meses). Foram excluídos os casos em que o material biológico não se encontrava disponível para a pesquisa ou que o prontuário não foi devidamente preenchido. Desses temos TMAs temos:

1. Um TMA de carcinoma mamário invasivo dos subtipos Luminais A e B (TMA31 com 119 amostras).
2. Um TMA de carcinoma mamário invasivo do subtipo Triplo-Negativo (TMA41 com 75 amostras).
3. Quatro TMAs de carcinoma mamário invasivo de todos os subtipos (TMA42 com 159 amostras; TMA43 com 138 amostras; TMA45 com 143 amostras; TMA46 com 125 amostras).
4. Um TMA de carcinoma mamário Invasivo do tipo Lobular (TMA49 com 105 amostras)
5. Um TMA de carcinoma mamário invasivo HER2 positivos, incluindo casos dos subtipos HER2 e Luminais B (TMA HER2 com casos).

Somando os casos de todos os TMAs, teríamos 767 amostras, porém algumas se encontravam repetidas em diferentes TMAs e algumas amostras foram perdidas durante a reação imuno-histoquímica. Deixando-nos com 633 amostras avaliáveis. Aas lâminas passaram por um banho de parafina e foram armazenadas à - 20°C até o momento da realização da imuno-histoquímica (IHQ). A Figura 5 mostra como ficam as lâminas após as reações.

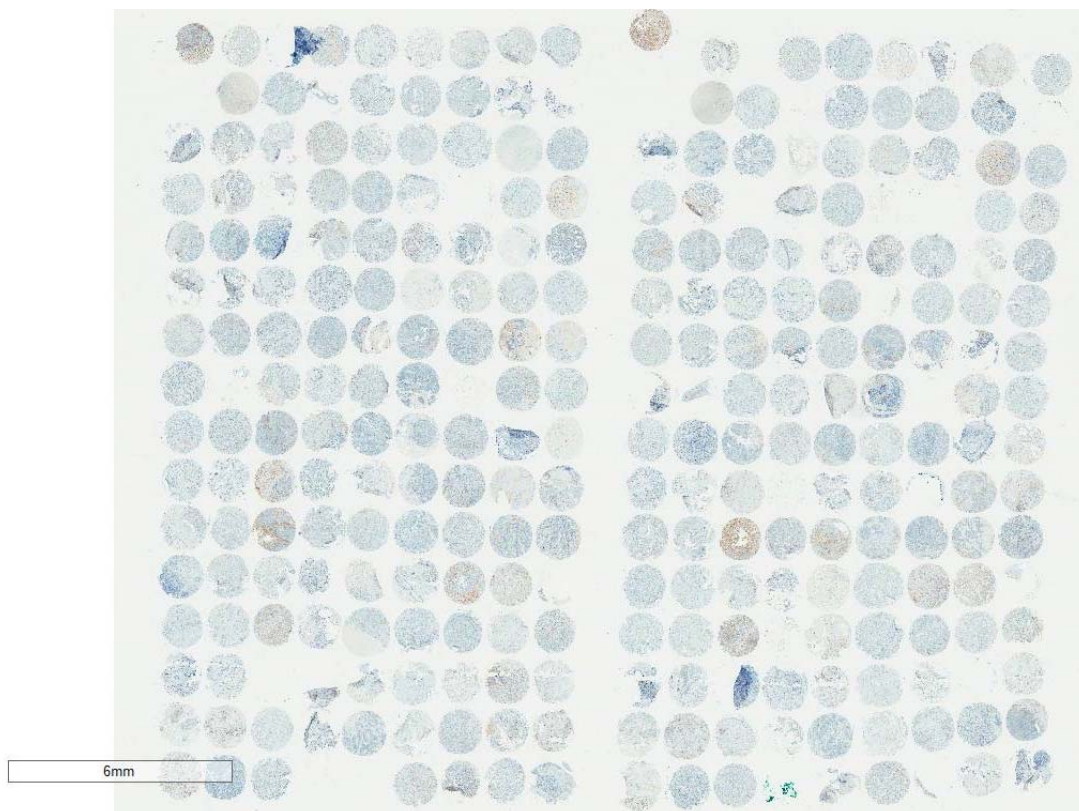


Figura 4 - Visão panorâmica de uma lâmina de Tissue Microarray corada por imuno-histoquímica. As posições de cada amostra nos eixos X e Y se relacionam com os dados clínicos em uma planilha de dados. Notem a ausência de alguns tumores por perda no momento do corte histológico ou desgaste da amostra no bloco do TMA. (TMA 49; PAX5)

3.2.2 Imuno-Histoquímica

A coloração IHQ foi realizada automaticamente com o equipamento Ventana Benchmark® ULTRA (MAYR et al. 2009). As lâminas foram identificadas com as etiquetas de códigos de barras e desparafinadas em solução de EZ PREP. A recuperação antigênica foi realizada por calor em solução CC1 com pH alto, a 96°C, em tempo previamente padronizado para cada anticorpo, como mostrado no Quadro 4. O bloqueio da peroxidase endógena por 5 minutos utilizou o reagente de bloqueio de peroxidase (UltraView Universal DAB Inhibitor (3% H₂O₂)). As lâminas foram então lavadas

em solução de lavagem (Wash buffer) e o anticorpo primário foi incubado, conforme o tempo padronizado descrito no Quadro 4. As lâminas foram novamente lavadas e incubadas com polímero HRP (HRP Multimer), com subsequentes lavagens em tampão. Então, procedeu-se a incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB), passagem em tampão de lavagem e, posteriormente, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris. Por fim, as lâminas foram lavadas, passadas em água com detergente para retirada do LCS, seguida de lavagem em água corrente e destilada, passadas em xilol, álcool e montadas.

Quadro 4 - Características técnicas dos protocolos das reações de coloração imuno-histoquímica. Com a marca e clone do anticorpo, tempo da recuperação antigênica, diluição do anticorpo, tempo de exposição ao anticorpo, o local da marcação e o kit usado para a reação de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Marca	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Tempo de exposição	Marcação	Kit usado
CD3	Ventana	2GV6	20'	Pronto	32'	Membranar	UltraView Universal DAB Kit
CD4	Ventana	SP35	36'	Pronto	32'	Membranar	UltraView Universal DAB Kit
CD8	Ventana	SP57	36'	Pronto	32'	Membranar	UltraView Universal DAB Kit
CD68	Ventana	KP1	36'	Pronto	32'	Citoplasmática	UltraView Universal DAB Kit
CD163	Ventana	MRQ-26	36'	Pronto	32'	Citoplasmática	UltraView Universal DAB Kit
FOXP3	Abcam	236A/ E7	36'	1:250	32'	Nuclear	UltraView Universal DAB Kit
PAX-5	Ventana	SP34	64'	Pronto	32'	Nuclear	UltraView Universal DAB Kit

3.2.3 Quantificação da reação de Imuno-Histoquímica

Para avaliar a marcação dos anticorpos, a célula considerada positiva foi avaliada quanto a forma e sublocalização celular esperada: quando houve marcação membranar nos casos dos imunomarcadores CD3, CD4, CD8; citoplasmática em CD68 e CD163; e marcação nuclear nos imunomarcadores FOXP3 e PAX5.

Contamos o número de células imunomarcadas em três campos de grande aumento (400x) conforme protocolo de SEO et al. 2013. A média das três áreas foi o valor final usado para as análises estatísticas.

3.2.4 Análise Estatística

As características do paciente foram expressas como frequências absolutas e relativas para variáveis qualitativas e média, mediana, desvio padrão para variáveis quantitativas. Para a determinação de dois grupos a serem comparados com relação a um ponto de corte simples foi usada a estimativa do ponto máximo da estatística log-rank padronizada, proposta por LAUSEN e SCHUMACHER (1992) com o programa R versão 3.3.0. Consideramos a estatística de log-rank maximizada selecionada para pontos de corte entre 5 % e 95% de quantificação de medida contínua (delta T). Na Figura 6 podemos notar os gráficos que a metodologia de maximização do ponto de corte, comparando todos os valores possíveis de separação (eixo X) e a diferença entre os grupos gerados (eixo Y).

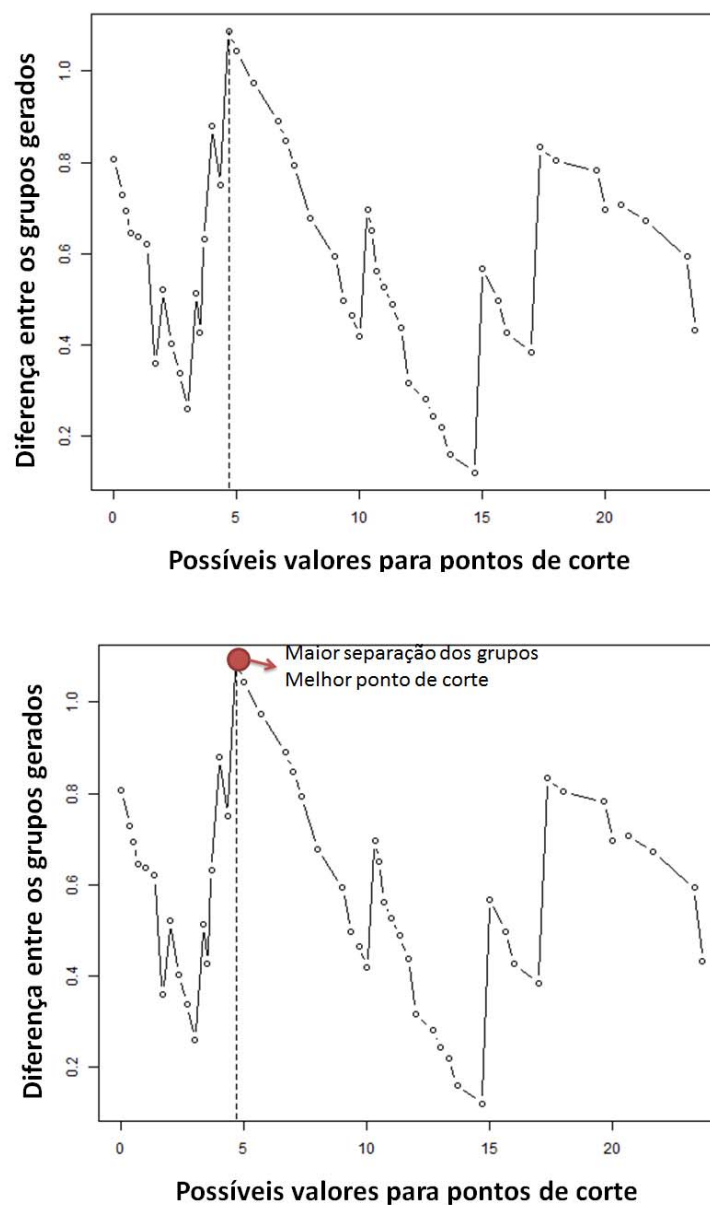


Figura 5 - Exemplo dos gráficos obtidos pela metodologia de estimativa de maximização do ponto de corte pelo teste estatístico log-rank. (CD3: ponto de corte = 4,667, correlacionado a óbito).

Foi usado o estimador de Kaplan-Meier da função de sobrevivência, tanto para a SLD a SCE, para análise de sobrevivência. A análise de SCE revela a porcentagem de pacientes no estudo que não morre devido ao câncer de mama em um determinado período de tempo. As pacientes que morreram de causas não relacionadas ao câncer, não afetam as probabilidades de sobrevivência. Já a SLD analisa o período de tempo após o tratamento do câncer de mama, durante o qual a paciente sobrevive sem sinais da doença, para essa análise excluímos os casos de estadiamento IV. O teste log-rank foi aplicado para comparar a distribuição de sobrevivência entre os grupos criados acima. O modelo de Cox semi-paramétrico de riscos proporcionais (COX 1972) foi utilizado para descrever a relação entre os tempos de sobrevivência e recidiva e a covariável definida em relação a um ponto de corte. No modelo de Cox multivariado utilizamos as variáveis prognósticas clássicas: estadiamento clínico, grau histológico do tumor (SBR), acometimento linfonodal e subtipos moleculares. Avaliamos a hipótese proporcional dos chamados resíduos de SCHOENFELD (1982) e GRAMBSCH e THERNEAU (1994). Em todos os casos, temos evidências de que as covariáveis têm um efeito constante ao longo do tempo.

Para comparação entre os grupos Luminais e Não-Luminais; e HER2 Positivos e HER2 Negativos; foi usado o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade das amostras e o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos. Para avaliar os marcadores nos diferentes subtipos, usamos o teste de Kruskal-Wallis.

Para todos os casos adotamos um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 A EXPRESSÃO GÊNICA

4.1.1 Casuística

Para esta metodologia de avaliação de expressão de genes relacionados ao sistema imune utilizamos dados previamente obtidos na tese da Dra. Pinilla-Fernández. Excluimos de cada análise os casos onde as informações mínimas sobre dados clínicos do diagnóstico, tratamento ou seguimento estavam ausentes. O trabalho da Dra. Pinilla-Fernández incluiu 101 pacientes cujas características clínicas e patológicas disponíveis estão descritas a seguir na Tabela 1:

Tabela 1 - Características clínico-patológicas das amostras da Dra. Pinilla-Fernández.

	Categoria	N	Sobrevida em 120 meses (%)	Valor p
Estadiamento clínico	I	26	100	>0,001
	II	38	87	
	III	24	85	
	IV	1	-	
Acometimento Linfonodal	Sim	42	97	0,099
	Não	44	84	
Grau nuclear	1	10	99	0,622
	2	35	92	
	3	49	89	
Grau Histológico	1	11	100	0,852
	2	37	90	
	3	46	88	
Subtipo	Luminal A	21	100	0,057
	Luminal B	38	100	
	HER2	12	90	
	Triplo Negativo	12	88	
	Basal	13	67	
Invasão Vascular	Sim	5	53	0,001
	Não	89	92	
Invasão Perineural	Sim	13	91	0,989
	Não	81	85	
Invasão Linfática	Sim	27	76	0,008
	Não	67	96	
Inflamação	Ausente/Discreta	56	88	0,901
	Moderada/Extensa	39	92	
Recidiva	Sim	18		
	Não	80		
Óbito	Sim	7		
	Não	89		

Em negrito encontramos as características mais presentes nas pacientes e os valores de p estatisticamente significativos. Aqueles cujo teste de sobrevida não foi válido devido ao número insuficiente de eventos foram colocadas como "-".

4.1.2 A Análise da Expressão Gênica

Os ensaios de microarray foram analisados com auxílio do software Gene Spring GX 12,1 (Agilent Technologies), seguindo as recomendações do programa. Foi realizada uma abordagem de análise dos componentes principais, que evidenciou que as amostras apresentavam um padrão uniforme e controles positivo e negativos válidos.

Após a aplicação do filtro que retirou todos os ruídos de fundo que poderiam corresponder a falsos valores, encontramos com resultados avaliáveis 40 dos 45 genes escolhidos para o estudo. Encontravam-se na lâmina quantidades diferentes de sondas para cada um dos genes relacionados, totalizando 74 sondas disponíveis para a análise do sistema imune nos carcinomas mamários. Esses foram então, submetidos ao agrupamento hierárquico seguindo a recomendação de GATZA et al. (2010) (distância euclidiana) e foi gerado o “heatmap” da Figura 6.

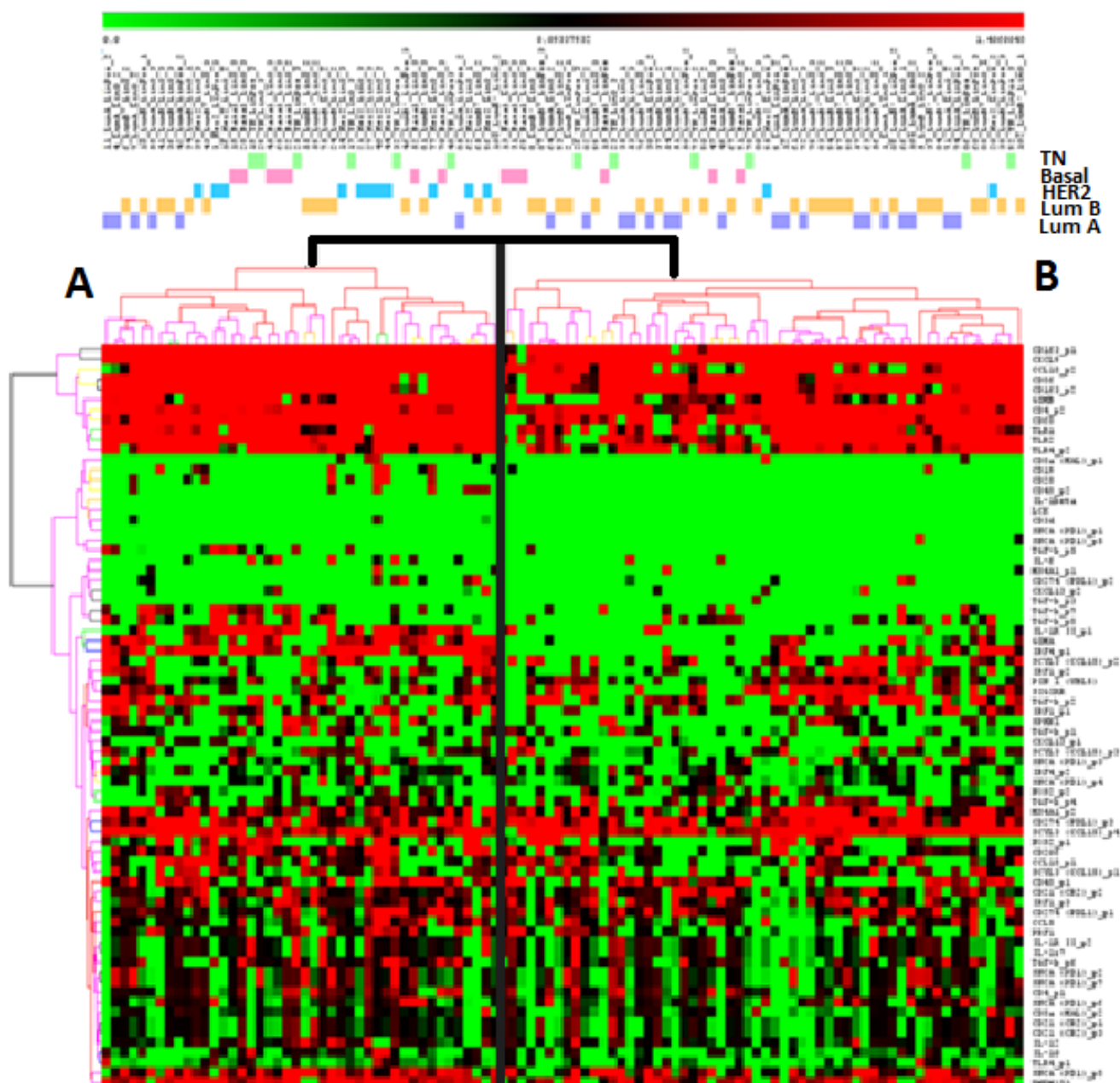


Figura 6 - Resultado gráfico (Heatmap) da análise de agrupamento hierárquico dos genes relacionados ao infiltrado inflamatório nas amostras de carcinoma mamário, revelando dois grupos com perfil de expressão diferentes. No dendograma as cores representam a força dessas separações. A cor preta demonstra um suporte de 100% das vezes testadas, indicando que esses “clusters” A e B formados são fortes. Já as outras cores variam de 0 a 50% de suporte. Temos a marcação por cores dos subtipos acima do dendograma. Em vermelho estão os genes superexpressos e em verde os genes menos expressos em relação a amostra normal.

No “heatmap” é possível notar a formação de dois grandes grupos na primeira separação hierárquica, demarcada pela cor preta da chave. Os grupos de amostras formados estão descritos na Tabela 2. Os grupos criados estiveram associados estatisticamente com a intensidade do infiltrado inflamatório observado histologicamente, com o grau histológico tumoral e com o subtipo molecular.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas das amostras que foram clusterizadas formando os grupos da Figura 6.

	Categoria	N	Grupo A	Grupo B	Valor p
Estadiamento clínico	I	26	11	15	0,526
	II	38	15	23	
	III	24	14	10	
	IV	1	-	1	
Acometimento Linfonodal	Indeterminado	12	-	-	0,296
	Sim	42	21	21	
	Não	44	19	25	
	Indeterminado	15	-	-	
Grau nuclear	1	10	1	9	0,331
	2	32	12	20	
	3	49	18	21	
	Indeterminado	7	-	-	
Grau Histológico	1	11	4	7	0,043
	2	37	12	25	
	3	46	28	18	
	Indeterminado	7	-	-	
Subtipo	Luminal A	24	11	13	0,022
	Luminal B	40	14	26	
	HER2	12	10	2	
	Triplo Negativo	12	8	4	
	Basal	13	7	6	
	Sim	6	2	4	
Invasão Vascular	Não	89	44	45	0,924
	Indeterminado	6	-	-	
	Sim	13	5	8	
Invasão Perineural	Não	81	40	41	0,789
	Indeterminado	7	-	-	

Cont/Tabela 2

	Categoria	N	Grupo A	Grupo B	Valor p
Invasão Linfática	Sim	27	16	12	0,548
	Não	67	30	37	
	Indeterminado	6	-	-	
Inflamação	Ausente/Discreta	56	16	40	<0,001
	Moderada/Extensa	39	30	9	
	Indeterminado	7	-	-	
Recidiva	Sim	18	8	10	0,665
	Não	80	32	39	
	Indeterminado	3	-	-	
Óbito	Sim	7	3	4	0,852
	Não	89	41	48	
	Indeterminado	7	-	-	

Em negrito encontram-se as categorias mais enriquecidas nos grupos e os valores de p estatisticamente significativos. O Grupo A está à esquerda na Figura 6 e o grupo B à direita na Figura 6. Aqueles cujo teste estatístico não foi válido devido ao número insuficiente foram colocadas como “-”.

O grupo A possui 43 das 101 amostras e, proporcionalmente está enriquecido de casos TN (8 casos de 12 no total) e HER2 positivos (10 casos de 12 no total), além de um grau histológico mais agressivo e com maior intensidade no infiltrado inflamatório observado histologicamente. Já no subgrupo B, ressalta-se a presença da maioria dos casos luminais (39 casos de 64 no total), grau histológico 2 e infiltrado inflamatório de menor intensidade.

Ao realizarmos as análises de sobrevida entre os dois grupos não observamos diferença estatisticamente significativa entre eles, embora as curvas de sobrevida câncer específica se mantenham separadas ao longo de todo o seguimento. Como podemos observar, nesta casuística observada o óbito por câncer foi um evento raro e o grupo com pior sobrevida ainda manteve taxas acima de 90% de sobrevida após 120 meses de seguimento.

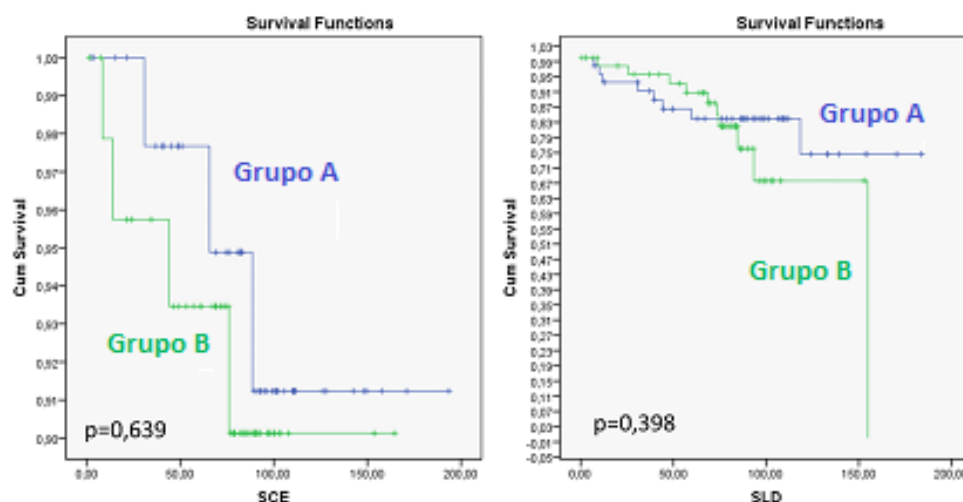


Figura 7 - Curvas de SCE e SLD dos grupamentos da “clusterização usando o método de Kaplan-Meier. Na figura a esquerda temos a curva de SCE. Na figura a direita temos a curva de SLD. Em ambas o grupo A da figura 9 está na cor azul e o grupo B de verde.

Os genes mais relevantes para determinação dos grupos estão demonstrados no Quadro 5 e marcados na Figura 8. No Apêndice 1 encontra-se o Quadro completo dos genes e sondas, médias entre os grupos, valores de FDR e valores de p.

Quadro 5 - Lista de sondas de RNAm mais relevantes para a determinação dos grupos moleculares definidos pela expressão dos genes relacionados ao infiltrado inflamatório nas amostras de câncer de mama.

Gene sonda	Média grupo A	Média grupo B	Fold Change	Valor de p	FDR
IRF4_p1	2,0233445	-0,7859047	-2,8092492	5,98E-11	4,43E-09
CXCL9	8,442738	5,7463036	-2,6964344	1,75E-09	3,23E-08
IL-1R II_p1	0,87509483	-1,6579199	-2,5330147	3,47E-10	1,28E-08
GZMB	3,542044	1,0449185	-2,4971255	1,35E-09	3,34E-08
GZMA	0,93094534	-1,2816103	-2,2125556	4,81E-08	7,12E-07
CCL18_p1	4,888577	2,7282608	-2,1603162	7,08E-06	4,36E-05
CD163_p1	6,7603984	4,8743625	-1,8860359	8,38E-08	7,76E-07
CD28	-1,4550672	-3,3353095	-1,8802423	8,03E-08	8,49E-07
CD48_p2	-1,2918128	-3,0890331	-1,7972203	5,82E-08	7,18E-07
CD19	-1,5926906	-3,186549	-1,5938584	2,03E-06	1,50E-05
CD163_p2	4,249242	2,8908625	-1,3583795	5,97E-04	0,0022086
TLR2	3,0121515	1,6631612	-1,3489903	2,40E-07	1,98E-06
CD8a (MAL)_p1	-2,5644324	-3,8851871	-1,3207547	8,43E-04	0,0028362
CD86	4,355176	3,039822	-1,315354	3,87E-04	0,0015087
IL-1 beta	-3,097316	-4,322413	-1,225097	9,96E-05	5,26E-04
CD68	2,9941328	1,8046992	-1,1894336	2,38E-06	1,60E-05
TLR1	2,5524895	1,3772388	-1,1752507	2,25E-04	0,0011115
TLR4_p2	2,4274368	1,2618816	-1,1655552	6,71E-05	3,82E-04
TGF-b_p7	-0,54976726	-1,6520457	-1,1022784	0,0037705	0,0111608
CD3d	-2,8578699	-3,8426168	-0,9847469	3,77E-04	0,0015502
LCK	-3,799933	-4,777452	-0,977519	7,83E-04	0,0027590
IL-6	-1,2920308	-2,2669363	-0,9749055	2,38E-04	0,0011001
TGF-b_p5	-1,3685428	-2,3319235	-0,9633807	0,0032141	0,0099101
CD4_p2	2,6893573	2,0170143	-0,672343	0,0045237	0,0128753
TMEM173	1,3759522	0,70916986	-0,6667823	2,54E-04	0,0011072

Estão demonstrados os valores médios de expressão em cada grupo, o fold change, e os valores de p da diferença observada e False Discovery Rate.

Pelo “fold change” e valor de p mostrados no Quadro 5, podemos notar que os genes que estão diferencialmente expressos nos dois grupos são relacionados com as linhagens:

1. Reposta imune inata: TLR1, TLR2, TLR4 e Tmem173
2. Linhagem linfocitária T: CCL18, CD3d, CD4, CD8, CXCL9, GZMA, GZMB, IRF-4 e LCK.
3. Linhagem linfocitária B: CD19 e CD48
4. Linhagem linfocitária regulatória: CD28 e IL-6
5. Linhagem mieloide: IL-1 β , IL-1RII, CD68, CD86, CD163 e TGF- β .

Notamos, também, que todos estão menos expressos no segundo grupo, que é o enriquecido de luminais.

4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

4.2.1 Casuística

Usamos neste estudo um total de 8 TMAs contendo 925 amostras, dessas 158 encontravam-se repetidas, e houveram perdas por motivos diversos (27 amostras não tinham a interface estroma tumor, 41 encontravam repetidas em diferentes TMAs e 36 casos estavam com dados clínicos incompletos, como podemos observar no fluxograma da Figura 9). No final, os oito TMAs totalizaram 663 amostras de pacientes, descritas na Tabela 3.

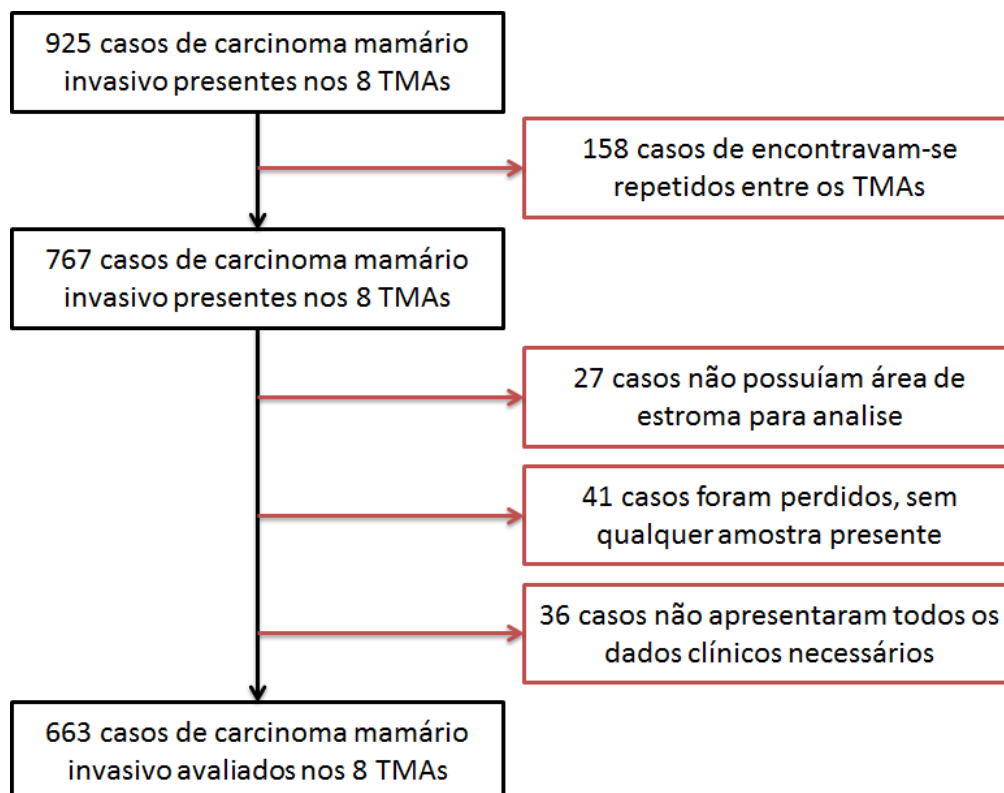


Figura 9 - Fluxograma dos critérios de exclusão das amostras na avaliação por IHQ. No final foram consideradas apenas amostras que possuíam material avaliável, não estavam duplicadas e cujo prontuário encontrava-se completo.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas das pacientes usadas para imuno-histoquímica.

	Categoria	N	Sobrevida em meses	Valor p
Estadiamento clínico	I	191	150,65	>0,001
	II	217	145,70	
	III	140	135,04	
	IV	43	73,99	
Acometimento Linfonodal	Sim	265	131,44	>0,001
	Não	327	164,35	
Grau nuclear	1	47	164,65	0,060
	2	216	143,82	
	3	366	139,21	
	Ductal	493	141,62	
Histologia	Lobular	139	156,15	0,220
	Outros	27	159,54	
	1	124	161,30	
Grau Histológico	2	312	152,55	>0,001
	3	187	137,30	
	Luminal A	231	146,28	
	Luminal B	188	138,30	
Subtipo	HER2	43	120,20	0,001
	Triplo Negativo	96	129,24	
	Sim	15	88,12	
	Não	613	150,59	
Invasão Vascular	Sim	62	138,19	0,989
	Não	567	150,00	
Invasão Perineural	Sim	116	117,24	0,075
	Não	514	153,45	
Invasão Linfática	Ausente/Discreta	379	151,12	0,789
	Moderada/Extensa	246	146,93	
Quimioterapia Neoadjuvante	Sim	134	126,41	>0,001
	Não	500	155,09	
Recidiva	Sim	133		
	Não	530		
Óbito	Sim	81		
	Não	582		

Características clínico-patológicas tratamento e do seguimento das 663 pacientes diagnosticadas com carcinoma mamário invasor e amostras disponíveis nos blocos de tissue microarray para estudo imuno-histoquímico. Em negrito estão as categorias mais enriquecidas e os valores estatisticamente significativos.

Todas as amostras presentes nos TMAs foram avaliadas com relação à presença ou ausência de marcação e os tipos celulares marcados. Os imunomarcadores foram avaliados individualmente quanto à sua relação com a SCE e livre de doença.

Como estadiamento clínico, grau histológico, acometimento linfonodal e subtipos estão entre os fatores prognósticos clássicos do câncer de mama e apresentam relevância estatística na sobrevida dentro da nossa amostra (todos possuem $p < 0,05$), adicionamos esses fatores como covariáveis para a análise multivariada através do modelo de regressão múltipla de Cox.

4.2.2 Reação de Imuno-Histoquímica

Nas Figuras 10 e 11 vemos as marcações das reações de imuno-histoquímica dos sete marcadores: CD3 (linfócitos T no geral), CD4 (linfócitos T auxiliares), CD8 (linfócitos T citotóxicos), CD68 (macrófagos no geral), CD163 (macrófagos regulatórios), FOXP3 (linfócitos T regulatórios) e PAX5 (linfócitos B).

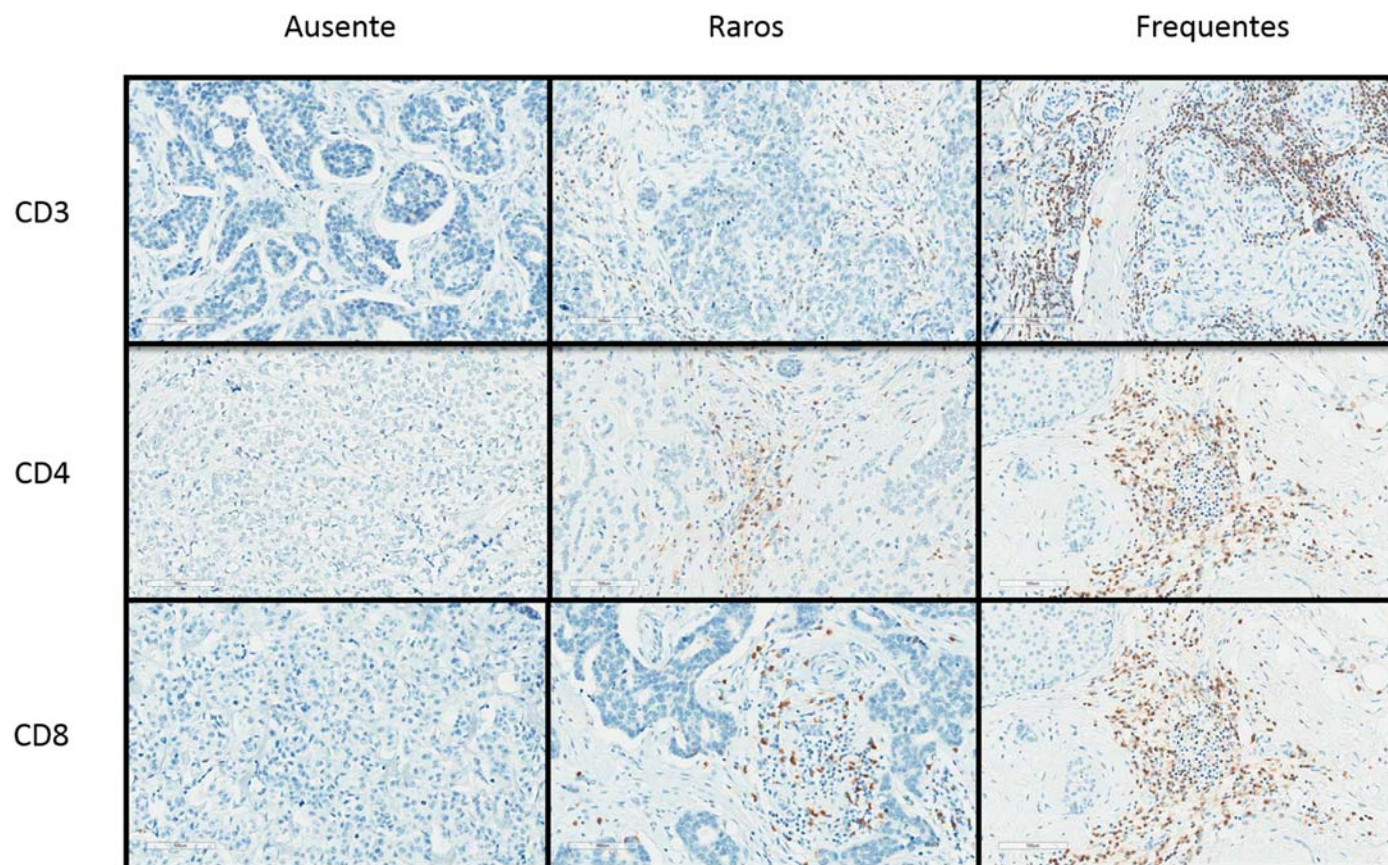


Figura 10 - Fotomicrografias das colorações imuno-histoquímicas representando a heterogeneidade quanto as populações de células inflamatórias no câncer de mama. Anticorpos anti-CD3, CD4 e CD8, 100x. À esquerda pode-se notar os casos de infiltrado inflamatório escasso, no meio os casos de infiltrado inflamatório moderado e por último, a direita, o infiltrado intenso. CD3, CD4 e CD8 possuem marcação membranar.

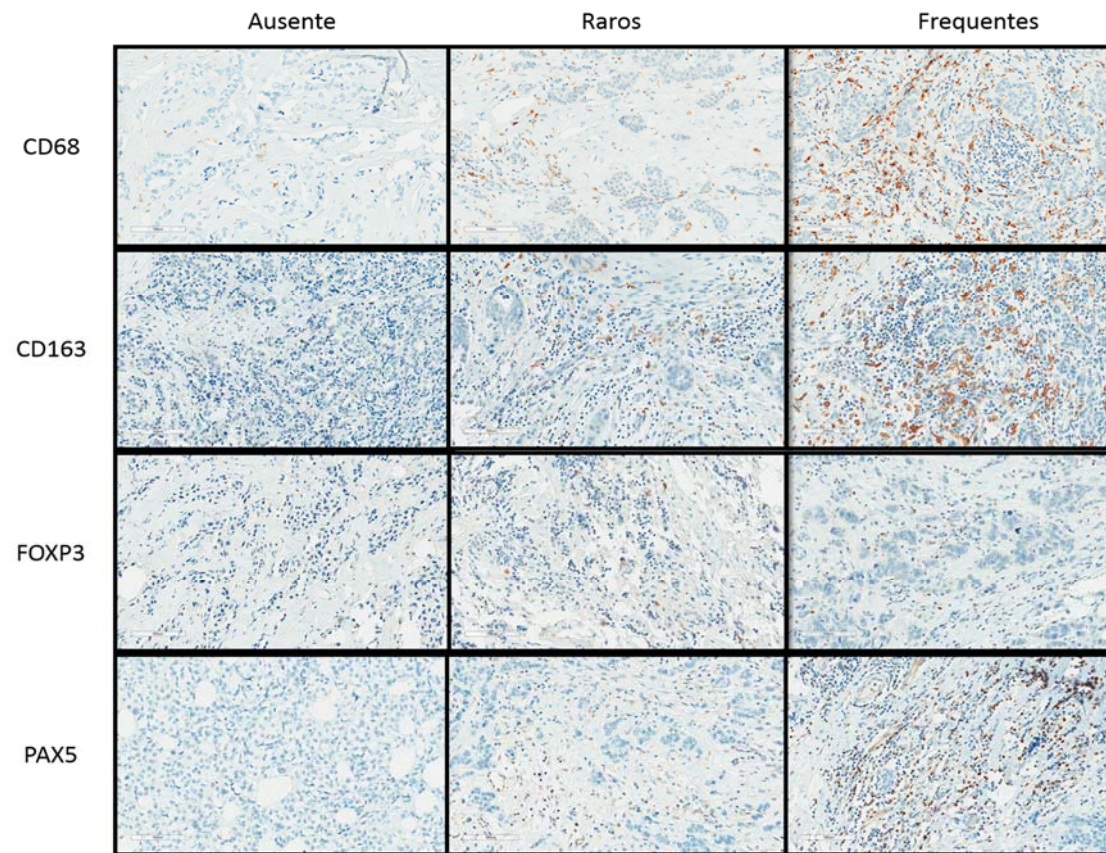


Figura 11 - Fotomicrografias das colorações imuno-histoquímicas representando a heterogeneidade quanto as populações de células inflamatórias no câncer de mama. Anticorpos anti-CD68, anti-CD163, anti-FOXP3 e anti-PAX5, 100x. À esquerda pode-se notar os casos de infiltrado inflamatório escasso, no meio os casos de infiltrado inflamatório moderado e por último, a direita, o infiltrado intenso. CD68 e CD163 possuem marcação citoplasmática.

Podemos observar que todas as marcações foram específicas para as células que se encontraram no estroma, o que facilitou a contagem das células com os imunomarcadores selecionados. As células marcadas pelos anticorpos CD3, CD4 e CD8 apresentaram marcação de membrana; CD68 e CD163 marcação citoplasmática; FOXP3 e PAX5 marcação nuclear, conforme esperado pela sublocalização celular das proteínas correspondentes.

4.2.3 Comparação dos Imunomarcadores

Primeiramente, analisamos a presença de cada marcador individualmente em cada um dos 4 subtipos: Luminais A, Luminais B, HER2 e Triplo Negativo. No Quadro 6 temos as quantidades de amostras de cada um dos subtipos:

Quadro 6 - Quantificação das amostras nos diferentes subtipos

<i>Subtipo</i>	<i>Quantidade</i>
Luminal A	231
Luminal B	188
HER2	43
Triplo Negativo	96

Nas páginas seguintes, as Tabelas 4 a 10 e Figuras (gráficos) 12 a 18 demonstramos as comparações das quantificações de cada anticorpo entre os subtipos moleculares do câncer de mama.

CD3

Na Figura 12 e na Tabela 4 podemos notar como foi a comparação grupo a grupo para o anticorpo CD3 e quais são as diferenças estatisticamente significativas.

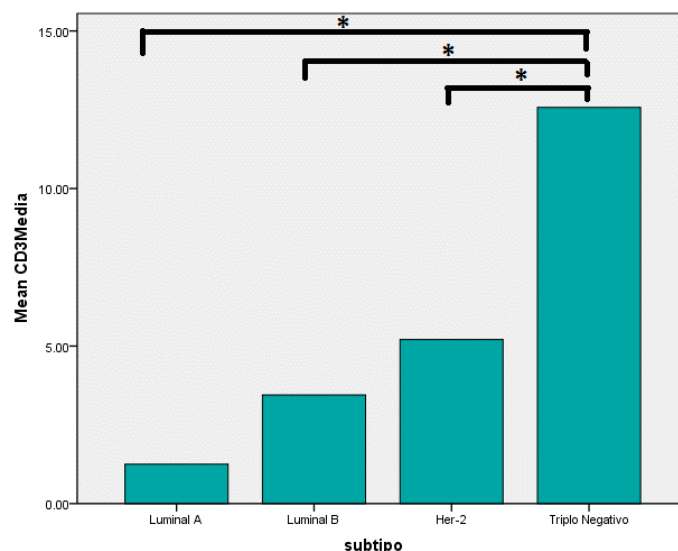


Figura 12- Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD3 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário. Em colchetes notamos as comparações que foram estatisticamente significativas

Tabela 4 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD3 em cada subtipo molecular do câncer de mama.

<i>Grupo 1 X Grupo 2</i>	<i>Média Grupo 1</i>	<i>Média Grupo 2</i>	<i>Valor de p</i>
LumA X LumB	1,258	3,450	0,785
LumA X HER2	1,258	5,208	0,646
LumA X TN	1,258	12,574	<0,001
LumB X HER2	3,450	5,208	1,000
LumB X TN	3,450	12,574	<0,001
HER2 X TN	5,208	12,574	0,023

LA = Luminal A. LB = Luminal B. HER2 = Superexpressor de HER2. TN = Triplo Negativo. Em negrito encontram-se os valores de p estatisticamente significativos. Os valores representam a média de todos os casos dentro de um subtipo molecular. Em cada caso 3 campos de grande aumento foram avaliados e a média aritmética da densidade dos 3 campos foi utilizada para os cálculos estatísticos.

Na Tabela 4 estão expressos os valores da quantificação de CD3 em cada um dos subtipos. Podemos notar que CD3 encontra-se diferencialmente expresso no subtipo triplo negativo, estando mais presente nesse subtipo que nos outros.

CD4

Na Figura 13 e na Tabela 5 podemos notar como foi a comparação grupo a grupo para o anticorpo CD4 e onde foram encontradas as diferenças estatisticamente significativas.

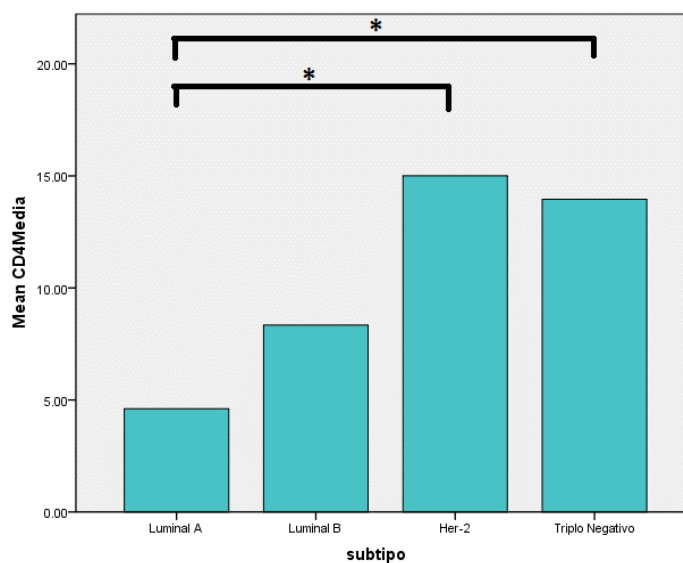


Figura 13 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD4 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário. Em colchetes notamos as comparações que foram estatisticamente significativas

Tabela 5 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD4 em cada subtipo molecular do câncer de mama.

<i>Grupo 1 X Grupo 2</i>	<i>Média Grupo 1</i>	<i>Média Grupo 2</i>	<i>Valor de p</i>
LumA X LumB	4,593	8,341	0,067
LumA X HER2	4,593	15,007	<0,001
LumA X TN	4,593	13,955	0,007
LumB X HER2	8,341	15,007	0,155
LumB X TN	8,341	13,955	0,329
HER2 X TN	15,007	13,955	1,000

LA = Luminal A. LB = Luminal B. HER2 = Superexpressor de HER2. TN = Triplo Negativo. Em negrito encontram-se os valores de p estatisticamente significativos.

Na Tabela 5 estão os dados das médias de imunomarcção para o anticorpo CD4 em cada subtipo. É possível distinguir o grupo Luminal A, que possui menor positividade que os outros subtipos. A diferença entre os LA e os não-Luminais é estatisticamente significativa (HER2 $p<0,001$ e TN $p=0,007$).

CD8

Na Figura 14 e na Tabela 6 podemos notar como é a comparação grupo a grupo para o anticorpo CD8. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

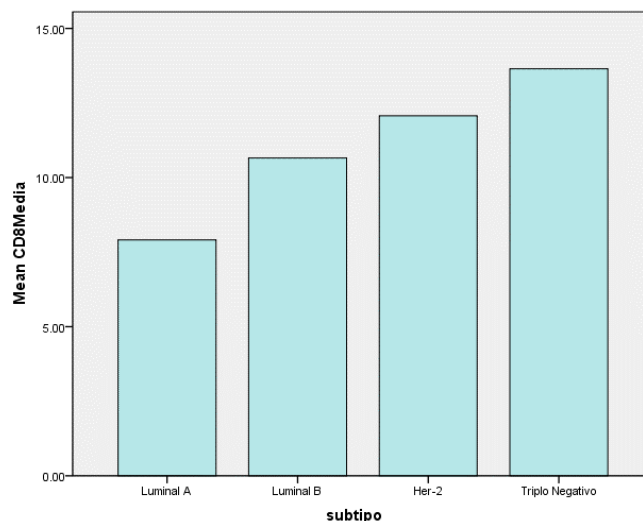


Figura 14 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD8 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário.

Tabela 6 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD8 em cada subtipo molecular do câncer de mama.

<i>Grupo 1 X Grupo 2</i>	<i>Média Grupo 1</i>	<i>Média Grupo 2</i>	<i>Valor de p</i>
LumA X LumB	7,923	10,655	0,368
LumA X HER2	7,923	12,072	0,467
LumA X TN	7,923	13,648	0,665
LumB X HER2	10,655	12,072	0,897
LumB X TN	10,655	13,648	0,727
HER2 X TN	12,072	13,648	0,598

LA = Luminal A. LB = Luminal B. HER2 = Superexpressor de HER2. TN = Triplo Negativo.

Em negrito encontram-se os valores de p estatisticamente significativos.

Aqui observamos a quantificação média das células marcadas por CD8. Nota-se que os subtipos possuem praticamente a mesma quantidade de células imunomarcadas, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos.

CD68

Na Figura 15 e na Tabela 7 podemos notar como foi a comparação grupo a grupo para o anticorpo CD68 e onde foram encontradas as diferenças estatisticamente significativas.

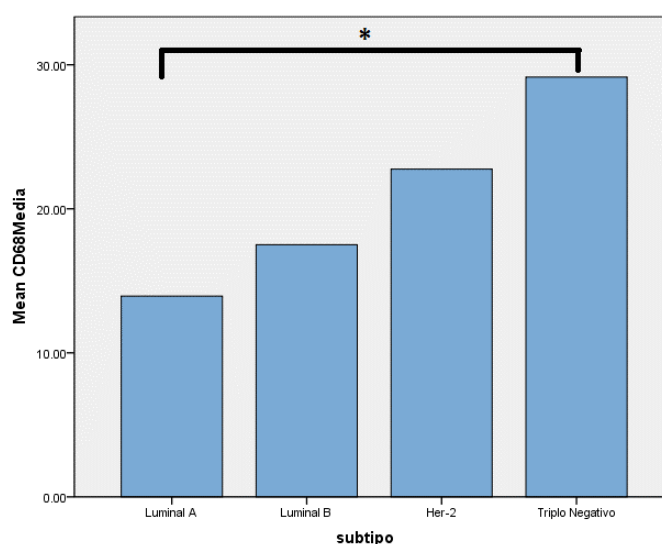


Figura 15 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD68 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário. Em colchetes notamos as comparações que foram estatisticamente significativas.

Tabela 7 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD68 em cada subtipo molecular do câncer de mama.

<i>Grupo 1 X Grupo 2</i>	<i>Média Grupo 1</i>	<i>Média Grupo 2</i>	<i>Valor de p</i>
LumA X LumB	14,009	17,510	0,913
LumA X HER2	14,009	22,756	0,070
LumA X TN	14,009	29,146	0,013
LumB X HER2	17,510	22,756	0,416
LumB X TN	17,510	29,146	0,554
HER2 X TN	22,756	29,146	1,000

LA = Luminal A. LB = Luminal B. HER2 = Superexpressor de HER2. TN = Triplo Negativo.
Em negrito o valor de p estatisticamente significativo.

Ao analisarmos a Tabela 7 de imunomarcção média para o anticorpo CD68, notamos que os subtipos não luminais apresentam uma positividade maior, mas apenas a diferença entre os grupos Luminal A (≈ 6 células marcadas) e Triplo Negativo (≈ 16 células marcadas) foi estatisticamente significativa ($p=0,013$).

CD163

Na Figura 16 e na Tabela 8 podemos notar como foi a comparação grupo a grupo para o anticorpo CD163 e a diferença estatisticamente significativa.

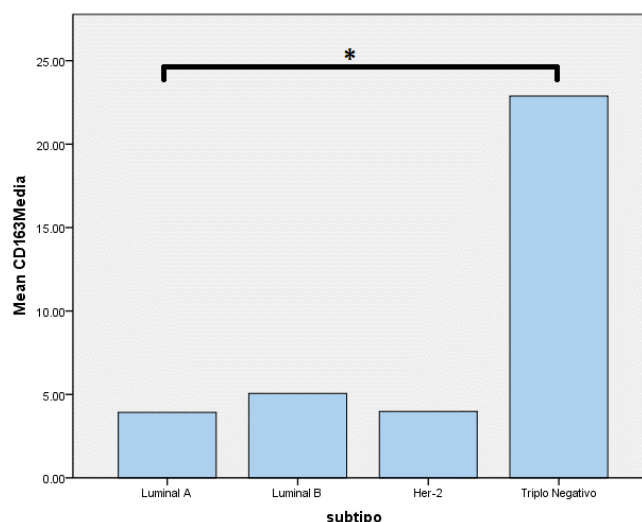


Figura 16 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD163 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário. Em colchetes notamos as comparações que foram estatisticamente significativas.

Tabela 8 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo CD163 em cada subtipo molecular do câncer de mama.

<i>Grupo 1 X Grupo 2</i>	<i>Média Grupo 1</i>	<i>Média Grupo 2</i>	<i>Valor de p</i>
LumA X LumB	3,945	5,064	1,000
LumA X HER2	3,945	3,978	1,000
LumA X TN	3,945	22,885	<0,001
LumB X HER2	5,064	3,978	1,000
LumB X TN	5,064	22,885	<0,001
HER2 X TN	3,978	22,885	1,000

LA = Luminal A. LB = Luminal B. HER2 = Superexpressor de HER2. TN = Triplo Negativo. Em negrito o valor de p estatisticamente significativo. Em negrito o valor de p estatisticamente significativo.

Os grupos Luminais A (≈ 4 células marcadas) e B (≈ 5 células marcadas) possuem significativamente menos células CD163 positivas do que o subtipo Triplo Negativo (≈ 23) ($p < 0,001$).

FOXP3

Na Figura 17 e na Tabela 9 podemos notar como foi a comparação grupo a grupo para o anticorpo FOXP3 e onde foram encontradas as diferenças estatisticamente significativas.

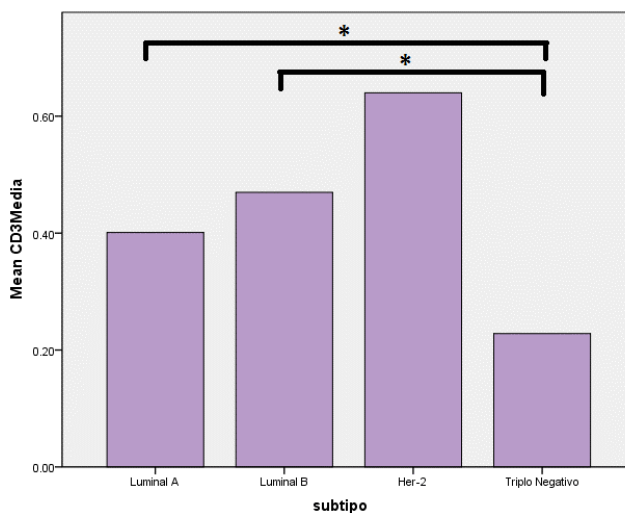


Figura 17 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo FOXP3 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário. Em colchetes notamos as comparações que foram estatisticamente significativas.

Tabela 9 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo FOXP3 em cada subtipo molecular do câncer de mama.

<i>Grupo 1 X Grupo 2</i>	<i>Média Grupo 1</i>	<i>Média Grupo 2</i>	<i>Valor de p</i>
LumA X LumB	0,401	0,470	1,000
LumA X HER2	0,401	0,640	1,000
LumA X TN	0,401	0,228	0,001
LumB X HER2	0,470	0,640	1,000
LumB X TN	0,470	0,228	0,023
HER2 X TN	0,640	0,228	0,158

LA = Luminal A. LB = Luminal B. HER2 = Superexpressor de HER2. TN = Triplo Negativo.
Em negrito o valor de p estatisticamente significativo.

O marcador FOXP3 possui raras células (média menor que 1) marcadas em qualquer dos subtipos, sem utilidade na diferenciação entre os subtipos.

PAX5

Na Figura 18 e na Tabela 10 podemos notar como é a comparação grupo a grupo para o anticorpo PAX5. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

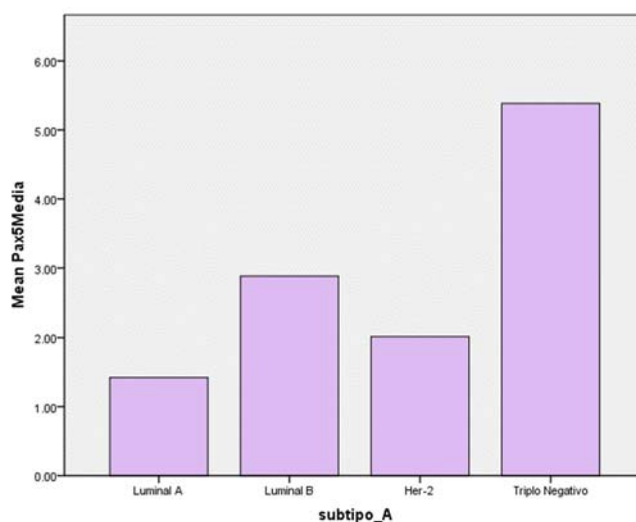


Figura 18 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo PAX5 nos diferentes subtipos moleculares de carcinoma mamário.

Tabela 10 - Valores médios do número de células imunomarcadas com o anticorpo PAX5 em cada subtipo molecular do câncer de mama.

<i>Grupo 1 X Grupo 2</i>	<i>Média Grupo 1</i>	<i>Média Grupo 2</i>	<i>Valor de p</i>
LumA X LumB	1,429	2,882	0,235
LumA X HER2	1,429	2,015	0,569
LumA X TN	1,429	5,385	0,112
LumB X HER2	2,882	2,015	0,475
LumB X TN	2,882	5,385	0,326
HER2 X TN	2,015	5,385	0,248

LA = Luminal A. LB = Luminal B. HER2 = Superexpressor de HER2. TN = Triplo Negativo.
Em negrito o valor de p estatisticamente significativo.

Após comparar todos os subtipos nota-se que as maiores diferenças se fazem entre os subtipos Luminal A e Triplo-Negativo, sendo o segundo grupo enriquecido de células positivas para CD3, CD4, CD68, CD163 e FOXP3.

4.2.4 Análise de Sobrevida

Realizamos as análises de sobrevida câncer específica e sobrevida livre de doença para cada um dos imunomarcadores, com cada um dos seus pontos de corte específicos segundo a metodologia de maximização. Todos os pontos de corte utilizados, assim como as curvas de sobrevida de todos os imunomarcadores se encontram no Apêndice 2. Representamos aqui apenas curvas que foram estatisticamente significativas.

4.2.4.1 Sobrevida Câncer-Específica

Apenas a positividade para o anticorpo anti-CD8 apresentou relevância estatística quanto a sobrevida câncer específica, tendo um caráter protetor.

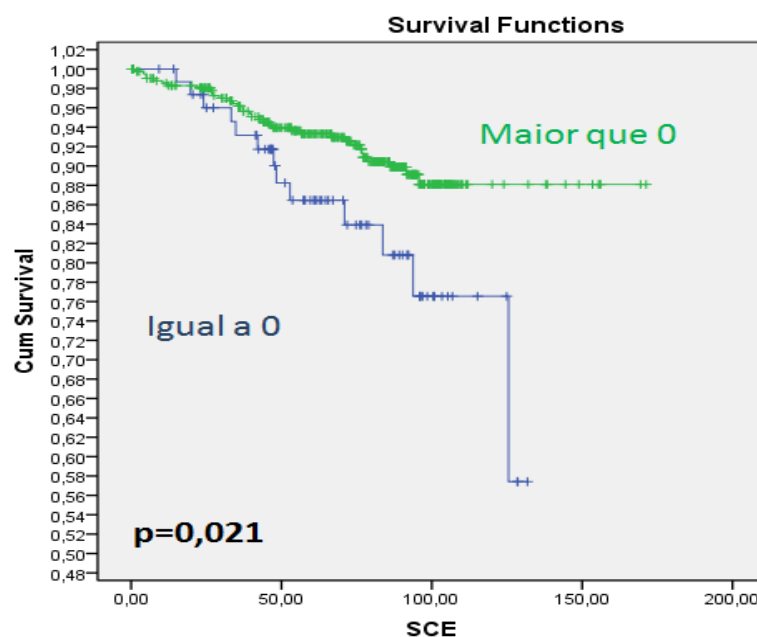


Figura 20 - Curva de Sobrevida Câncer Específica para o câncer de mama em função do número de células CD8 positivas. Método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD8: ponto de corte=0 células ($p=0,021$).

A Tabela 11 demonstra a diferença de sobrevida aos 120 meses para entre os casos com e sem marcação para CD8.

Tabela 11 - Comparação da proporção de indivíduos vivos (com ou sem doença; Sobrevida Câncer Específica) após 10 anos de seguimento, em função da presença de linfócitos CD8 positivos.

Marcador	Ponto de corte	Sobrevida em 120 meses (%)	Valor de p
CD8	0	Menor: 57% Maior: 88%	0,021

Após o cálculo das curvas de sobrevida empregamos o modelo de regressão de Cox univariado, incluindo apenas o marcador estatisticamente significativo, como mostrado na Tabela 12, para associá-lo com seu perfil, seja ele de protetor contra o tumor, quanto de potencializador da agressividade tumoral.

Tabela 12 - Modelo de regressão de Cox univariada para sobrevida câncer específica em função da ausência de linfócitos CD8 positivos.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD8	Igual a 0	0,487	0,253	0,905	0,023

Podemos observar os pontos de corte do marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p. Em negrito encontra-se o valor de p estatisticamente significativo.

O CD8 manteve seu valor estatístico com o modelo de regressão univariado de cox. As pacientes que não possuem as células imunomarcadas tem mais que o dobro de chance de evoluir a óbito.

Após realizarmos as curvas de sobrevida câncer específica e o modelo de regressão de Cox univariado, utilizamos o modelo de regressão múltipla de Cox com cada marcador e estadiamento clínico, acometimento linfonodal, grau histológico e subtipos moleculares, já que essas variáveis mostraram associação estatisticamente significativa com sobrevida (todos com $p \leq 0,05$). Os valores de todos encontram-se no Apêndice 2.

Tabela 13 – Risco relativo para os fatores prognósticos clássicos e presença de linfócitos CD8 através da regressão de Cox multivariada aplicada à sobrevida câncer específica

Marcador	Grupo de risco	Risco Relativo	<i>Intervalo de confiança</i>		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD8	Igual a 0	0,593	0,253	1,387	0,288

Usamos como fatores prognósticos o estadiamento clínico, SBR, acometimento linfonodal e subtipo molecular. Podemos observar os pontos de corte do marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p. Em negrito encontra-se o valor de p estatisticamente significativo.

Podemos notar que CD8 não se mostrou independentemente associado à SCE.

4.2.4.2 Sobrevida Livre de Doença

Após a realização do teste de maximização dos pontos de corte para todos os marcadores com relação à recorrência, foram realizadas as curvas de SLD utilizando o método de Kaplan-Meier com o cálculo de log-rank.

Todos os pontos de corte utilizados, assim como as curvas de sobrevida livre de doença de todos os imunomarcadores se encontra no

Apêndice 3. A seguir estarão representadas as curvas de sobrevida cujos marcadores imuno-histoquímicos apresentaram significância estatística.

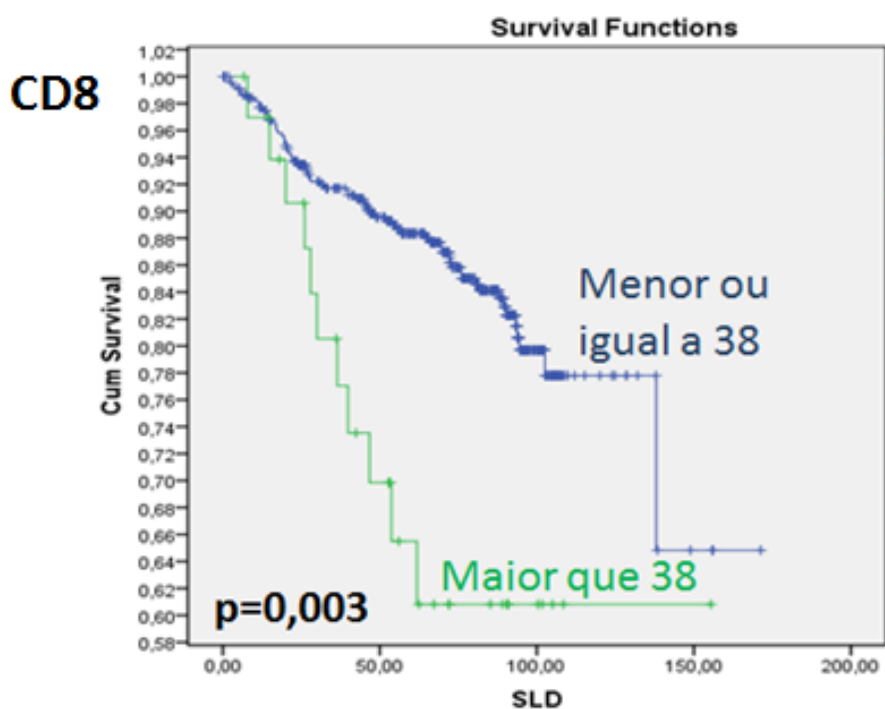


Figura 19 - Curvas mostrando a proporção de indivíduos Livre de Doença calculado pelo método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank em função das subpopulações de células inflamatórias. CD8: ponto de corte de 38 ($p=0,003$). CD68: ponto de corte de 26 ($p=0,006$). CD163: ponto de corte de 4 ($p=0,027$). FOXP3: ponto de corte: 0 ($p=0,031$).

A Tabela 14 resume os achados estatísticos em relação a SLD em cada um dos marcadores e seus respectivos pontos de corte.

Tabela 14 – Comparação das proporções de indivíduos livre de doença aos 10 anos de seguimento, de acordo com ponto de corte maximizado em cada imunomarcador.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	13	Menor:84% Maior:77%	0,184
CD4	32	Menor: 85% Maior:68%	0,192
CD8	38	Menor: 65% Maior: 61%	0,003
CD68	26	Menor: 80% Maior: 68%	0,004
CD163	4	Menor: 81% Maior: 72%	0,027
FOXP3	0	Menor: 73% Maior: 81%	0,031
PAX5	11	Menor:83% Maior:79%	0,420

Em negrito os valores de p com significância estatística.

Ao avaliarmos o imunomarcador CD8, associado aos linfócitos T citotóxicos, notamos que a alta concentração de células marcadas (mais que 38 células), tem uma relação com um pior prognóstico, relacionando-se então com uma maior chance de recorrência da doença.

Da mesma forma, CD68 que é um imunomarcador para macrófagos em geral e CD163 que é um marcador específicos de macrófagos de perfil M2, relacionam-se ambos com um pior prognóstico e maior probabilidade de recorrência da doença.

Por fim, a presença de linfócitos T regulatórios, imunomarcados pelo anticorpo FOXP3, está associado com uma menor probabilidade de recorrência da doença, portanto relacionando-se com um melhor prognóstico.

Tabela 15 - Risco relativo de sobrevida livre de doença obtido pela regressão de Cox univariada para os imunomarcadores selecionados pela significância estatística no método de Kaplan-Meier.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD3	Abaixo de 13	0,640	0,329	1,243	0,212
CD4	Acima de 32	1,671	0,767	3,640	0,228
CD8	Acima de 38	2,578	1,359	4,891	0,004
CD68	Acima de 26	2,032	1,211	3,408	0,007
CD163	Acima de 4	1,787	1,062	3,008	0,029
FOXP3	Igual a 0	0,554	0,321	0,955	0,033
PAX5	Igual a 0	1,324	0,535	3,279	0,560

Podemos observar os pontos de corte do marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p. Em negrito encontra-se o valor de p estatisticamente significativo.

Podemos observar na Tabela 15 da regressão univariada de Cox relacionada à SLD que os marcadores CD8, CD68, CD163 e FOXP3 apresentam compatibilidade com as curvas de Kaplan-Meier. Enquanto a presença densa de linfócitos CD8+ e células CD68+ dobram as chances de recorrência, a infiltração de macrófagos CD163+ aumenta as chances de recorrência em cerca de 79%, e a presença de linfócitos FOXP3+ diminui a chance de recorrência em 55%.

No modelo de regressão múltipla de Cox multivariado, incluímos além dos marcadores descritos no parágrafo anterior, também fatores prognósticos clássicos do câncer de mama que se mostraram associados estatisticamente

com recorrência no nosso estudo (estadiamento clínico, acometimento linfonodal, grau histológico e subtipos moleculares).

Tabela 16 - Risco Relativo de recorrência do câncer de mama em 120 meses segundo o modelo de regressão de Cox multivariada para os fatores prognósticos clássicos e marcadores imuno-histoquímicos com relevância estatística na análise univariada.

<i>Intervalo de confiança</i>					
Categorias	Grupo de risco	Risco Relativo	Inferior	Superior	Valor de p
Estadiamento 1					0,891
Estadiamento 2		0,832	0,251	2,755	0,736
Estadiamento 3		0,769	0,258	2,295	0,638
N 1					0,013
N 2		0,155	0,040	0,595	0,007
N 3		0,148	0,450	0,485	0,002
N 4		0,307	0,118	0,800	0,016
Grau Histológico 1					0,006
Grau Histológico 2		0,152	0,035	0,662	0,012
Grau Histológico 3		0,432	0,240	0,853	0,014
Subtipo LumA					0,760
Subtipo LumB		0,334	0,143	0,780	0,011
Subtipo Her2		0,749	0,365	1,535	0,430
Subtipo TN		0,855	0,321	2,276	0,753
CD3	Abaixo de 13	1,856	0,775	4,456	0,136
CD4	Acima de 32	1,259	0,515	3,078	0,606
CD8	Acima de 38	1,750	0,892	3,430	0,103
CD68	Acima de 26	1,058	0,540	2,074	0,869
CD163	Acima de 4	1,550	0,825	2,914	0,173
FOXP3	Igual a 0	0,665	0,341	1,298	0,232
PAX5	Igual a 0				

Usamos como fatores prognósticos o estadiamento clínico, SBR, acometimento linfonodal e subtipo molecular. Podemos observar os pontos de corte do marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p. Em negrito encontra-se o valor de p estatisticamente significativo.

Nenhum marcador se mostrou como um fator prognóstico independente dos fatores preditivos clássicos.

Por ultimo, antes de estudar os subtipos moleculares individualmente, avaliei a relação entre os linfócitos T citotóxicos e os linfócitos T regulatórios, classificando-os em duas categorias: uma na qual há uma quantidade alta de linfócitos T citotóxicos (CD8 alto) e linfócitos Treg baixos (FOXP3 baixo) e a outra na qual há poucos linfócitos T citotóxicos (CD8 baixo) e muitos linfócitos Treg (FoxP3 alto). Mas esses dois perfis não se mostraram significativamente diferentes tanto em relação a sobrevida livre de doença, quanto em relação a sobrevida livre específica.

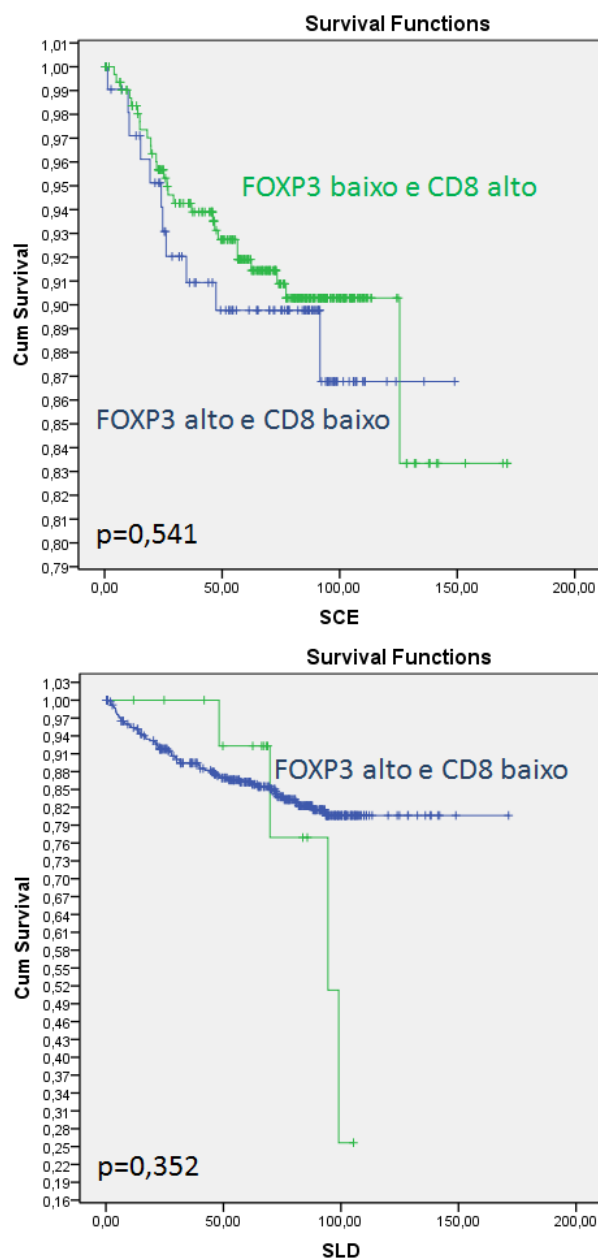


Figura 20 - Curvas de sobrevida câncer específica e SLD da correlação CD8/FOXP3. SCE com todos os subtipos ($p=0,591$). SLD com todos os subtipos ($p=0,591$). Não foi possível realizar a mesma análise com cada subtipo individualmente pois o número de eventos era muito pequeno e impossibilitava a estatística.

4.2.5 Comparação dos Subtipos Moleculares

Separamos os subtipos moleculares de câncer de mama, para avaliar o perfil de células inflamatórias e sua influência prognóstica nos subtipos individualmente. Os pontos de corte foram recalculados para cada subtipo.

Quadro 7 - Relação dos diferentes pontos de corte tanto em quando avaliamos todos os subtipos moleculares, como quando o cálculo foi feito para cada subtipo individualmente na sobrevida câncer específica.

	<i>Sobrevida Câncer específica – Pontos de corte e valores de p</i>									
	Todos	p	LA	p	LB	p	TN	p	HER2	p
CD3	5	0,308	0	0,165	20	0,428	0	0,002	0	0,296
CD4	0	0,416	9	0,448	0	0,237	1	0,002	3	0,437
CD8	0	0,021	3	0,155	1	0,025	6	0,037	9	0,437
CD68	1	0,057	3	0,606	7	0,027	7	0,115	-	-
CD163	0	0,835	1	0,093	0	0,33	83	0,115	-	-
FOXP3	1	0,449	1	0,292	1	0,956	12	0,330	1	0,437
PAX5	1	0,076	0	0,184	1	0,104	3	0,668	0	0,238

Usamos a metodologia de estimativa de maximização do ponto de corte pelo teste estatístico log-rank. Em negrito encontra-se o valor de p estatisticamente significativo.

Quadro 8 - Relação dos diferentes pontos de corte tanto em quando avaliamos todos os subtipos moleculares, como quando o cálculo foi feito para cada subtipo individualmente em relação a sobrevida livre de doença.

	<i>Sobrevida Livre de Doença – Pontos de corte e valores de p</i>									
	Todos	p	LA	p	LB	p	TN	P	HER2	P
CD3	13	0,184	1	0,413	9	0,606	1	0,068	0	0,916
CD4	32	0,192	13	0,132	12	0,18	2	0,096	3	0,096
CD8	38	0,003	29	0,001	30	0,194	38	0,157	9	0,157
CD68	26	0,006	49	0,126	7	0,454	84	0,181	29	0,181
CD163	4	0,027	4	0,002	2	0,696	12	0,471	1	0,471
FOXP3	0	0,031	1	0,021	0	0,128	0	0,082	1	0,082
PAX5	11	0,542	1	0,047	0	0,127	3	0,240	0	0,240

Usamos a metodologia de estimativa de maximização do ponto de corte pelo teste estatístico log-rank. Em negrito encontra-se o valor de p estatisticamente significativo.

Luminal A

Primeiramente realizamos as análises de SCE nesse subtipo, mas nenhum marcador se mostrou com uma estatística relevante. No Apêndice 4 podemos observar todas as curvas de sobrevidas desse caso, além da regressão de Cox univariada.

Ao realizarmos a análise de SLD notamos relevância estatística em alguns marcadores, sendo eles CD8, CD163 e PAX5. Os gráficos e o modelo de regressão de Cox univariado dos demais marcadores (CD3, CD4, CD68 e FOXP3) se encontram no Apêndice 4.

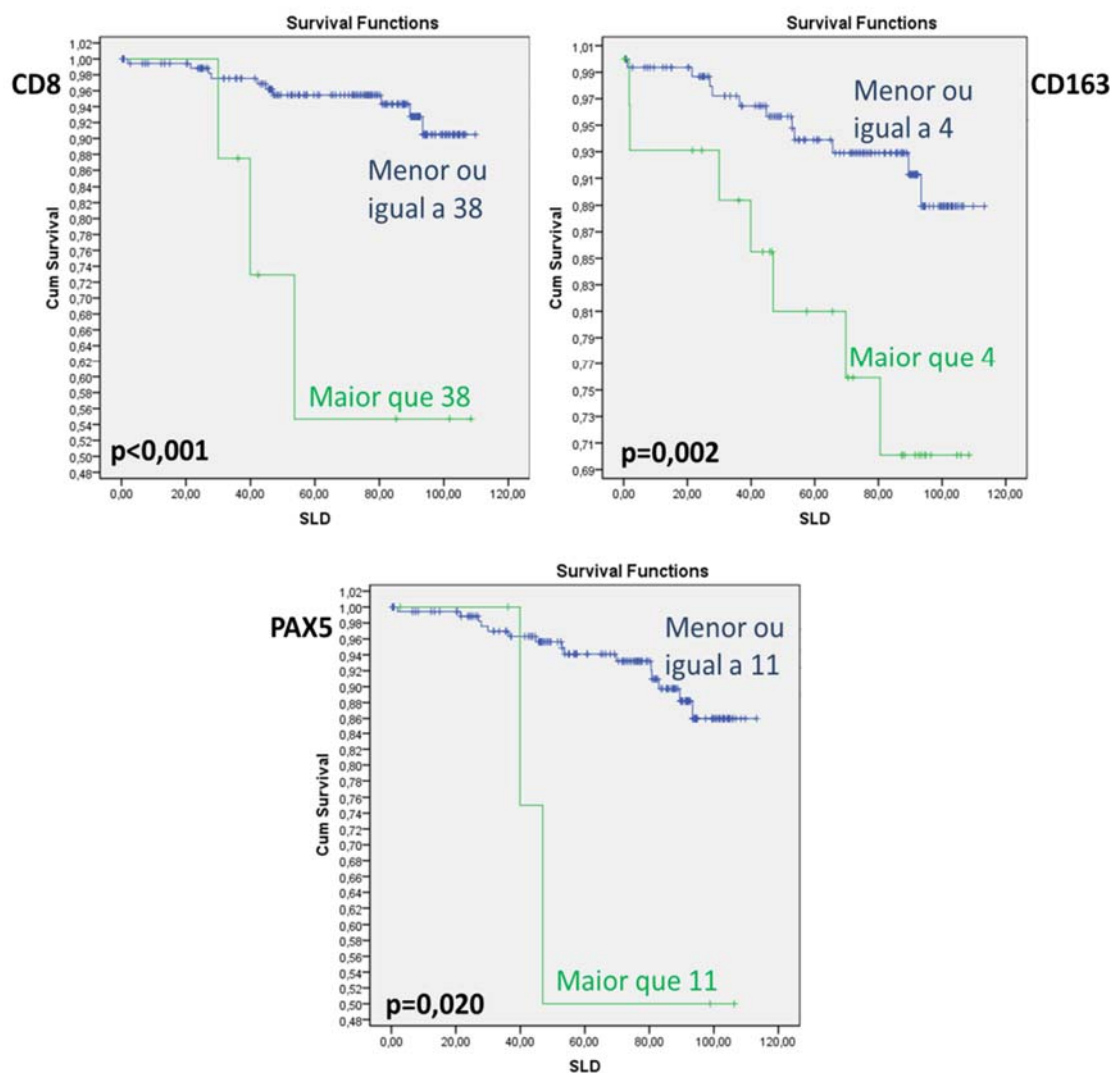


Figura 21 - Curvas mostrando a proporção de indivíduos Livre de Doença calculado pelo método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank em função das subpopulações de células inflamatórias. CD8: ponto de corte de 38 ($p < 0,001$). CD163: ponto de corte de 4 ($p = 0,002$). PAX5: ponto de corte de 11 ($p = 0,020$).

Realizamos então os modelos de regressão de Cox univariados com esses marcadores.

Tabela 17 - Modelo de regressão de Cox univariada aplicada à SLD no subtipo LA.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	<i>Intervalo de confiança</i>		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD8	Acima de 38	7,367	2,017	26,908	0,003
CD163	Acima de 4	3,387	1,231	9,323	0,018
PAX5	Acima de 11	4,888	1,111	21,507	0,036

Em negrito os valores de p estatisticamente significativos.

Os imunomarcadores CD8, CD163 e PAX5 mantiveram seu valor estatístico pela análise do modelo de Cox Univariado.

Utilizando apenas o subtipo LA, recalculamos os pontos de corte para todos os imunomarcadores com relação a óbito, e foram calculadas as curvas de sobrevida utilizando o método de Kaplan-Meier e o cálculo de log-rank, mas não houve nenhuma estatística significativa como podemos observar no Apêndice 5. Ao realizarmos o mesmo procedimento para recorrência, o imunomarcador FOXP3 mostrou estar associado com a recorrência da doença ($p=0,021$), como podemos observar na Figura 22.

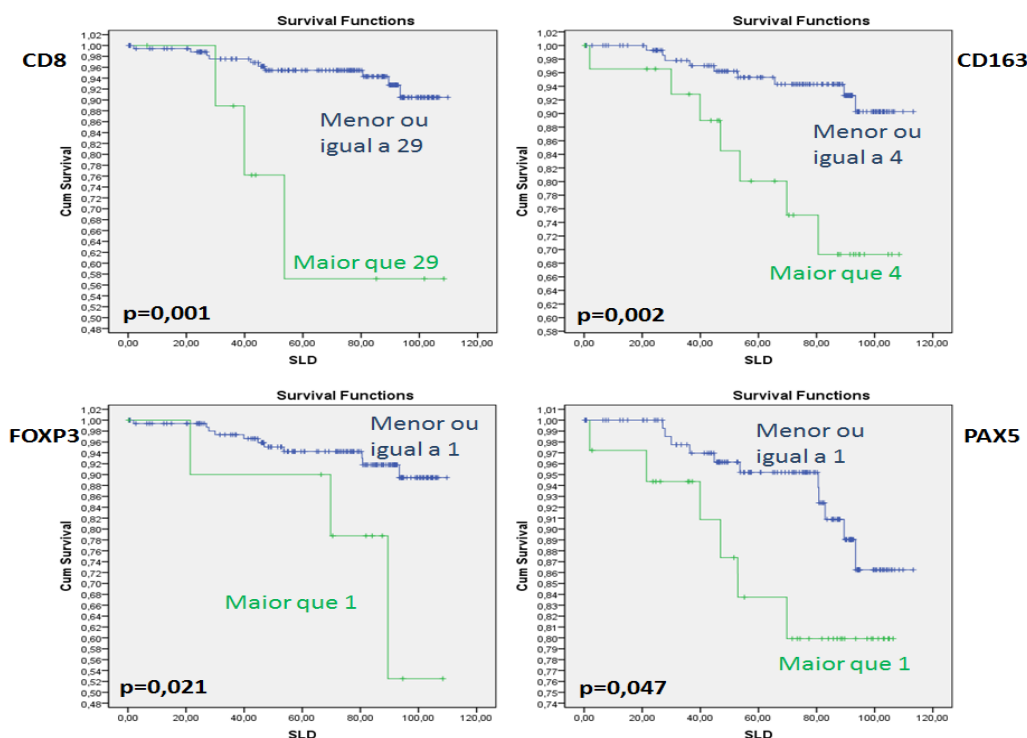


Figura 22 - Curvas de SLD com pontos de corte específicos para LA dos marcadores CD8, CD163, FOXP3 e PAX5. Nas quais foram empregadas o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD8 ponto de corte: 29 (p=0,001). CD163 ponto de corte: 4 (p=0,002). FOXP3 ponto de corte: 1 (p=0,021). PAX5 ponto de corte: 1 (p=0,047).

Realizamos então os modelos de regressão de Cox univariados com esses marcadores, com os resultados mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Modelo de regressão de Cox univariado aplicada à SLD com ponto de corte específico do subtipo LA.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD8	Acima de 29	6,732	1,838	24,654	0,004
CD163	Acima de 4	4,238	1,578	11,386	0,004
FOXP3	Acima de 1	4,037	1,124	14,499	0,032
PAX5	Acima de 1	2,273	0,840	6,151	0,053

Os pontos de corte usados são os calculados para o subtipo LA. Em negrito os valores de p estatisticamente significativos.

Nota-se que com relação ao modelo de Cox CD8, CD163 e FOXP3 mantiveram seu valor estatístico, já PAX5, encontra-se no limite para a significância. As curvas de SLD dos outros imunomarcadores, assim como o modelo de Cox univariado se encontram no Apêndice 5.

Luminal B

Ao realizar as análises de SCE para o subtipo LB, notamos que apenas o CD163 era estatisticamente significativo, na Figura 23 podemos observar a curva de sobrevida câncer específica desse marcador. Ao realizarmos os testes estatísticos observamos que nenhum dos imunomarcadores estava correlacionado a SLD nesse subtipo. No Apêndice 6, observam-se as curvas de SCE e SLD, além da regressão de Cox univariada.

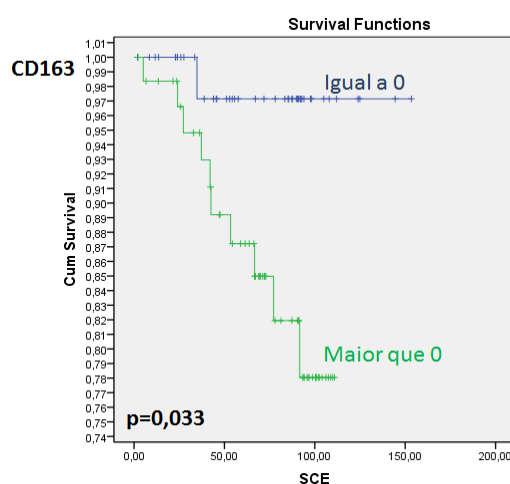


Figura 23 - Curva de SCE do marcador CD163 no subtipo LB. Na qual foi empregada o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD163 ponto de corte: 0 ($p=0,033$).

Realizamos então o modelo de regressão de Cox univariado com CD163.

Tabela 19 - Modelo da regressão de Cox univariada aplicada à sobrevida câncer específica no subtipo LB.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	<i>Intervalo de confiança</i>		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD163	Acima de 0	1,243	0,459	3,370	0,056

Não há nenhum valor menor que 0,05, apenas CD163 que é borderline.

Utilizando apenas o subtipo LB, recalculamos os pontos de corte para todos os imunomarcadores com relação a óbito, e foram calculadas as curvas de sobrevida utilizando o método de Kaplan-Meier e o cálculo de log-rank, e os imunomarcadores CD8, CD68 e CD163 encontram-se estatisticamente significativos, como podemos observar na Figura 24. Ao realizarmos o mesmo procedimento para recorrência, nenhum dos imunomarcadores se mostrou estatisticamente significativo. Os outros imunomarcadores, assim como o modelo de cox univariado se encontram no Apêndice 7.

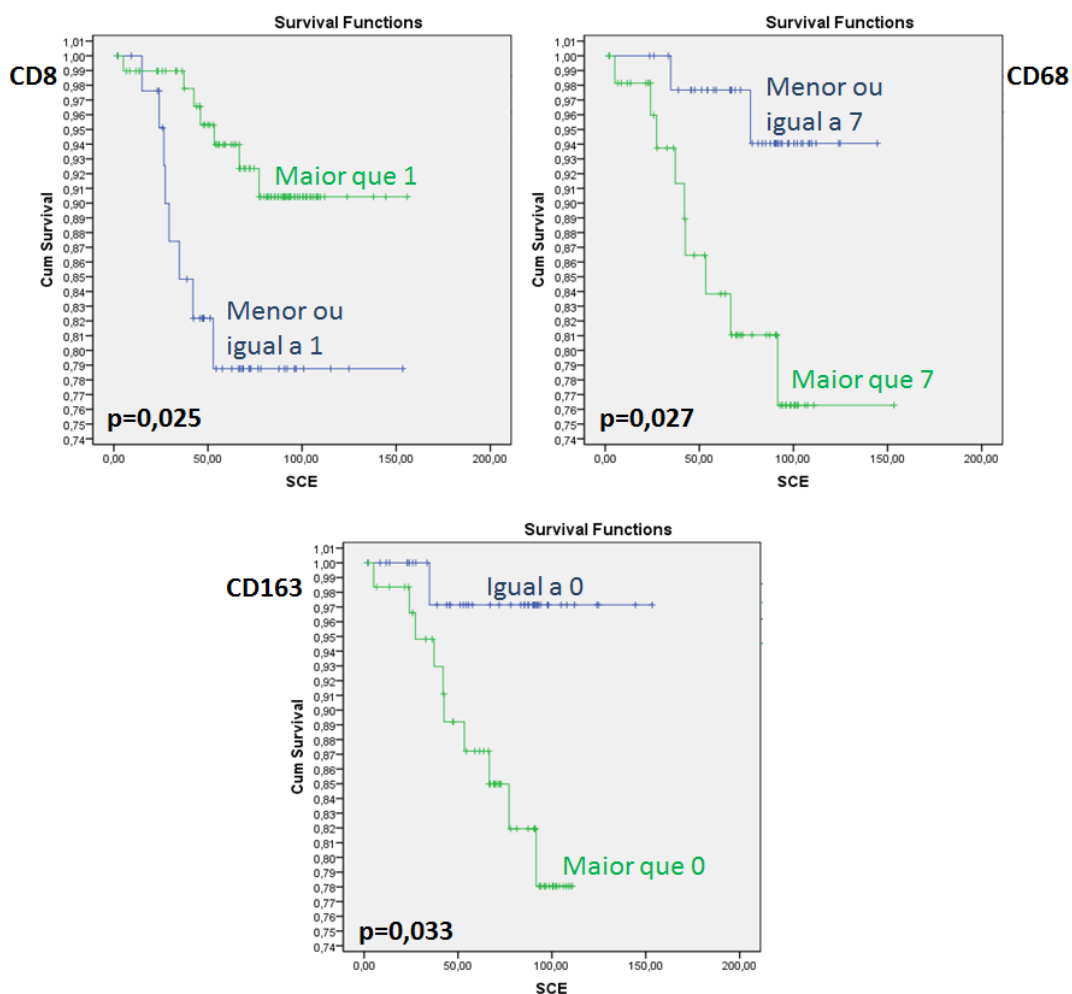


Figura 24 - Curvas de SCE dos marcadores CD8, CD163 e PAX5 com ponto de corte específico para o subtipo LB. Nas quais foram empregadas o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD8 pontos de corte: 1 ($p=0,025$). CD68 ponto de corte: 7 ($p=0,027$). CD163 pontos de corte: 0 ($p=0,002$).

Realizamos então os modelos de regressão de Cox univariados com esses marcadores.

Tabela 20 - Modelo de regressão de Cox univariado aplicada à sobrevida câncer específica com os pontos de corte específicos do subtipo LB.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD8	Abaixo de 1	0,331	0,120	0,916	0,033
CD68	Acima de 7	4,767	1,029	22,078	0,046
CD163	Acima de 0	1,243	0,459	3,370	0,056

Os pontos de corte usados são os calculados para o subtipo LB. Em negrito os valores de p estatisticamente significativos.

Triplo-Negativo

Assim como nos casos anteriores, fizemos as curvas de SCE e SLD relacionando os imunomarcadores ao subtipo Triplo-Negativo. Apenas CD4 correlacionou-se estatisticamente, à SCE, como mostrado na figura 25. No Apêndice 8 podemos observar todas as curvas e a análise do modelo de regressão de Cox em cada um desses marcadores.

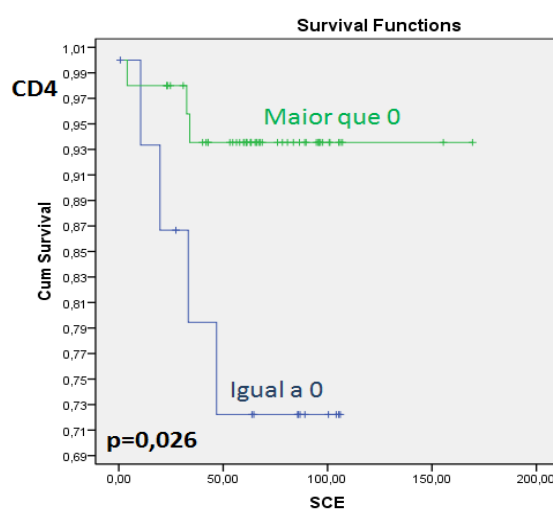


Figura 25 - Curva de sobrevida câncer específica do marcador CD4 no subtipo TN. Na qual foi empregada o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD4 ponto de corte: 0 (p=0,026).

Tabela 21 - Modelo de regressão de Cox univariado aplicada à sobrevida câncer específica no subtipo TN.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	<i>Intervalo de confiança</i>		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD4	Igual a 0	0,213	0,048	0,951	0,043

Em negrito o valor de p estatisticamente significativo.

Utilizando apenas o subtipo TN, recalculamos os pontos de corte para todos os imunomarcadores com relação a óbito, e foram calculadas as curvas de sobrevida utilizando o método de Kaplan-Meier e o cálculo de log-rank, e os imunomarcadores CD3, CD4 e CD8 encontram-se estatisticamente associados, como podemos observar na Figura 26. Ao realizarmos o mesmo procedimento para recorrência, nenhum dos imunomarcadores se mostrou estatisticamente significativo. Os outros imunomarcadores, assim como o modelo de cox univariado se encontram no Apêndice 9.

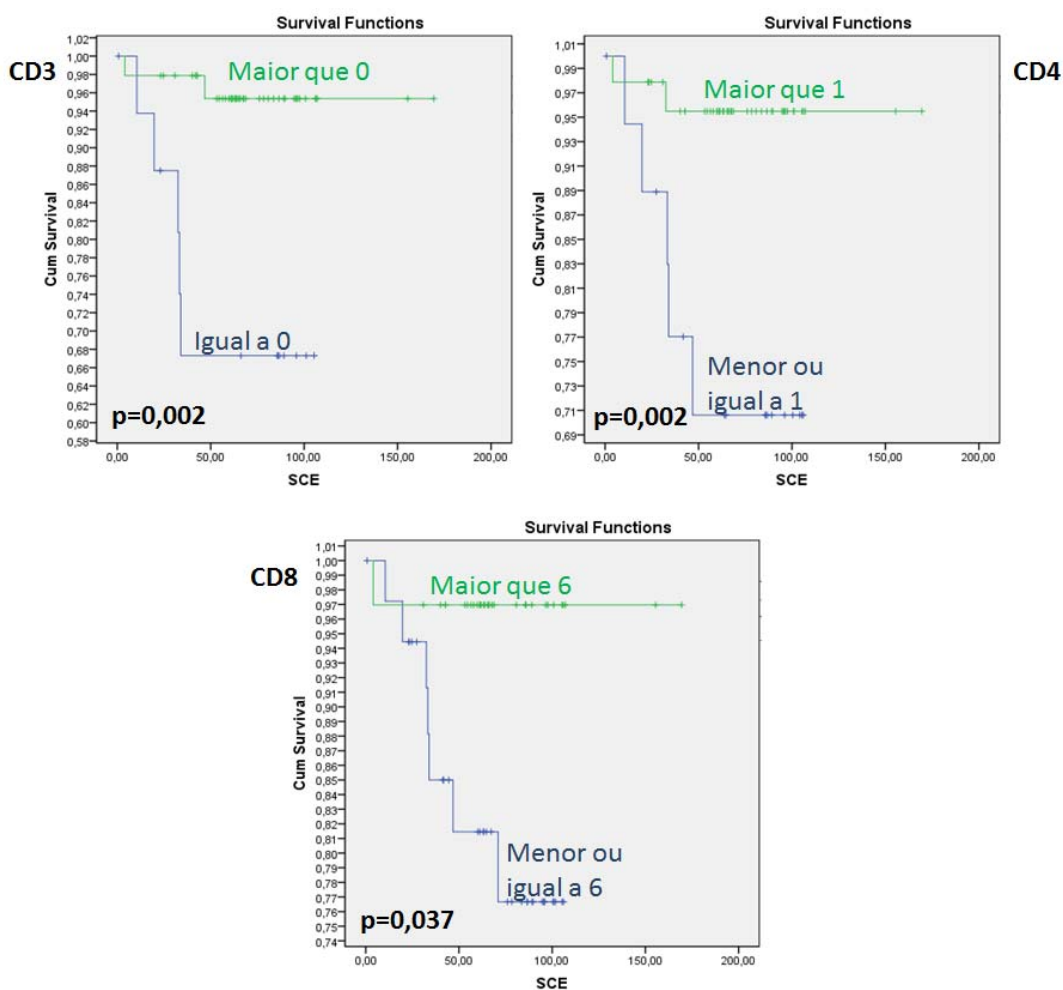


Figura 26 - Curvas de SCE dos marcadores CD3, CD4 e CD8 com ponto de corte específico do subtipo TN. Nas quais foram empregadas o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD3 ponto de corte: 0 ($p=0,002$). CD4 ponto de corte: 1 ($p=0,002$). CD8 ponto de corte: 6 ($p=0,037$).

Realizamos então os modelos de regressão de Cox univariados com esses marcadores.

Tabela 22 - Modelo de regressão de Cox univariado aplicada à sobrevida câncer específica com os pontos de corte específicos do subtipo TN.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	<i>Intervalo de confiança</i>		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD3	Igual a 0	0,119	0,023	0,616	0,011
CD4	Abaixo de 1	0,146	0,028	0,752	0,021
CD8	Abaixo de 6	0,146	0,018	1,186	0,057

O ponto de corte usado foi específico para o subtipo TN. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

HER2

Não houve nenhum resultado de valor estatisticamente significativo em relação a SCE e SLD no subtipo HER2. As curvas de SCE e SLD se encontram no Apêndice 10, mas como há poucas pacientes, não foi possível realizar o modelo de regressão de Cox univariado dessas amostras. Mesmo ao recalculas os pontos de corte, as curvas de SCE e SLD não foram significativas, como mostrado no Apêndice 11.

4.2.6 Avaliação dos Grupos

Ao analisarmos tanto a expressão gênica quanto a imuno-histoquímica temos dois grupos de amostras com características marcantes, o grupo das amostras enriquecidas para os receptores de estrógeno e progesterona (os luminais) e o outro grupo de pacientes, com a maioria das pacientes que expressam HER2. Quando realizamos a segregação em subtipos, não foi possível avaliar apenas o subtipo HER2, decidimos, então agrupar as amostras segundo duas outras categorizações: Luminais e não Luminais e HER2 positivos e HER2 negativos.

1. Grupo Luminais X Não Luminais

Os 663 casos de estudados foram separados em Luminais e não-Luminais, geramos então as curvas de SCE e SLD (Figura 27).

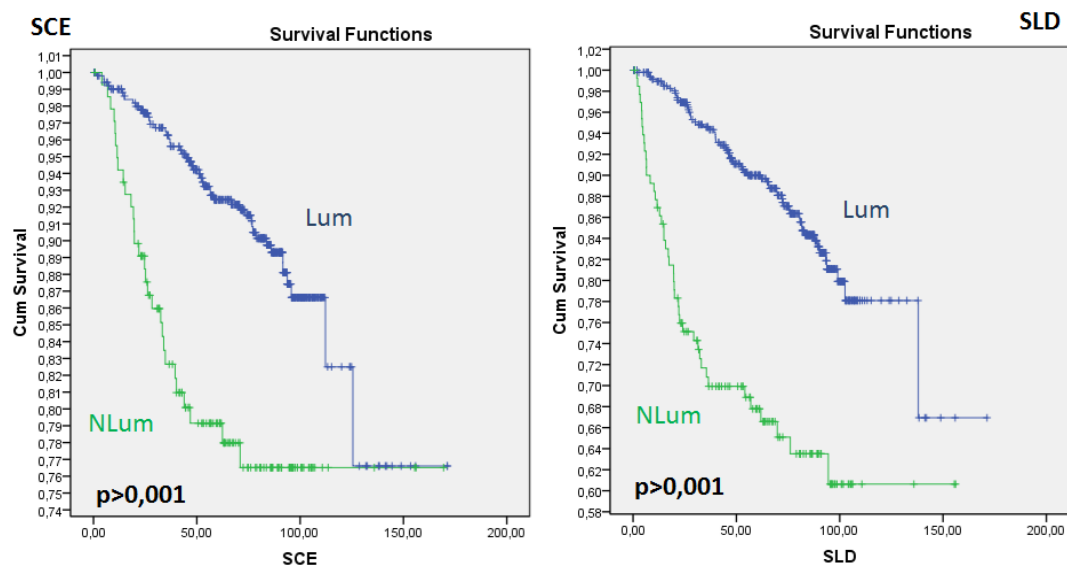


Figura 27 - Curvas de SCE e SLD comparando os grupos Luminais versus não-Luminais. Nas quais foram empregadas o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. Lum = Luminais e NLum = Não Luminais

Pode-se observar que os grupos são relacionados à SCE e SLD. Analisamos então como se comportavam os marcadores nesses grupos e obtivemos a relação descrita na Tabela 23.

Tabela 23 - Valores médios de células imunomarcadores nas categorias Luminais e Não-Luminais.

Marcador	<i>Luminal</i>		<i>Não-Luminal</i>		Valor de p
	Pacientes	Média	Pacientes	Média	
CD3	403	2,457	89	10,588	<0,0001
CD4	401	5,999	91	14,232	<0,0001
CD8	401	8,331	94	13,262	0,020
CD68	319	14,213	81	27,963	<0,0001
CD163	335	4,070	79	19,294	<0,0001
FOXP3	358	0,400	82	0,354	0,080
PAX5	383	1,781	86	4,523	0,186

Em negrito os valores que são estatisticamente significativos

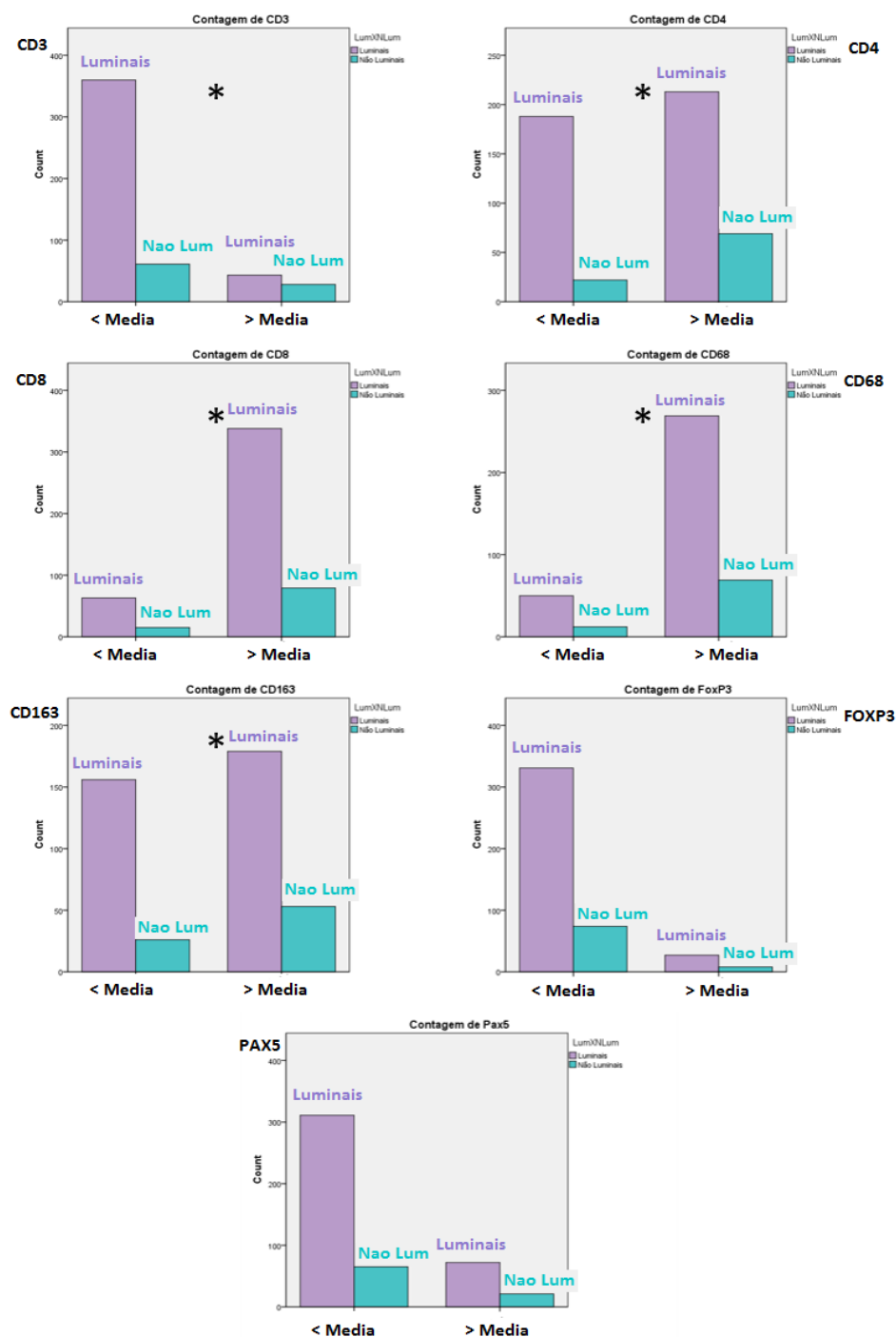


Figura 28 - Gráficos que mostram as diferenças de frequência dos marcadores acima e abaixo da média nos grupos Luminais e Não-Luminais. Em roxo temos os grupos Luminais e em Azul os Não luminais. E a esquerda a quantidade de células abaixo da média e a esquerda a quantidade de células acima da média. Com asterisco encontram-se os marcadores que se encontraram diferencialmente expressos nos grupos.

Ao avaliarmos a Figura 28 e a Tabela 23, conclui-se que uma maior concentração de células CD3, CD4, CD8, CD68 e CD163 positivas estão, proporcionalmente, mais presentes no grupo Não-Luminal, que é grupo de pior sobrevida nas nossas análises.

2. Grupo HER2 positivo X HER2 negativo

As amostras também foram comparadas com relação à expressão de HER2.

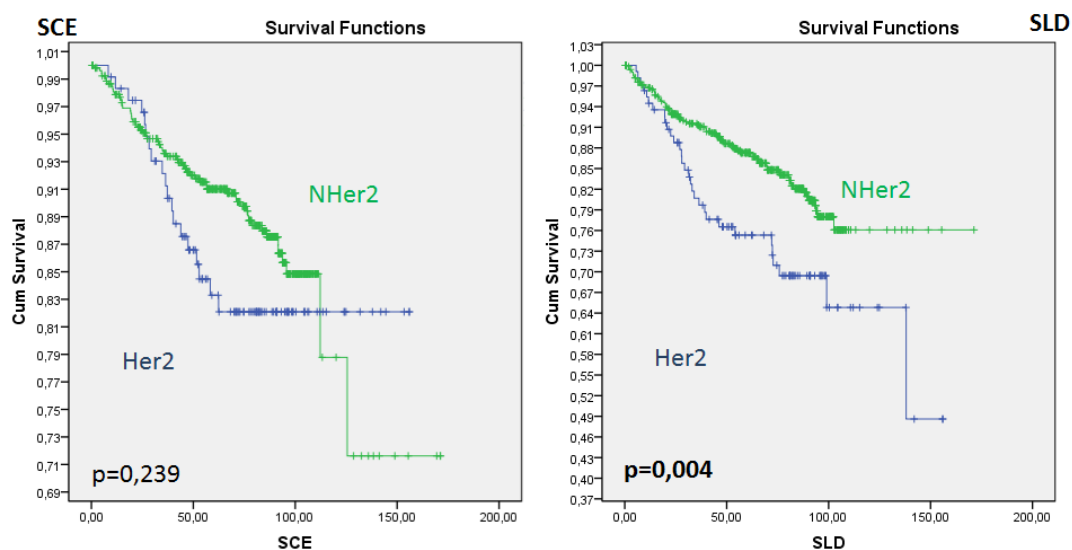


Figura 29 - Curvas das SCE e SLD comprando os grupos HER2 Positivo e HER2 negativo. Nas quais foram empregadas o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. HER2: HER2 positivos e NHER2: HER2 negativo

Pode-se observar que os grupos HER2 positivo e HER2 negativos não apresentam diferença com relação à SCE. O grupo HER2 positivo apresentou

pior SLD. Analisamos então como se comportavam os marcadores nesses grupos e obtivemos a relação descrita.

Tabela 24 - Comparação dos marcadores nos subtipos HER2 positivos e HER2 negativos.

Marcador	<i>HER2 Positivos</i>		<i>HER2 Negativos</i>		Valor de p
	Pacientes	Média	Pacientes	Média	
CD3	76	4,561	414	3,817	0,139
CD4	73	11,171	416	6,895	0,003
CD8	76	12,702	416	8,604	0,343
CD68	41	17,219	357	16,796	0,191
CD163	42	5,500	370	5,500	0,500
FOXP3	71	0,629	367	0,348	0,032
PAX5	73	2,840	394	2,161	0,038

Em negrito os valores que são estatisticamente significativos.

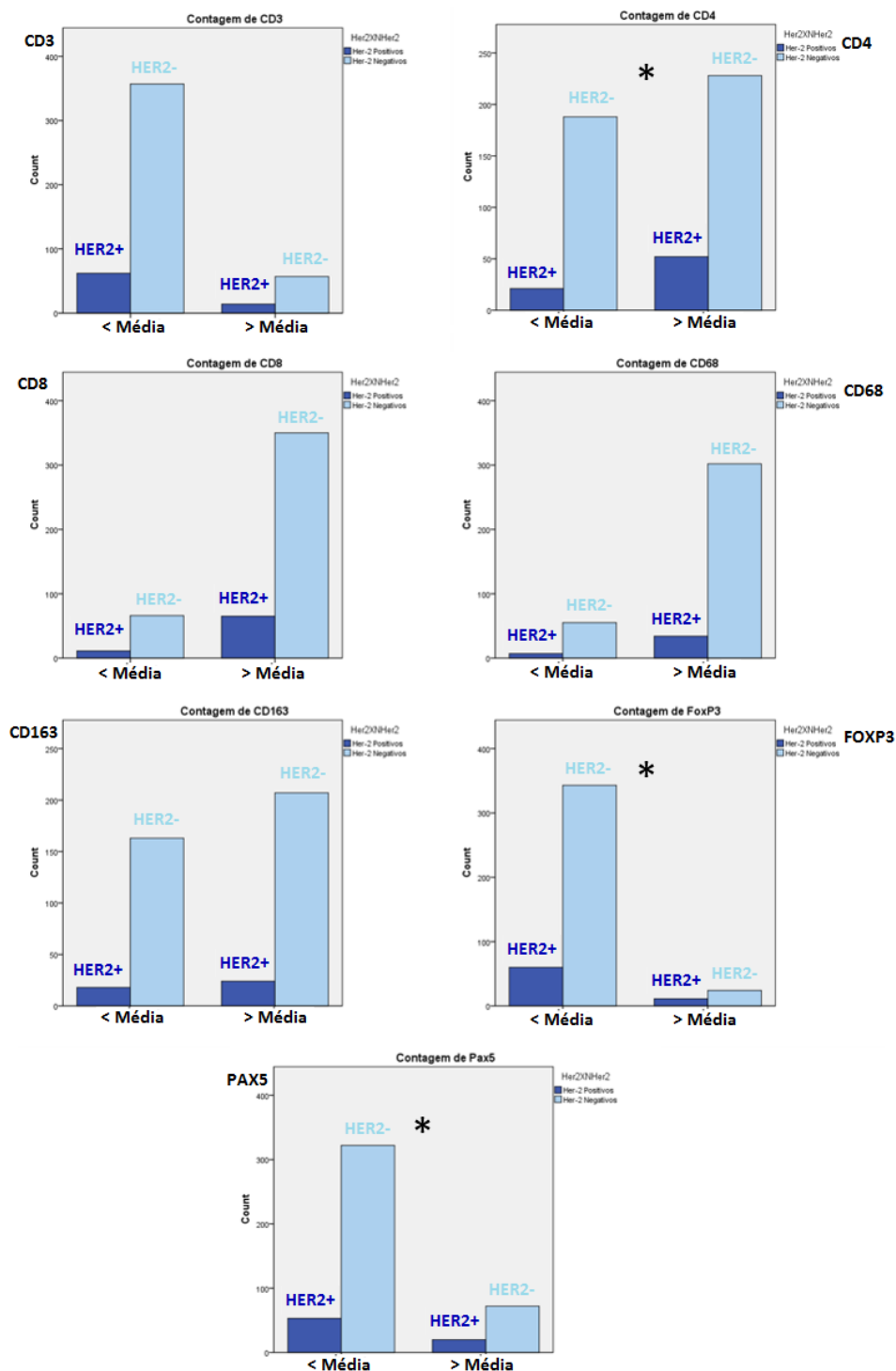


Figura 30 - Gráficos que mostram as diferenças de frequência dos marcadores acima e abaixo da média nos grupos HER2 positivos e HER2 negativos. Em azul escuro temos os grupos HER2+ e em azul claro os HER2-. E a esquerda a quantidade de células abaixo da média e a esquerda a quantidade de células acima da média. Com asterisco encontram-se os marcadores que se encontraram diferencialmente expressos nos dois grupos.

Ao avaliarmos a Tabela 24 e a Figura 29 podemos notar todos os marcadores possuem valores brutos mais altos nos casos HER2 negativos, mas apenas CD4, FOXP3 e PAX5 possuem uma diferença estatisticamente significativa.

Encontram-se, recorrentemente na literatura, associados a valores preditivos e prognósticos, a análise da combinação dos marcadores CD8 e FOXP3, na qual se criam dois grupos: um com CD8 alto e FOXP3 baixo e outro com CD8 baixo e FOXP3 alto. As análises de SCE e SLD desses grupos foi realizada e não foi possível obter um resultado estatisticamente significativo ao avaliarmos todos os subtipos ao mesmo tempo como demonstrado no Apêndice 11. Não realizamos a análise de cada subtipo raridade dos eventos.

4.3 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA E A IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para melhor visualização dos resultados de ambas as técnicas decidimos dividir as células inflamatórias em dois grandes grupos, o grupo linfocitário e o grupo mieloide.

4.3.1 Linhagem linfocitária

Ao analisarmos a linhagem linfocitária, avaliamos o perfil geral dos linfócitos, definidos na imagem como comum, além de quatro perfis da linhagem linfocitária, os linfócitos T auxiliares (CD4+), os linfócitos T

citotóxicos (CD8+), os linfócitos T regulatórios (FOXP3+) e os linfócitos B (CD20+).

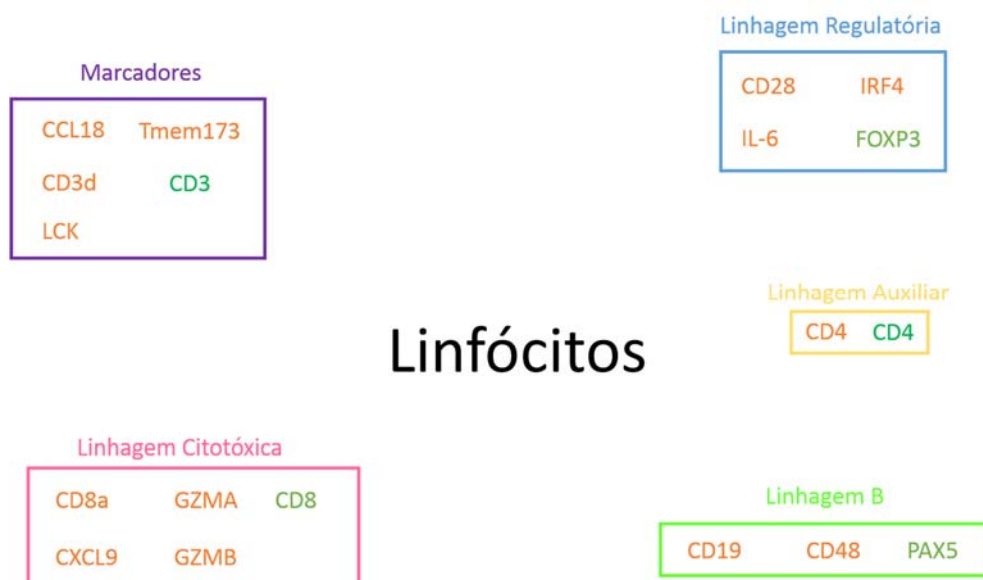


Figura 31 - Esquema de marcadores relacionados com os diferentes subtipos de linfócitos. De laranja estão às sondas diferencialmente expressas na análise da expressão genica. De verde temos os imunomarcadores usados para imuno-histoquímica. Apenas as sondas com diferença estatística estão representadas na figura.

Ao avaliarmos os linfócitos, duas populações se sobressaem nos resultados conjuntos, a citotóxica e a regulatória.

A linhagem de linfócitos citotóxica, CD8+, quando presente associa-se com um caráter protetor quando relacionada com SCE, mas ao se ter um infiltrado inflamatório maciço dessas células, com mais de 38 células marcadas, possui um perfil relacionado com a maior probabilidade de recorrência.

A linhagem de FOXP3+, de linfócitos T regulatório, quando presente esteve associada com uma melhor SLD estando associada com uma menor probabilidade de recorrência.

4.3.2 Linhagem Mieloide

Ao analisarmos a linhagem mieloide, avaliamos o perfil geral dos macrófagos, definidos na imagem como comum, além do perfil regulatório.



Figura 32 - Esquema de marcadores relacionados com as populações de macrófagos. De laranja estão às sondas diferencialmente expressas na análise da expressão genica. De verde temos os imunomarcadores usados para imuno-histoquímica. Apenas as sondas com diferença estatística estão representadas na figura.

O estudo avaliou os macrófagos com um pan-marcador, o CD68 e os de perfil M2, com o marcador CD163, e ambos foram relacionados com uma pior SLD estando associado com maior chance de recorrência.

5 DISCUSSÃO

A avaliação do infiltrado inflamatório nos tumores da mama não é parte da rotina diagnóstica, apesar dos estudos publicados ressaltando seu valor prognóstico e preditivo (RAVELLI et al. 2017). O não uso de caracterização do sistema inflamatório no microambiente tumoral é decorrente da falta de estudos com replicabilidade na rotina dos laboratórios de patologia (SAVAS et al. 2016; INGOLD-HEPPNER et al. 2016). Na literatura encontram-se vários trabalhos utilizando as diversas técnicas como: Hematoxilina Eosina, IHQ single e multiplex, imuno-fluorescência, citometria de fluxo e quantificação do RNAm, com resultados diferentes relacionados a valores preditivos e prognósticos, visto que as células imunes foram avaliadas como um agrupamento de células presentes na porção intratumoral ou no estroma, sendo possível caracteriza-las em diferentes conjuntos, utilizando um ou mais imunomarcadores, como CD3 para linfócitos, CD4, para LTA, CD8 para LTC, CD68 para macrófagos ou CD163 para macrófagos de perfil M2, dificultando assim a comparação entre as metodologias e estabelecimento daquela com melhor aplicabilidade. Pode-se, também, correlacionar às células imunes com um subtipo específico ou todos ao mesmo tempo, e mesmo os pontos de cortes usados na avaliação variam em praticamente todos os artigos, como é possível visualizar no Quadro 3 (DENKERT et al. 2016; MANI et al. 2016; BUISSET et al. 2016; SAFONOV et al. 2017). Esse trabalho visa demonstrar um método de avaliação do infiltrado inflamatório que seja

aplicável na clínica de forma simples, reprodutível, custo-efetivo e informativo. Todos os marcadores utilizados neste estudo mostraram excelente qualidade técnica nas reações e facilidade na interpretação e contagem das células inflamatórias.

A população usada no “RNAarray” é um pouco diferente da descrita na literatura, pois não possui a maioria dos casos classificados como SBR1 ou do subtipo Luminal A. Já a população usada para avaliação por IHQ, ainda que tenha sido proveniente de oito TMAs diferentes escolhidos para trabalhos distintos, com objetivos específicos, se fez muito parecida com a descrita na literatura. Segundo o SEER (2018), a porcentagem de pacientes sobreviventes em 5 anos é de 89,7% enquanto a porcentagem da população do estudo está em torno 88%. Apesar da idade mediana (54 anos) ser um pouco menor que a descrita (69 anos) e termos uma quantidade maior de casos da classificação SBR2 que o normal (superando a classificação de SBR1) (SEER), os outros dados estão de acordo com a literatura. Mesmo com as diferenças nas áreas avaliadas, sendo as células do “RNAarray” provenientes da região intratumoral e as da IHQ encontradas no estroma, os resultados puderam ser comparáveis visto que trabalhos anteriores avaliaram as regiões intratumoral e estromal e observaram que tanto macrófagos (GWAK et al. 2015) quanto os linfócitos (DENKERT et al. 2010) possuem uma ótima correlação entre as estas regiões.

Os linfócitos são, dentre todas as células do sistema imune, os mais estudados e associados com prognóstico e resposta a medicamentos. Usamos o marcador CD3 como um marcador geral de linfócitos, e ele não

mostrou qualquer associação com as sobrevida câncer específica e sobrevida livre de doença sendo coerente com outros dados da literatura (ALKATOUT et al. 2017; OKABE et al. 2017), embora haja um estudo de 2013 por RATHORE et al. que tenha associado o CD3 como um fator prognóstico protetor, na sobrevida livre de doença. A presença de células CD3 marcadas é mais frequente em tumores não luminais, tanto em nosso estudo, como na literatura (MAO et al. 2016; OKABE et al. 2017).

O linfócito T citotóxico é capaz de eliminar as células tumorais (XU et al. 2017; ZHANG HD et al. 2017; PRUNERI et al. 2018), e se mostrou relevante tanto na análise de expressão genica, quanto na de imuno-histoquímica no nosso estudo. Na expressão gênica, podemos notar que não apenas o marcador membranal está diferencialmente expresso (CD8a), como as enzimas relacionadas aos grânulos citotóxicos secretados e relacionados a sua capacidade de eliminar células (GZMA e GZMB), demonstrando que os linfócitos intratumorais ainda estão ativos, principalmente no grupamento não luminal. Ao analisá-los na IHQ, pelo marcador CD8, notamos que esses se encontram mais presentes nos subtipos não luminais, corroborando os resultados da expressão gênica. A presença deles se relaciona com a SCE, possuindo um caráter protetor, diminuindo as chances de óbito em torno de 50%, como descrito na maioria dos estudos encontrados na literatura (RATHORE et al. 2014; ALI et al. 2016; MAO et al. 2016; LU et al. 2017; OKABE et al. 2017; PRUNERI et al. 2018). Porém quando presente em quantidades maiores (média acima de 38 células imunomarcadas em 3 campos de grande aumento, 400x) o CD8 esteve relacionado com uma maior

probabilidade de metástase em nossas amostras, praticamente dobrando as chances de essas pacientes recorrerem. Esse resultado, talvez, possa ser explicado por um trabalho de DONGRE et al. (2017) publicado recentemente que diz que a transição epitélio-mesênquima (TEM), um dos fatores importantes para metástase, inibe as células CD8 positivas nos carcinomas mamários, então é possível que tais células estejam presentes mas inibidas e não exerçam seu papel protetor. O entendimento que ainda carece de validações seria que o sistema imune reconhece o tumor por meio dos seus neoantígenos é identificado pelas células CD8 positivas, que são recrutadas para o local, desativadas por efeitos da TEM e não eliminadas, justificando a presença em altas concentrações dessas células e sua associação com metástase.

Os linfócitos T CD4 positivos possuem diversas funções, sendo chamados de auxiliares por mediar diversas ativações no sistema imune. Na literatura, essas células estão mais presentes nos casos HER2 positivos na literatura (HEIMES et al. 2017; CHUNG et al. 2017), e associados à sobrevida global e sobrevida livre de doença, ambos, com caráter protetor. Na nossa casuística, também detectamos o enriquecimento no subtipo Her2 do câncer de mama, entretanto não foi possível associar as células CD4+ com desfechos favoráveis ou desfavoráveis para as pacientes.

Uma parcela dos LTH que é muito relacionado estudada e relacionada com a SCE é o de linfócitos T regulatórios que são capazes de silenciar a resposta imune antitumoral e associa-se com piores prognósticos. Nesse estudo, esse perfil foi analisado na IHQ pela marcação de FOXP3. No geral,

poucas células foram encontradas, sendo o subtipo TN aquele cuja média de células encontradas foi maior, conforme o descrito na literatura (GOODEN et al. 2011; ASANO et al. 2016; QIAN et al. 2017; ALKATOUT et al. 2017) Essas células foram relacionadas com a SLD, relacionando-se com um melhor prognóstico, independentemente de fatores prognósticos clássicos, como estadiamento clínico, SBR e subtipo molecular. As pacientes que não possuem essas células, tem o dobro da chance de terem uma recorrência. O papel dos linfócitos T regulatórios ainda é muito controverso no câncer de mama. Uma metanálise de 2011 relatou que na literatura o valor prognóstico das células T FOXP3 em 58 estudos variou de ruim ($n = 23$), neutro ($n = 23$), e bom ($n = 12$) (GOODEN et al. 2011). Os estudos mais recentes reforçam essa contradição do valor prognóstico das células FOXP3+ (QIAN et al. 2017; ALKATOUT et al. 2017).

As células PAX5 positivas (linfócitos B) estiveram mais presentes no subtipo TN no nosso estudo, mas sem associação com eventos adversos., A literatura também não demonstra associação dessas células com sobrevidas nos subtipos de CM.

A avaliação da linhagem mieloide esteve representada nas análises da expressão gênica pelas sondas direcionadas para os genes CD68, CD86, CD163 e genes codificadores do receptor IL-1RII e das citocinas IL-1 β e TGF- β . No estudo imuno-histoquímico, usamos os imunomarcadores CD68 e CD163, ambos de marcação citoplasmática. A marcação pelo anticorpo anti-CD68 engloba as duas principais populações de macrófagos: M1 associada com efeitos antitumorais e a M2 associada com efeitos pró-tumorais. A

população de macrófagos M2 é a mais encontrada nos carcinomas mamários, identificada pelo marcador CD163 (ZHANG B et al. 2017; YANG et al. 2017; TASHIREVA et al. 2017; ZHAO et al. 2017). Tanto as células CD68, quanto as CD163 foram mais encontradas no subtipo TN, como na literatura (SOUSA et al. 2015; ZHANG HB et al. 2017). Os dois marcadores se relacionaram com a SLD, sendo ambos associados com um pior prognóstico, conforme já descrito anteriormente na literatura (SOUSA et al. 2015; SHABO et al. 2015; XU et al. 2017; ZHANG HB et al. 2017; MORITA et al. 2017).

Nosso estudo traz uma contribuição original à literatura quanto ao valor prognóstico dessas células em cada subtipos moleculares de câncer de mama analisado separadamente. No subtipo Luminal A encontramos que a presença das células CD8, CD163, FOXP3 e PAX5 são todas associadas com menor sobrevida livre de doença, minimamente dobrando as chances de recorrência. As análises no subtipo Luminal B sugerem um papel protetor das células CD8 na sobrevida câncer específica. Já a presença das células CD68 e CD163 no subtipo Luminal B foram associadas com pior sobrevida câncer específica, quadruplicando as chances de óbito. No subtipo Triplo-Negativos foram as células CD3, CD4 e CD8 que se destacaram, todas associadas com uma melhor sobrevida câncer específica, diminuindo as chances de óbito em 80%. A associação entre CD8/FOXP3 e valores preditivos e prognósticos encontrada na literatura, não foi estatisticamente relevante nas nossas análises.

Apesar de todos os resultados que obtivemos com o trabalho, também vale ressaltar que outras metodologias, que conseguissem avaliar mais de um

imunomarcador ao mesmo tempo, como a citometria de fluxo ou mesmo a imuno-fluorescência, nos permitiriam uma melhor caracterização das células presentes nos subtipos tumorais e seus estados de ativação. As principais limitações do nosso estudo foram a avaliação do infiltrado inflamatório em regiões (intraepitelial e estromal) nos dois métodos utilizados, embora existam dados de não inferioridade entre a avaliação entre um ou outro compartimento (GWAK et al. 2015; DENKERT et al. 2016) Além disto, a escolha do TMA como material de análise, pode ser considerada um fator limitante para o estudo visto que as áreas selecionadas não abrangem o tumor como um todo e pode ser que algumas dessas áreas usadas na avaliação fossem mais enriquecidas ou desfavorecidas do parâmetro geral de inflamação do tumor. Contudo, este método reduziu amplamente o custo de reagentes e nos permitiu a análise de múltiplos marcadores em mais de 600 amostras com seguimento de longo prazo.

Ainda assim, o projeto permitiu ampliar a visão sobre um assunto ainda controverso e contribui para a transferência do conhecimento para a aplicabilidade clínica da avaliação do sistema inflamatório em tumores de mama. O estudo corrobora a literatura mais recente valoriza o microambiente tumoral para a predição do comportamento tumoral e propõe uma forma de avaliação aplicável em todos os laboratórios de patologia.

Os resultados do trabalho indicam a IHQ como o melhor método de quantificação do infiltrado inflamatório na rotina, focando principalmente nos marcadores de LTC (CD8), Tregs (FOXP3) e macrófagos (CD68 e CD163), já

técnica está disponível na grande maioria dos laboratórios e pode ser aplicada sem grande complexidade pelos patologistas.

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo conseguiu quantificar e identificar diferenças de várias subpopulações de células inflamatórias (Macrófagos em geral, Macrófagos M2, Linfócitos T em geral, Linfócitos T auxiliares, Linfócitos T citotóxicos, Linfócitos T regulatórios e Linfócitos B em geral, nos diversos subtipos moleculares do câncer de mama, tanto pela expressão gênica, quanto pela IHQ. Houve considerável sobreposição nos resultados obtidos com as duas metodologias apesar da avaliação e amostras e compartimentos tumorais diferentes, o que reflete uma interessante validação biológica. A imunohistoquímica apresentou uma qualidade técnica e facilidade para avaliação em casos individuais que a credenciam como método de escolha para a rotina diagnóstica.

No câncer de mama em geral a associação de células CD8 com um melhor prognóstico na SCE, porém a presença abundante de células CD8 se relacionou com pior prognóstico na SLD. Ainda com relação a SLD, as células FOXP3 são associadas a um melhor prognóstico enquanto a presença de CD68 e CD163 estão associados a um pior prognóstico. O subtipo TN é o que possui a maior intensidade do infiltrado inflamatório como um todo e também de todas as células analisadas, enquanto o de menor intensidade é o subtipo LA.

O subtipo LA é o que possui menor quantidade de células inflamatórias, estando a presença de células PAX5, CD8 e CD163 associadas a um pior

prognóstico na análise univariada, com risco relativo até 7 vezes maior para o marcador CD163. O subtipo LB teve a presença de CD8 associadas a um melhor prognóstico na SCE e a presença de CD68 e CD163 estão associados a um pior prognóstico na SCE na análise univariada, com risco relativo até 4 vezes maior para o marcador CD68. Já o subtipo TN é o mais enriquecido de células inflamatórias e as subpopulações de células CD3, CD4 e CD8 mostraram associação com um pior prognóstico na SCE na análise univariada, com risco relativo de óbito pela doença até 9 vezes maior para o marcador CD4.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Maturação de linfócitos e expressão dos genes de receptores; p125-60.

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.

Algars A, Irjala H, Vaittinen S, et al. Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients. **Int J Cancer** 2012; 131:864-73.

Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. **Ann Oncol** 2014; 25:1536-43.

Alkatout I, Hübner F, Wenners A, et al. In situ localization of tumor cells associated with the epithelial-mesenchymal transition marker Snail and the prognostic impact of lymphocytes in the tumor microenvironment in invasive ductal breast cancer. **Exp Mol Pathol** 2017; 102:268-275.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. **Manual de imuno-histoquímica da Sociedade Brasileira de Patologia**. São Paulo, 1999. cap.3; p.23-9.

Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, et al. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. **Br J Surg** 2016; 103:845-54.

Baker K, Lachapelle J, Zlobec I, Bismar TA, Terracciano L, Foulkes WD. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. **Histopathology** 2011; 58:1107-16.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell** 2005; 7:211-7.

Barber GN. STING: infection, inflammation and cancer. **Nat Rev Immunol** 2015; 15:760-70.

Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. **J Clin Oncol** 2006; 24:5373-80.

Bauman TM, Becka AJ, Sehgal PD, Huang W, Ricke WA. SIGIRR/TIR8, an important regulator of TLR4 and IL-1R-mediated NF- κ B activation, predicts biochemical recurrence after prostatectomy in low-grade prostate carcinomas. **Hum Pathol** 2015; 46:1744-51.

Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, et al. Tumor specific cytotoxicity by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Cancer** 1994; 74:1275-82.

Bedoui S, Heath WR, Mueller SN. CD4(+) T-cell help amplifies innate signals for primary CD8(+) T-cell immunity. **Immunol Rev** 2016; 272:52-64.

Bhan AK, DesMarais CL. Immunohistologic characterization of major histocompatibility antigens and inflammatory cellular infiltrate in human breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1983; 71:507-16.

Bhatelia K, Singh K, Singh R. TLRs: linking inflammation and breast cancer. **Cell Signal** 2014; 26:2350-7.

Bidwell BN, Slaney CY, Withana NP, et al. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. **Nat Med** 2012; 18:1224-31.

Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. **Immunity** 2013; 39:782-95

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J Pathol** 2002; 196:254-65.

Boehm T. Design principles of adaptive immune systems. **Nat Rev Immunol** 2011; 11:307-17.

Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. **Biomaterials** 2009; 30:1482-91.

Brown JR, Wimberly H, Lannin DR, Nixon C, Rimm DL, Bossuyt V. Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2014; 20:5995-6005.

Bui VC, Nguyen TH. The role of CD4 on mechanical properties of live cell membrane. **J Biomed Mater Res A** 2016; 104:239-44.

Buisseret L, Garaud S, de Wind A, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. **Oncoimmunology** 2016; 6:e1257452.

Burnet FM. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. **Br Med J** 1957; 1:779-86.

Cao Y, Feng Y, Zhang Y, Zhu X, Jin F. L-Arginine supplementation inhibits the growth of breast cancer by enhancing innate and adaptive immune responses mediated by suppression of MDSCs in vivo. **BMC Cancer** 2016; 16:343.

Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer** 1989; 63:181-7.

Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunol Immunother** 2011; 60:319-26.

Charbonneau B, Moysich KB, Kalli KR, et al. Large-scale evaluation of common variation in regulatory T cell-related genes and ovarian cancer outcome. **Cancer Immunol Res** 2014; 2:332-40.

Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. **Nature** 2017; 541:321-30.

Chung YR, Kim HJ, Jang MH, Park SY. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocyte subsets in breast cancer depends on hormone receptor status. **Breast Cancer Res Treat** 2017; 161:409-20.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell** 2006; 124:263-6.

Corliss BA, Azimi MS, Munson JM, Peirce SM, Murfee WL. Macrophages: an inflammatory link between angiogenesis and lymphangiogenesis. **Microcirculation** 2016; 23:95-121.

Coronella JA, Spier C, Welch M, et al. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. **J Immunol** 2002; 169:1829-36.

Coussens LM, Pollard JW. Leukocytes in mammary development and cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2011; 3:a003285.

Coventry BJ, Lee PL, Gibbs D, Hart DN. Dendritic cell density and activation status in human breast cancer -- CD1a, CMRF-44, CMRF-56 and CD-83 expression. **Br J Cancer** 2002; 86:546-51.

Cox DR. Regression models and life-tables. **J Royal Statist Soc Series B (Methodological)** 1972; 34:187-220.

Criscitiello C. Tumor-associated antigens in breast cancer. **Breast Care (Basel)** 2012; 7:262-6.

DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Res** 2007; 9:212.

DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell** 2009; 16:91-102.

DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discov** 2011; 1:54-67.

Denkert C, Loibl S, Noske A et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:105-13.

Denkert C. Diagnostic and therapeutic implications of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **J Clin Oncol** 2013; 7:836-7.

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.

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. **Immunity** 1994; 1:447-56.

Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. **Cancer Res** 2010; 70:7465-75.

Dongre A, Rashidian M, Reinhardt F, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition contributes to immunosuppression in breast carcinomas. **Cancer Res** 2017; 77:3982-89.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity** 2004; 21:137-48.

Donnarumma T, Young GR, Merkenschlager J, et al. Opposing Development of Cytotoxic and Follicular Helper CD4 T Cells Controlled by the TCF-1-Bcl6 Nexus. **Cell Rep** 2016; 17:1571-83.

Dyck L, Mills KHG. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. **Eur J Immunol** 2017; 47:765-779.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, McGale P, Taylor C. Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. **Lancet** 2014; 383:2127-35.

Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie AN. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. **Science** 2015; 348:65-66.

Eberl G. Immunity by equilibrium. **Nat Rev Immunol** 2016; 16:524-32.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1471-4.

Eiró N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, et al. Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. **PLoS One** 2012; 7:e52796.

Emens LA. Breast cancer immunotherapy: facts and hopes. **Clin Cancer Res** 2018; 24:511-20.

Faé KC, Palacios SA, Nogueira LG, et al. CXCL9/Mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. **Inflammation** 2013; 36:800-11.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. **GLOBOCAN 2012 v1,0**, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase n° 11. 2013. <<http://globocan.iarc.fr>>. [2017 fev 29].

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124:966-78.

Fraenkel PG. Anemia of Inflammation: a review. **Med Clin North Am** 2017; 101:285-96.

Fridman WH, Galon J, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. **Cancer Res** 2011; 71:5601-5.

Fu H, Wang A, Mauro C, Marelli-Berg F. T lymphocyte trafficking: molecules and mechanisms. **Front Biosci** 2013; 18:422-40.

Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. **Clin Cancer Res** 1997; 3:483-90.

Gatza ML, Lucas JE, Barry WT, et al. A pathway-based classification of human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:6994-9.

Gautier EL, Shay T, Miller J, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. **Nat Immunol** 2012; 13:1118-28.

Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. **Nat Med** 2015; 21:938-45.

Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. **Science** 2001; 294:605-9.

Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:290-303.

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

Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. **Biometrika** 1994; 81:515-26.

Gwak JM, Jang MH, Kim DI, Seo AN, Park SY. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. **PLoS One** 2015; 17:10.

Haibe-Kains B, Desmedt C, Piette F. Comparison of prognostic gene expression signatures for breast cancer. **BMC Genomics** 2008; 9:394.

Hamaker ME, Bastiaannet E, Evers D, et al. Omission of surgery in elderly patients with early stage breast cancer. **Eur J Cancer** 2013; 49:545-52.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28: 2784-95.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Havenar-Daughton C, Lindqvist M, Heit A, Wu JE, et al. CXCL13 is a plasma biomarker of germinal center activity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2016; 113:2702-7.

Heimes AS, Madjar K, Edlund K, et al. Subtype-specific prognostic impact of different immune signatures in node-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2017; 165:293-300.

Hodson LJ, Chua AC, Evdokiou A, Robertson SA, Ingman WV. Macrophage phenotype in the mammary gland fluctuates over the course of the estrous cycle and is regulated by ovarian steroid hormones. **Biol Reprod** 2013; 89:65.

Hornychova H, Melichar B, Tomsova M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast carcinoma. **Cancer Invest** 2008; 26:1024-31.

Hurlimann J, Saraga P. Mononuclear cells infiltrating human mammary carcinomas: immunohistochemical analysis with monoclonal antibodies. **Int J Cancer** 1985; 35:753-62.

Ingold-Heppner B, Loibl S, Denkert C. Tumor-infiltrating lymphocytes: a promising biomarker in breast cancer. **Breast Care (Basel)** 2016; 11:96-100.

Issa-Nummer Y, Darb-Esfahani S, Loibl S, et al. Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. **PLoS One** 2013; 8:e79775.

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annu Rev Immunol** 2012; 30:531-64.

Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:7556-61.

Katz A, Smith BL, Golshan M, et al. Nomogram for the prediction of having four or more involved nodes for sentinel lymph node-positive breast cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:2093-8.

Khalid A, Wolfram J, Ferrari I, et al. Recent advances in discovering the role of CCL5 in metastatic breast cancer. **Mini Rev Med Chem** 2015; 15:1063-72.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology** 2007; 121:1-14.

Kim SR, Paik S. Genomics of adjuvant therapy for breast cancer. **Cancer J** 2011; 17:500-4.

Kis-Toth K, Tsokos GC. Engagement of SLAMF2/CD48 prolongs the time frame of effective T cell activation by supporting mature dendritic cell survival. **J Immunol** 2014; 192:4436-42.

Komohara Y, Niino D, Ohnishi K, Ohshima K, Takeya M. Role of tumor-associated macrophages in hematological malignancies. **Pathol Int** 2015; 65:170-6.

Kuang DM, Zhao Q, Peng C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. **J Exp Med** 2009; 206:1327-37.

Kumar S, Skeen MJ, Adiri Y, et al. A cytokine promoter/yellow fluorescent protein reporter transgene serves as an early activation marker of lymphocyte subsets. **Cell Immunol** 2005; 237:131-40.

Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.

Lee HJ, Seo JY, Ahn JH, Ahn SH, Gong G. Tumor-associated lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **J Breast Cancer** 2013; 16:32-9.

Lee YT, Sheikh KM, Quismorio FP Jr, Friou GJ. Circulating anti-tumor and autoantibodies in breast carcinoma: relationship to stage and prognosis. **Breast Cancer Res Treat** 1985; 6:57-65.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res** 1996; 56:4625-9.

Lin L, Chen YS, Yao YD, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. **Oncotarget** 2015; 6:34758-73.

Liu S, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R48.

Lohela M, Casbon AJ, Olow A et al. Intravital imaging reveals distinct responses of depleting dynamic tumor-associated macrophage and dendritic cell subpopulations. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2014; 111:E5086-95.

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** 2012; 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.

Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. **J Clin Invest** 2011; 121:4015-29.

Maccalli C, Parmiani G, Ferrone S. Immunomodulating and immunoresistance properties of cancer-initiating cells: implications for the clinical success of immunotherapy. **Immunol Invest** 2017; 46:221-38.

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

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

Mani NL, Schalper KA, Hatzis C, et al. Quantitative assessment of the spatial heterogeneity of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Breast Cancer Res** 2016; 18:78.

Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol** 2010; 22:231-7.

Mao Y, Qu Q, Chen X, et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2016; 11:e0152500

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep** 2014; 6:13.

Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathog Glob Health** 2016; 110:247-60.

McDermott RS, Beuvon F, Pauly M, et al. Tumor antigens and antigen-presenting capacity in breast cancer. **Pathobiology** 2002-2003; 70:324-32.

Milani A, Sangiolo D, Aglietta M, Valabrega G. Recent advances in the development of breast cancer vaccines. **Breast Cancer** (Dove Med Press) 2014; 6:159-68.

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

Mohme M, Riethdorf S, Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape. **Nat Rev Clin Oncol** 2017; 14:155-67.

Morbach H, Schickel JN, Cunningham-Rundles C, et al. CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells. **J Allergy Clin Immunol** 2016; 137:889-98.

Morita Y, Zhang R, Leslie M, et al. Pathologic evaluation of tumor-associated macrophage density and vessel inflammation in invasive breast carcinomas. **Oncol Lett** 2017; 14:2111-8.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol** 2008; 8:958-69.

Muggerud AA, Hallett M, Johnsen H, et al. Molecular diversity in ductal carcinoma in situ (DCIS) and early invasive breast cancer. **Mol Oncol** 2010; 4:357-68.

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

Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. **Nat Rev Immunol** 2002; 2:933-44.

Murri AM, Hilmy M, Bell J, et al. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. **Br J Cancer** 2008; 99:1013-9.

Nabholtz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. **Ann Oncol** 2014; 25:1570-7.

Namura M, Tsunoda H, Yagata H, et al. Discrepancies between pathological tumor responses and estimations of complete response by magnetic resonance imaging after neoadjuvant chemotherapy differ by breast cancer subtype. **Clin Breast Cancer** 2018; 18:128-34.

Narod SA. Tumour size predicts long-term survival among women with lymph nodepositive breast cancer. **Curr Oncol** 2012; 19:249-53.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Breast cancer (version 1, 2017)**. Available from: <URL:<https://bit.ly/1UnB3vL>>. [2017 nov 16].

Nedergaard BS, Nielsen K, Nyengaard JR, et al. Stereologic estimation of the total numbers, the composition and the anatomic distribution of lymphocytes in cone biopsies from patients with stage I squamous cell carcinoma of the cervix uteri. **APMIS** 2007; 115:1321-30.

Newman LA. Epidemiology of locally advanced breast cancer. **Semin Radiat Oncol** 2009; 19:195-203.

Noreen M, Arshad M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. **Immunol Res** 2015; 62:234-52.

Novak ML, Koh TJ, Macrophage phenotypes during tissue repair. **J Leukoc Biol** 2013; 93:875-81.

Oda N, Shimazu K, Naoi Y et al. Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5- FU/epirubicin/ cyclophosphamide in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 136:107-16.

Okabe M, Toh U, Iwakuma N, et al. Predictive factors of the tumor immunological microenvironment for long-term follow-up in early stage breast cancer. **Cancer Sci** 2017; 108:81-90.

Papaevangelou E, Whitley GS, Johnstone AP, Robinson SP, Howe FA. Investigating the role of tumour cell derived iNOS on tumour growth and vasculature in vivo using a tetracycline regulated expression system. **Int J Cancer** 2016; 138:2678-87.

Park JE, Lee JA, Park SG, et al. A critical step for JNK activation: isomerization by the prolyl isomerase Pin1. **Cell Death Differ** 2012; 19:153-61.

Perl M, Denk S, Kalbitz M, Huber-Lang M. Granzyme B: a new crossroad of complement and apoptosis. **Adv Exp Med Biol** 2012; 946:135-46.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 17:747-52.

Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. **J Allergy Clin Immunol** 2013; 131:959-71.

Pinilla-Fernández MG. **Avaliação da expressão de genes codificadores e não codificadores em células epiteliais do carcinoma ductal invasivo de mama de pacientes com e sem linfonodo acometido**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Pradeu T, Jaeger S, Vivier E. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? **Nat Rev Immunol** 2013; 13:764-9.

Pruneri G, Vingiani A, Denkert C. Tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. **Breast** 2018; 37:207-14.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell** 2010; 141:39-51.

Qian F, Qingping Y, Linqun W, et al. High tumor-infiltrating FoxP3(+) T cells predict poor survival in estrogen receptor-positive breast cancer: a meta-analysis. **Eur J Surg Oncol** 2017; 43:1258-64.

Rathore AS, Kumar S, Konwar R, et al. Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast. **Indian J Cancer** 2013; 50:239-44.

Ravelli A, Roviello G, Cretella D, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: beyond the prognostic and predictive utility. **Tumour Biol** 2017; 39:4.

Reed JR, Schwertfeger KL. Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2010; 15:329-39.

Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: a multifunctional cytokine in viral infections. **J Immunol Res** 2017; 2017:6104054.

Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. **Cell** 2015; 160:48-61.

Rostam HM, Reynolds PM, Alexander MR, Gadegaard N, Ghaemmaghami AM. Image based Machine Learning for identification of macrophage subsets. **Sci Rep** 2017; 7:3521.

Rowe DJ, Beverley PC. Characterisation of breast cancer infiltrates using monoclonal antibodies to human leucocyte antigens. **Br J Cancer** 1984; 49:149-59.

Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. **Cancer Cell** 2014; 26:623-37.

Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. **Cancer Cell** 2015; 27:462-72.

Safonov A, Jiang T, Bianchini G, et al. Immune gene expression is associated with genomic aberrations in breast cancer. **Cancer Res** 2017; 77:3317-24.

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

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.

Scanlan MJ, Jäger D. Challenges to the development of antigen-specific breast cancer vaccines. **Breast Cancer Res** 2001; 3:95-8.

Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D et al. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2014; 20:2773-82.

Schiffman SC, McMasters KM, Scoggins CR, Martin RC, Chagpar AB. Lymph node ratio: a proposed refinement of current axillary staging in breast cancer patients. **J Am Coll Surg** 2011; 213:45-52.

Schmidt M, Böhm D, von Törne C, et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. **Cancer Res** 2008; 68:5405-13.

Schmidt M, Hellwig B, Hammad S, et al. A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin κ C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. **Clin Cancer Res** 2012; 18:2695-703.

Schoenfeld D. Partial residuals for the proportional hazards regression model. **Biometrika** 1982; 69:239-41.

Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. **Science** 2015; 348:69-74.

Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. **Nat Rev Immunol** 2008; 8:247-58.

[SEER] Surveillance Epidemiology, and End Results Program. **Cancer stat facts: female breast cancer**. Available from: URL:<https://bit.ly/2iGolHA> [2018 nov 26].

Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. **Br J Cancer** 2013; 109:2705-13.

Sha Y, Markovic-Plese S. A role of IL-1R1 signaling in the differentiation of Th17 cells and the development of autoimmune diseases. **Self Nonself** 2011; 2:35-42.

Shabo I, Midtbö K, Andersson H, et al. Macrophage traits in cancer cells are induced by macrophage-cancer cell fusion and cannot be explained by cellular interaction. **BMC Cancer** 2015; 20:15:922.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature** 2001; 410:1107-11.

Sharma P, Kranz DM. Recent advances in T-cell engineering for use in immunotherapy. **F1000Res** 2016; 5:2344.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J Clin Invest** 2012; 122:787-95.

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. **J Exp Med** 2000; 192:755-60.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. [tradução de A L M Eisenberg]. 7ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012. Tumores da mama; p.187-200.

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

Stewart TH, Heppner GH. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology** 1997; 115 Suppl:S141-53.

Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. **J Exp Med** 2002; 196:129-34.

Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer immunology and immunotherapy. **Anticancer Res** 2016; 36:5593-606.

Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. **J Clin Invest** 2007; 117:1137-46.

Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? **Pathol Int** 2016; 66:491-505.

Tashireva LA, Denisov EV, Gerashchenko TS, et al. Intratumoral heterogeneity of macrophages and fibroblasts in breast cancer is associated with the morphological diversity of tumor cells and contributes to lymph node metastasis. **Immunobiology** 2017; 222:631-40.

Taylor RL, Cruickshank MN, Karimi M, et al. Focused transcription from the human CR2/CD21 core promoter is regulated by synergistic activity of TATA and Initiator elements in mature B cells. **Cell Mol Immunol** 2016; 13:119-31.

Tevaarwerk AJ, Wang M, Zhao F, et al. Phase III comparison of tamoxifen versus tamoxifen plus ovarian function suppression in premenopausal women with node-negative, hormone receptor-positive breast cancer (E-3193, INT-0142): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. **J Clin Oncol** 2014; 32:3948-58.

Tian R, Wang H, Gish GD, Petsalaki E, et al. Combinatorial proteomic analysis of intercellular signaling applied to the CD28 T-cell costimulatory receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2015; 112:E1594-603.

Tian S, Chen SY. Macrophage polarization in kidney diseases. **Macrophage** 2015; 2:1.

Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol** 2016; 12:472-85.

Untch M, Gerber B, Harbeck N, et al. 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a German team of experts (zurich 2013). **Breast Care (Basel)** 2013; 8:221-9.

van Damme P, Maurer-Stroh S, Hao H, et al. The substrate specificity profile of human granzyme A. **Biol Chem** 2010; 391:983-97.

Varn FS, Andrews EH, Mullins DW, Cheng C. Integrative analysis of breast cancer reveals prognostic haematopoietic activity and patient-specific immune response profiles. **Nat Commun** 2016; 7:10248.

Vauchy C, Gamonet C, Ferrand C, et al. CD20 alternative splicing isoform generates immunogenic CD4 helper T epitopes. **Int J Cancer** 2015; 137:116-26.

Ventimiglia LN, Alonso MA. The role of membrane rafts in Lck transport, regulation and signalling in T-cells. **Biochem J** 2013; 454:169-79.

Xu J, Ni C, Ma C, et al. Association of neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio with ER and PR in breast cancer patients and their changes after neoadjuvant chemotherapy. **Clin Transl Oncol** 2017; 19:989-96.

Wang L, Yao ZQ, Moorman JP, Xu Y, Ning S. Gene expression profiling identifies IRF4-associated molecular signatures in hematological malignancies. **PLoS One** 2014; 9:e106788.

Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **Lancet Oncol** 2010; 11:339-49.

West NR, Milne K, Truong PT, Macpherson N, Nelson BH, Watson PH. Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. **Breast Cancer Res** 2011; 13:R126.

[WHO] World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data. **World Health Statistics 2012**. Geneva: 2012. Available from: <URL:<https://bit.ly/2UMTT3f>> [2018 jan 12]

Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R65.

Yamaguchi R, Tanaka M, Yano A, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. **Hum Pathol** 2012; 43:1688-94.

Yang QL, Zhang LY, Wang HF, et al. The N-terminal polypeptide derived from viral macrophage inflammatory protein II reverses breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition via a PDGFR α -dependent mechanism. **Oncotarget** 2017; 8:37448-63.

Yuan J, Gnjatic S, Li H, et al. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:20410-5.

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

Zhang HD, Jiang LH, Sun DW, Li J, Tang JH. miR-30a inhibits the biological function of breast cancer cells by targeting Notch1. **Int J Mol Med** 2017; 31.

Zhang J, Xu Z, Zhou X, et al. Loss of expression of MHC class I-related chain A (MICA) is a frequent event and predicts poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:3123-31.

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

Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood** 2008; 112:1557-69.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations.
Annu Rev Immunol 2010; 28:445-89.

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



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 29 de maio de 2015.

Ao

Dr. Victor Piana de Andrade

Aluna: Mayara Caroline Silva Botelho (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2024/15

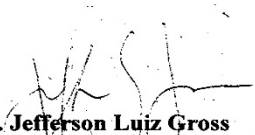
“Caracterização imunofenotípica do infiltrado inflamatório e sua associação com fatores prognósticos e preditivos clássicos nos diferentes subtipos moleculares do carcinoma mamário”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 26/05/2015, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 24/03/2015, aprovaram a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Mama;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Infraestrutura do Departamento de Núcleo de Anatomia Patológica;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

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

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Tabela de classificação dos carcinomas mamários segundo o TNM de acordo com o preconizado pelo AJCC de 2010.

Tumor Primário (T)	
Tis	Carcinoma intraductal, lobular <i>in situ</i>
T1	Tumor menor ou igual a 2cm em sua maior dimensão
T1a	Tumor até 0,5cm
T1b	Tumor de 0,6 a 1cm
T1c	Tumor de 1,1 a 2cm
T2	Tumor de 2,1 a 5cm
T3	Tumor maior que 5cm
T4	Tumor de qualquer diâmetro com invasão direta da pele ou caixa torácica
T4a	Extensão à parede torácica
T4b	Edema ou ulceração de pele da mama ou nódulos cutâneos satélites restritos a própria mama
T4c	Associação de T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório
Linfonodos (N)	
Nx	Os linfonodos não podem ser avaliados (remoção previa)
N0	Ausência de metástase para linfonodo
N1	Acometimento de linfonodos axilares ipsilaterais móveis
N1mic	Acometimento microscópico de linfonodos axilares ipsilaterais móveis
N2	Acometimento de linfonodos axilares ipsilaterais fixos
N3	Acometimento de linfonodos da cadeia mamária interna ipsilateral
Metástases (M)	
M0	Sem metástase
M1	Metástase a distância

Anexo 3 - Tabela de classificação do estadiamento do paciente Segundo o AJCC de 2010.

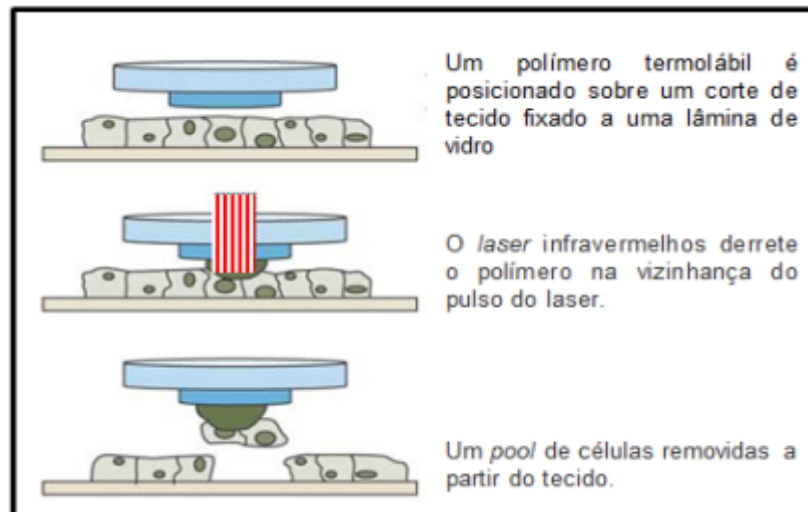
Classificação do estadiamento do paciente segundo o TNM preconizado pela AJCC de 2010. qq= qualquer classificação.

Estadiamento	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mic	M0
	T1	N1mic	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	qq	N3	M0
IV	qq	qq	M1

Anexo 4 – Detalhamento da metodologia usada pela Dra. Pinilla-Fernández para análise dos perfis de expressão gênica no câncer de mama por ocasião da sua dissertação de doutorado na Fundação Antonio Prudente. (ano: ____). EXTRAÍDO dos originais.

Microdissecção a laser das células epiteliais de CDI

Com a intenção de estudar exclusivamente o componente epitelial do CDI, utilizamos a metodologia de microdissecção a laser com o equipamento Pixcell II LCM (Arcturus Engineering, Mountain View, CA, USA), o qual pertence ao Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. Esse sistema consiste basicamente de um microscópio invertido, ao qual é acoplada uma fonte de raio laser infravermelho de baixa potência e uma câmera ligada a um monitor e um computador (ESPINA et al. 2006). A lâmina com o corte histológico, previamente corado, é fixada ao chariot por um mecanismo de sucção a vácuo. O feixe de raio laser incide sobre uma base de captura, ou CapSure HS™ Arcturus®, revestido por um filme termoplástico. O CapSure HS fica posicionado entre o feixe de laser e o corte histológico. Com o disparo do feixe de laser, o filme termoplástico expande e a célula escolhida adere. Quando o pulso cessa, o filme retrai levando consigo a célula aderida à superfície do CapSure. Dessa forma, repete-se a operação quantas vezes forem necessárias. A quantidade de células necessárias varia de acordo com o tipo de tecido e com o estudo que será realizado.



Fonte: Modificado de ESPINA et al. (2006).

Figura 1 - Representação esquemática do procedimento microdissecção a laser.

Cada amostra foi cortada utilizando um criostato graduado para obter cortes de 10 μ m; esses cortes foram depositados em uma lâmina carregada eletrostaticamente e armazenados em freezer -80°C até o momento da microdissecção. As amostras foram mantidas congeladas com ajuda de gelo seco e descongeladas 30 segundos antes da coloração para início do processo de microdissecção; em seguida, foram coradas uma a uma com Hematoxilina e imediatamente microdissecadas a laser, capturando exclusivamente às células epiteliais neoplásicas (ver “Figura 2”) num CapSure HS™ Arcturus®, usando feixe de laser com diâmetro de 7,5 μ m e um tempo de captura máximo de 10 minutos.



Figura 2 - Representação de uma amostra microdissecada a laser. As fotografias representam uma típica microdissecção a laser de células epiteliais, nas quais é possível observar a captura das células desejadas. A) Tecido antes da microdissecção; B) Tecido após a microdissecção; C) CapSure com as células capturadas.

Extração e amplificação do RNA das células microdissecadas a laser

Imediatamente após a captura das células epiteliais no CapSure HS™ utilizando o kit Pico Pure RNA isolation™ Arcturus®, o RNA total foi extraído segundo o protocolo do fabricante. Foi acoplado o anel de extração ao CapSure e adicionado o extraction Buffer (XB), incubando a 42°C extraíndo o RNA, o qual foi imediatamente congelado e mantido em gelo seco por um tempo máximo de 2 horas. O RNA foi purificado segundo o protocolo do fabricante, tratado com DNase I para remoção do DNA genômico contaminante e eluído em 15µL de Elution Buffer. Uma alíquota de 1,5µL foi separada para avaliação da qualidade do RNA extraído e o restante (13,5µL) foi concentrado até 4,15µL. Mediante o uso de uma centrífuga a vácuo (Centrivap Labconco).

Avaliação da Qualidade e Integridade do RNA Total

A qualidade do RNA total foi analisada utilizando o equipamento Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies), o qual realiza uma eletroforese capilar de alta tensão. O software do equipamento calcula a proporção entre as bandas ribossomais 18S e 28S para amostras eucarióticas. É construído

um eletroferograma e calculado um número de integridade do RNA (RIN-RNA Integrity Number) que varia de 0 a 10. Um exemplo da qualidade do RNA total extraído das amostras microdissecadas a laser está representado na “Figura 3”. Devido à baixa quantidade de RNA obtido de células capturas Mediante microdissecção a laser, foi utilizado o RNA 6000 Pico LabChip Kit, que permite uso de amostras com quantidade extremamente pequenas de RNA (de 200pg a 5ng).

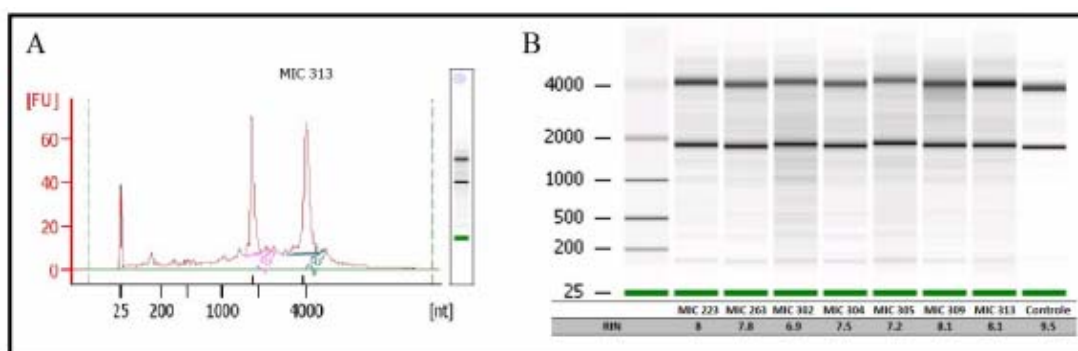


Figura 3 - Perfil analítico de RNA total por eletroforese Capilar (Bioanalyser 2100, Agilent Technologies). O painel apresenta o eletroferograma obtido a partir de 1µl de RNA total, tratado com DNasa, não quantificado. A: Gráfico do eletroferograma mostrando a fluorescência em relação ao tamanho dos nucleotídeos, observasse 3 picos, o primeiro em 25nt é o marcador, o pico em 1800nt corresponde à subunidade 18S e no 4000nt a subunidade 28S do ribossomo. B: Gel do eletroferograma das amostras, mostrando as subunidades 18S e 28S como bandas de eletroforeses e as sombras o “semear” os picos de degradação do RNA.

Amplificação do RNA com cauda de poli A (RNA poliA)

Para este trabalho, nós adaptamos o protocolo de amplificação de RNA poliA utilizado pelo grupo e descrito em CASTRO et al. (2008) com a finalidade de possibilitar a utilização de RNA amplificado a partir de amostras microdissecadas a laser para hibridização na plataforma Agilent. A

amplificação e marcação com fluoróforos foi realizada utilizando o kit de amplificação Quick-Amp Labeling kit (Agilent Technologies) com algumas modificações (Figura 4) descritas a seguir. A partir de 7-12ng de RNA total em um volume de 4,15µL, foram adicionados 0,6µL de iniciador Oligo-dT ligado ao promotor de T7 e 1µL de RNA “Spike”, sendo Spike A para RNA das amostras teste marcadas com Cy3 e Spike B para o RNA referência marcado com Cy5. O RNA Spike é um RNA proveniente da transcrição de uma única sequência de 55-mer de adenovírus humano tipo 6, gene E1A, região 13S, que funcionam como controle da amplificação e marcação, uma vez que o oligoarranjo construído pela Agilent possui sondas específicas para esses RNAs. Os tubos foram incubados a 65°C por 10 min. para desnaturar o RNA, seguido por um rápido esfriamento em gelo por 10 min.; em seguida, foram adicionados 4,25µL de master mix para transcrição reversa, cDNA (2µL de 5X First Strand Buffer previamente aquecido por 5 min. a 80°C 1µL 0,1M DTT, 0,5µL 10mM dNTP mix, 0,5µL MMLV-RT, 0,25µL RNase OUT) incubando no termociclador por 2 horas a 40°C; posteriormente, foram adicionados 30µL do tampão de transcrição Transcription master mix (4,85µL H₂O DEPC 10µL 4X transcription buffer, 3µL 0,1M DTT, 8µL 25mM NTP mix (Promega), 3,2µL PEG previamente aquecido a 40°C por 1min, 0,25µL RNase OUT, 0,3µL Pyrophosphatase inorganic, 0,4µL T7 31 RNA polimerase) incubando por 3 horas a 40°C para sínteses do RNA complementar (cRNA) que permitisse o segundo ciclo de amplificação. Assim, o cRNA foi purificado empregando-se o RNeasy mini kit (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. O cRNA gerado durante o primeiro ciclo de amplificação (cRNA1) foi concentrado na

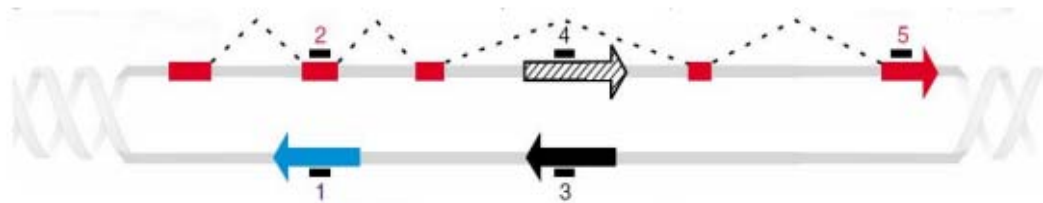
centrífuga a vácuo a 6,7µl e foi empregado no segundo ciclo de amplificação. O segundo ciclo de amplificação foi feito segundo protocolo otimizado em nosso grupo de pesquisa (CASTRO et al. 2008). A primeira fita de cDNA foi feita Mediante adição de 2µg de iniciador Random Hexameros (dN6) e incubação a 70°C por 10 min., com rápido esfriamento em gelo por 10 min; em seguida, foram adicionados 12,3µl de master mix para transcrição reversa cDNA (4µl ImProm II 5X buffer, 4,8µl MgCl₂ 25mM 2µl dNTPs 10mM, 0,5µl Rnase OUT 1µl ImProm-II transcriptase reversa), incubando 2 horas a 42°C. Logo após foi feita a síntese da segunda fita de cDNA, adicionando 80µl de master mix (64,4µl H₂O-DEPC 10µl Advantage PCR buffer, 0,7µl iniciador Oligo -dT (Agilent) 2µl dNTPs 10mM, 0,72µl RNase H (2U/µl Gibco BRLCat# 18021-071) 2µl Advantage Polymerase (Clontech Cat# 8417-1). O cDNA foi purificado por fenol clorofórmio, o 20% do cDNA obtido foi guardado a -20°C para validação das amostras, o 80% do cDNA obtido foi utilizado segundo ciclo de amplificação. O segundo ciclo de amplificação utiliza a enzima T7 RNA polimerase, que simultaneamente amplifica o material alvo, gerando o cRNA e incorpora o CTP marcado com cianina 3 (Cy3) ou cianina 5 (Cy5). As amostras testes foram marcadas com Cy3 e o RNA referência foi marcado com Cy5 para serem utilizados na hibridização competitiva. 32 O rendimento esperado da etapa de amplificação do protocolo disponibilizado pela Agilent é da ordem de 100 vezes quando comparado à concentração de RNA total inicial, no entanto, com a incorporação da etapa adicional de amplificação o rendimento chega à ordem de 1000 vezes. Seguindo as recomendações do kit de amplificação Quick-Amp Labeling kit (Agilent Technologies), foram

Neste estudo foi utilizada a hibridação competitiva. Nesse caso, as hibridações são realizadas utilizando uma amostra referência, comum a todas as hibridações, marcada com um corante fluorescente distinto da amostra teste, que se refere às amostras de interesse do estudo. As amostras teste e referência são misturadas e hibridadas em uma mesma lâmina. Como a hibridação é competitiva, os valores de fluorescência obtidos revelam níveis relativos de expressão de cada transcrito na amostra comparada com a amostra referência. Dessa forma, o uso da amostra referência possibilita comparações de experimentos independentes (NOVORADOVSKAYA et al. 2004). A hibridação dos microarrays foi realizada com 3µg de cRNA da amostra teste marcada com Cy3 e mesma quantidade do RNA referência marcados com Cy5, por um período mínimo de 18 horas e máximo 22 horas, a 65°C em forno rotatório a 10 RPM, utilizando o tampão de hibridação Hi-RPM fornecido pela Agilent. Após a hibridação, as lâminas foram lavadas utilizando tampões fornecidos pelo fabricante (Agilent, USA) para eliminação de alvos não específicos e eliminação de background. Nesse processo, as lâminas são retiradas do suporte e lavadas por 1 min. em tampão de lavagem #1 à temperatura ambiente, seguido pelo tampão #2 por 1 min a 37°C. A seguir, as lâminas passaram pelo processo de secagem que consiste em lavagens em acetonitrila por 10s e na solução de estabilização por 30s.

Descrição do microarray utilizado

A fim de identificar RNAs intrônicos não codificadores (ncRNAs) e RNAs codificadores de proteína expressos em tecido tumoral ou normal humano, foram utilizados microarrays contendo 244 mil sondas de oligonucleotídeos 60-mer em um desenho essencialmente semelhante ao do combined intron-exon oligoarray 44k (NAKAYA et al. 2007), desenvolvido pelo grupo do Dr. Sergio Verjovski Almeida e do Dr. Eduardo Reis - Laboratório de expressão Gênica de Eucariotos – Instituto de Química da Universidade de São Paulo (MOREIRA 2010). A lâmina 244K contém 44,074 sondas para um ou mais éxons de genes codificadores de proteínas humanas conhecidas [(sondas idênticas às da lâmina comercial Whole Human Genome Oligo Microarray 44K (Agilent Technologies)]. Além disso, a lâmina 244K possui sondas para todos os RNAs não codificadores identificados em 75% de todos os genes humanos conhecidos (NAKAYA et al. 2007). Especificamente, a lâmina 244K possui 158,270 sondas para as fitas senso (Figura 5, sonda 4) e anti-senso (Figura 5, sonda 3) de todos os transcritos totalmente intrônicos não-codificadores (TINs) humanos conhecidos (para os quais existem duas ou mais ESTs no GenBank) (LOURO et al. 2007). Possui ainda 28,878 sondas para transcritos parcialmente intrônicos não codificadores (PINs) conhecidos (com duas ou mais ESTs), tanto na fita anti-senso (Figura 8, sonda 1) quanto na fita senso correspondentes aos éxons dos genes codificadores (Figura 8, sonda 2), nos quais o ncRNA anti-senso PIN se sobrepõe (LOURO et al. 2007). Completando o total de 244 mil sondas estão também presentes nessa plataforma dezenas de sondas de controles positivos e negativos

recomendados pela 36 Agilent, incluindo sondas complementares a um Spike RNA que é adicionado à amostra de RNA para controle positivo da marcação e hibridação.



Fonte: NAKAYA et al. (2007).

Figura 5 - Desenho do microarranjos de oligonucleotídeos íntron-éxon. Sonda 60-mer customizada pela empresa Agilent. Sonda 1: Sonda para transcritos parcialmente intrônicos antisense Sonda 2: Sonda representando cada éxon que se sobrepõe, na fita oposta, a cada transcrito parcialmente intrônico. Sondas 3 e 4 pares de sonda reverso complementares para cada uma das duas possíveis fitas dos transcritos totalmente intrônicos. Sonda 5: Sonda para um éxon de um gene conhecido, codificador de proteínas.

Captura de sinal e pré-análise das lâminas de microarray

Os arrays foram digitalizados com o emprego do Scanner Agilent Bundle modelo B (Agilent, USA), o qual dispõe de 2 lasers com comprimento de ondas diferentes, que estimulam especificamente o Cy3 ou o Cy5 (Quadro 2).

Quadro 1 - Características específicas de cada fluoróforo utilizado.

Fluoróforo	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Coloração
Cy3	550	570	Verde
Cy5	649	670	Vermelho

Quando as moléculas são excitadas emitem um sinal proporcional ao número de moléculas hibridadas, que é captado pelo scanner. A quantificação desse sinal ocorre devido à conversão do comprimento de onda emitido pelos fluoróforos excitados em energia elétrica, produzindo um sinal mensurável o que é convertido em uma imagem (Figura 6).

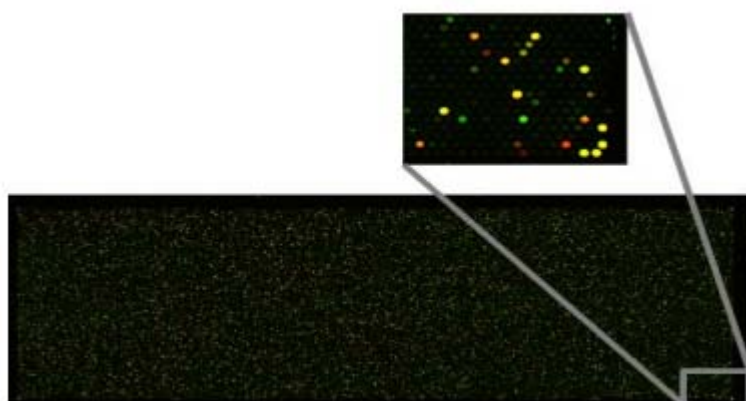


Figura 6 - Lâmina 244K hibridada com RNA da amostra (Cy3 verde) teste e RNA referência (Cy5 vermelho).

A hibridação de ambos RNA em um mesmo spot geram a cor amarela, os spots nas esquinas da lâmina contem sondas dirigidas aos spikes, cuja hibridização é um controle positivo. Os dados de intensidade de todos os spots digitalizados no scanner foram extraídos e pré-processados utilizando o programa Agilent Feature Extraction (v 10,7,1). Esse Software permite extrair os valores de intensidade de cada spot, obtendo os valores de fluorescência correspondente à expressão de cada transcrito na amostra-teste e na amostra-referência.

Além disso, o Software FE possui fatores de correção específicos para as lâminas da Agilent, como o fator de correção do “Efeito Domo”, produzido

pela bolha de hibridização, característico do método de hibridação da Agilent. Durante a hibridação da lâmina, é deixada uma pequena bolha de ar na câmara que percorre a borda da lâmina durante a hibridação enquanto a lâmina é girada no hibridizador giratório. Dessa forma, a periferia da lâmina passa por momentos sem solução (presença da bolha) entretanto o centro da lâmina está sempre em contato com a solução; conseqüentemente, os spots localizados no centro da lâmina apresentam intensidade maior do que os localizados na periferia denominado de “Efeito Domo”.

O software FE também corrige as diferenças de sensibilidade de detecção dos dois fluoróforos (Cy3 é detectado pelo scanner com sensibilidade maior que Cy5, quando ambos estão em baixas intensidades). Foi feita também a subtração do background local (valor de intensidade ao redor de cada spot).

Análise dos resultados de cDNA microarray

Os microarrays foram analisados com o software genespring GX 12,1 (Agilent Technologies). Inicialmente, foram importados os dados de Control Type, Probe Name, Signal e Feature, obtidos com programa Agilent Feature Extraction (v 10,7,1). Os dados foram normalizados por transformação log e transformação de baseline.

Uma vez normalizados, os dados foram filtrados com a intensão de eliminar os spots com sinal baixo de background ou com saturação da hibridação. Consideramos saturação da hibridação os spots com emissão de sinal maior ou igual a 63,000 (sendo $65,550 = 16 \text{ BIT}$). Nesse caso, o excesso

de material hibridado gera um sinal muito intenso que supera a capacidade do detector de medir a intensidade proporcional de fluorescência, invalidando a quantificação.

Foi realizado o controle de qualidade dos dados por Análise dos Componentes Principais (PCA). Essa análise permite comparar o perfil de expressão das amostras; assim amostras com a mesma condição experimental devem estar agrupadas. Desvios dessa presunção podem ser devido a amostras de má qualidade no conjunto de amostras ou uma variação biológica verdadeira dentro das populações de estudo.

Em seguida, os dados foram filtrados para ficar só com sondas com evidência de expressão nas amostras analisadas. As sondas foram divididas em codificadores e não codificadores e foram realizadas análises de expressão procurando genes diferencialmente expressão nos subgrupos receptor hormonal e linfonodos acometidos. Foram considerados transcritos diferencialmente expressos aqueles que apresentaram Fold Change (FC) $\geq 1,8$ e p-valor $\leq 0,01$.

Anexo 5 – Descrição do subgrupo de genes selecionados para investigação do perfil de expressão gênica relacionado ao componente inflamatório do carcinoma de mama. Todas as sondas relativas a cada gene foram incluídas no estudo, ficando a cargo do controle de qualidade do método considerar ou não na análise final.

1. CCL5: É uma citocina que funciona como quimioatraente para monócitos, células T auxiliares de memória e eosinófilos (KHALID et al. 2015).
2. CCL18: A citocina codificada por este gene exibe atividade quimiotática para células T naturais, células T CD4⁺ e CD8⁺ e linfócitos não ativados, mas não para monócitos ou granulócitos. Esta quimiocina atrai linfócitos T naturais em direção a células dendríticas e macrófagos ativados em linfonodos (LIN et al. 2015). Qual célula Produz/secreta?
3. CD3d: A proteína é parte do receptor de células T, responsável pelo reconhecimento de antígenos (SHARMA e KRANZ 2016).
4. CD4: Este gene codifica uma glicoproteína de membrana de linfócitos T que interage com antígenos do complexo de histocompatibilidade principal de classe II e é também um receptor para o vírus da imunodeficiência humana. Este gene é expresso não apenas nos linfócitos T, mas também nas células B, macrófagos e granulócitos (BUI e NGUYEN 2016).
5. CD8a: A proteína atua como uma molécula do complexo do receptor de células T no reconhecimento de antígenos apresentados por uma

célula no contexto das moléculas de classe I do MHC (SHARMA e KRANZ 2016). Qual subpopulação de linfócitos T??

6. CD19: O produto desse gene participa da capacidade da célula B para responder de forma específica e sensível a vários antígenos (MORBACH et al. 2016).
7. CD20: Este gene codifica uma molécula de superfície de linfócitos B que desempenha um papel no desenvolvimento e diferenciação das células B em células plasmáticas (VAUCHY et al. 2015).
8. CD21: A proteína está predominantemente expressa na superfície de células B maduras onde faz parte de um complexo do co-receptor de células B e funciona em parte, para modular a força do sinal deste receptor. Embora o CD21 esteja presente em todas as células B maduras e células dendríticas foliculares (FDCs), isto torna-se aparente apenas quando a imuno-histoquímica é realizada em secções congeladas. Em amostras de tecido embebidas em parafina apenas as FDCs mantêm o padrão de coloração. Como resultado, pode ser usado para marcar as células dendríticas foliculares no tecido linfóide (TAYLOR et al. 2016).
9. CD28: A proteína codificada por este gene é essencial para a proliferação e sobrevivência de células T, produção de citocinas e desenvolvimento de células T auxiliares (TIAN et al. 2015). Mas Quem A Expressa??
10. CD48: A proteína codificada é encontrada na superfície de linfócitos (B e T) e outras células imunes (quais?), como células dendríticas e

células endoteliais e participa em vias de ativação e de diferenciação nestas células (KIS-TOTH e TSOKOS 2014).

11. CD68: Este gene codifica uma glicoproteína transmembrana que é altamente expressa por monócitos humanos e macrófagos teciduais. Essa é uma proteína de membrana do tipo I com um domínio extracelular altamente glicosilado e liga-se a lectinas ou selectinas específicas de tecidos e órgãos. A proteína é também um membro da família de receptores de eliminação, sendo responsável por eliminar detritos celulares, promover a fagocitose e mediar o recrutamento e a ativação de macrófagos (ALGARS et al. 2012).
12. CD86: Este gene codifica uma proteína que é expressa por células apresentadoras de antígeno e é o ligante para duas proteínas na superfície de células T, o antígeno CD28 e CTLA-4. A ligação desta proteína com o antígeno CD28 é um co-sinal estimulador para ativação da célula T. A ligação dessa proteína com CTLA-4 regula negativamente a ativação das células T e diminui a resposta imunitária (DYCK e MILLS 2017).
13. CD163: A proteína codificada por este gene é expressa exclusivamente em monócitos e macrófagos, principalmente do tipo M2. Funciona como um sensor imune inato para bactérias e indutor de inflamação local (KOMOHARA et al. 2015).
14. CD206: A proteína codificada por este gene é um receptor de membrana tipo I que medeia a endocitose de glicoproteínas por macrófagos. Foi demonstrado que a proteína liga estruturas ricas em

manose na superfície de vírus, bactérias e fungos potencialmente patogénicos para que possam ser neutralizados por engolfamento fagocítico (KOMOHARA et al. 2015).

15. CD274: A interação deste ligante com o seu receptor inibe a ativação de células T e a produção de citocinas, além de provocar a exaustão periférica de células T efetoras e promover a conversão de células T efetoras em células Treg (SUKARI et al. 2016). Quem Expressa?
16. CXCL9: A proteína é um quimioatraente para linfócitos, principalmente o T, mas não para neutrófilos (FAÉ et al. 2013). Quem Produz/Secreta?
17. CXCL13: Preferencialmente promove a migração de linfócitos B (em comparação com as células T e macrófagos), aparentemente estimulando o influxo de cálcio e é quimiotático para células que expressam o receptor 1 de linfoma de Burkitt (BLR-1) (HAVENAR-DAUGHTON et al. 2016).
18. GZMA: A proteína é uma serina protease específica de células T que pode funcionar como um componente comum necessária para a lise das células alvo por linfócitos T citotóxicos e células NK (VAN DAMME et al. 2010).
19. GZMB: A pré-proteína codificada é secretada por células NK e LTC e processada para gerar uma protease ativa, que induz a apoptose das células-alvo. Esta proteína também processa citocinas e degrada as proteínas da matriz extracelular (PERL et al. 2012).
20. IL-1R I: Este gene codifica um receptor de citocina que pertence à família de receptores de interleucina-1. A proteína codificada é um

receptor para interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta e antagonista do receptor de interleucina-1. É um mediador importante envolvido em muitas respostas imunológicas e inflamatórias induzidas por citocinas (SHA e MARKOVIC-PLESE 2011).

21. IL-1R II: A proteína codificada por este gene é um receptor de citocina que pertence à família de receptores de interleucina 1. Esta proteína liga-se à IL-1A, IL-1B e o IL1R1 e atua como um receptor competitivo que inibe a atividade dos seus ligantes. A IL-4 antagoniza a atividade da IL-1 ao ligar-se a esse receptor (SHA e MARKOVIC-PLESE 2011). QUEM expressa?
22. IL-6: Este gene codifica uma citocina que funciona na inflamação e na maturação das células B. A proteína é produzida principalmente em locais de inflamação aguda e crônica, onde é secretada no soro e induz uma resposta inflamatória através do receptor de IL-6 alfa (FRAENKEL 2017). Quem Produz/Secreta?
23. IL-10: A proteína codificada por este gene é uma citocina produzida principalmente por monócitos e, em menor extensão, por linfócitos. Esta citocina tem efeitos pleiotrópicos na imunorregulação e inflamação. Ela regula a expressão das citocinas Th1, Ags do MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras nos macrófagos. Também aumenta a sobrevivência das células B, a proliferação e a produção de anticorpos. Esta citocina pode bloquear a atividade de NF-kappa B e está envolvida na regulação da via de sinalização JAK-STAT (ROJAS et al. 2017).

24. IL-12: Este gene codifica a citocina que atua sobre células T e NK e tem uma ampla gama de atividades biológicas. Esta citocina é expressa por macrófagos ativados que servem como um indutor essencial do desenvolvimento das células Th1. Verificou-se que esta citocina é importante para sustentar um número suficiente de células Th1 de memória / efectoras para mediar a proteção a longo prazo contra um patógeno intracelular (MASPI et al. 2016).
25. iNOS: enzima que sintetiza o óxido nítrico que um radical livre reativo que atua como um mediador biológico em vários processos, incluindo neurotransmissão e atividades antimicrobianas e antitumorais. É um marcador de macrófagos M1 (PAPAEVANGELOU et al. 2016).
26. IRF1: A proteína serve como ativadora da transcrição dos interferons alfa e beta, também serve como ativador e repressor de vários outros genes. (SHA e MARKOVIC-PLESE 2017). Quem Produz/Secreta?
27. IRF4: A proteína é específica de linfócitos e regula negativamente a sinalização do receptor Toll-like (TLR), que é central para a ativação das respostas inata e adaptativa (WANG et al. 2014).
28. LCK: A proteína codifica uma molécula de sinalização chave na seleção e maturação de células-T. Ela se liga a receptores de superfície celular, incluindo CD4 e CD8 e outras moléculas de sinalização (VENTIMIGLIA e ALONSO 2013). Quem Produz/Secreta?
29. PIN1: A proteína está envolvida com regulação do crescimento celular, da resposta a estresse genotóxico e outros, da resposta imunológica, pela indução e manutenção da pluripotência, pelo desenvolvimento de

células germinativas, pela diferenciação neuronal e pela sobrevivência celular (PARK et al. 2012). Quem Produz/Secreta?

30. PRF1: Esta proteína é uma das principais proteínas citolíticas dos grânulos citolíticos e que é conhecido por ser uma molécula efetora chave para linfócitos T e citólise mediada por células NK (PARK et al. 2012).
31. SIGIRR: É um receptor relacionado com IL-1 e que é altamente expresso em células dendríticas imaturas e células epiteliais, mas não em macrófagos (BAUMAN et al. 2015).
32. SNCA: esse gene codifica o receptor PD1. A via de PD1/PDL1 é um regulador negativo da função das células T efectoras e acredita-se que mantém a tolerância periférica. O bloqueio da via de PD1 / PDL1 afeta a população Treg (SUKARI et al. 2016). Quem expressa?
33. TGF- β : Corresponde a uma família que se liga a vários receptores levando ao recrutamento e ativação de fatores de transcrição da família SMAD, que regulam a expressão de genes. Esta proteína regula a proliferação, diferenciação e crescimento celular e pode modular a expressão e ativação de outros fatores de crescimento, incluindo interferon gama e fator de necrose tumoral alfa (MACCALLI et al. 2017). Quem Produz/Secreta?
34. TLR1: A proteína codificada por este gene é um membro da família de TLR que desempenha um papel fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata. Eles reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são

expressos em agentes infecciosos e medeia a produção de citocinas necessárias para o desenvolvimento de imunidade efetiva. Os vários TLRs exibem diferentes padrões de expressão (NOREEN e ARSHAD 2015). Quem Produz/Secreta?

35. TLR2: Esta proteína é uma proteína de superfície celular que pode formar heterodímeros com outros membros da família TLR para reconhecer moléculas conservadas derivadas de microrganismos conhecidos como PAMPs. A ativação de TLRs por PAMPs conduz a uma regulação positiva das vias de sinalização para modular a resposta inflamatória do hospedeiro. Este gene, também, parece promover a apoptose em resposta a lipoproteínas bacterianas (NOREEN e ARSHAD 2015). Quem Produz/Secreta?
36. TLR4: Eles reconhecem padrões moleculares associados a patógenos que são expressos em agentes infecciosos e medeiam a produção de citocinas necessárias para o desenvolvimento de imunidade efetiva. Este receptor foi implicado em eventos de transdução de sinal induzidos pelo lipopolissacárideo encontrados na maioria das bactérias gram-negativas (NOREEN e ARSHAD 2015). Quem Produz/Secreta?
37. TMEM173: A proteína codificada é um receptor de reconhecimento de padrões que detecta ácidos nucleicos e transmite sinais que ativam as respostas dependentes de interferon de tipo I (BARBER 2015). Quem Produz/Secreta?

Apêndice 1 - Tabela com todos os genes e sondas usados para avaliar o infiltrado inflamatório na expressão gênica.

Gene_sonda	Média grupo A	Média grupo B	Fold Change	valor de p	FDR
CCL5	0,5205464	0,2694584	-0,251088	0,1517963	0,2612308
CCL18_p1	4,888577	2,7282608	-2,1603162	7,08E-06	4,36E-05
CCL18_p2	0,5059143	0,06857278	-0,4373415	0,0334429	0,0824924
CD3d	-2,8578699	-3,8426168	-0,9847469	3,77E-04	0,0015502
CD4_p1	0,41926184	0,27944946	-0,1398124	0,214968	0,3384603
CD4_p2	2,6893573	2,0170143	-0,672343	0,0045237	0,0128753
CD8a (MAL)_p1	-2,5644324	-3,8851871	-1,3207547	8,43E-04	0,0028362
CD8a (MAL)_p2	0,15084393	0,10335708	-0,0474868	0,4849625	0,6082581
CD19	-1,5926906	-3,186549	-1,5938584	2,03E-06	1,50E-05
CD21 (CR2)_p1	0,15372483	0,15242523	-0,0012996	0,9844315	0,1011777
CD21 (CR2)_p2	0,46879798	0,59122443	0,1224264	0,3842995	0,5170575
CD21 (CR2)_p3	0,15372483	0,15242523	-0,0012996	0,9844315	0,1011777
CD28	-1,4550672	-3,3353095	-1,8802423	8,03E-08	8,49E-07
CD48_p1	0,6869713	0,55081314	-0,1361582	0,5044148	0,6221116
CD48_p2	-1,2918128	-3,0890331	-1,7972203	5,82E-08	7,18E-07
CD68	2,9941328	1,8046992	-1,1894336	2,38E-06	1,60E-05
CD86	4,355176	3,039822	-1,315354	3,87E-04	0,0015087
CD163_p1	6,7603984	4,8743625	-1,8860359	8,38E-08	7,76E-07
CD163_p2	4,249242	2,8908625	-1,3583795	5,97E-04	0,0022086
CD206	0,6849604	0,2923909	-0,3925695	0,0313421	0,0799764
CD274_p1	0,678169	0,5146371	-0,1635319	0,3517567	0,491132
CD274_p2	-1,5071368	-1,7094699	-0,2023331	0,4795464	0,6225690
CD274_p3	1,2527943	1,4814703	0,228676	0,3419886	0,4866762
CXCL9	8,442738	5,7463036	-2,6964344	1,75E-09	3,23E-08
CXCL13_p1	-0,36347565	-0,59866357	-0,2351879	0,1407347	0,2479611
GZMA	0,93094534	-1,2816103	-2,2125556	4,81E-08	7,12E-07
GZMB	3,542044	1,0449185	-2,4971255	1,35E-09	3,34E-08
CXCL13_p2	-1,607095	-1,6655823	-0,0584873	0,7860414	0,8430009
IL-1 beta	-3,097316	-4,322413	-1,225097	9,96E-05	5,26E-04
IL-1R II_p1	0,87509483	-1,6579199	-2,5330147	3,47E-10	1,28E-08
IL-1R II_p2	0,31663933	0,24849442	-0,0681449	0,5679341	0,6778567
IL-1R alfa	0,31663933	0,20158373	-0,1150556	0,3734619	0,5117811
IL-6	-1,2920308	-2,2669363	-0,9749055	2,38E-04	0,0011001
IL-10	0,14458087	0,016528403	-0,1280525	0,1168202	0,2216589
IL-12	0,33146504	0,16326286	-0,1682022	0,0555524	0,1284649
IRF1_p1	0,060356673	-0,4872122	-0,5475689	0,0420809	0,1004513
IRF1_p2	-0,01187162	-0,1108539	-0,0989823	0,6966786	0,769466
IRF1_p3	0,54561394	0,59217095	0,0465570	0,7929573	0,8382692

IRF4_p1	2,0233445	-0,7859047	-2,8092492	5,98E-11	4,43E-09
IRF4_p2	0,13700825	-0,007071734	-0,1440800	0,2425801	0,3739776
LCK	-3,799933	-4,777452	-0,977519	7,83E-04	0,0027590
MS4A1_p1	-1,9226655	-2,2070963	-0,2844308	0,2616855	0,3951985
MS4A1_p2	1,2460843	1,2430179	-0,0030664	0,9909762	0,9909762
NOS2_p1	0,6504	0,28933913	-0,3610609	0,1783921	0,3000231
NOS2_p2	-0,1977857	-0,010665739	0,1871200	0,1794853	0,2951536
PIN 1 (UBL5)	0,06160613	0,13593923	0,0743331	0,6071367	0,7131447
PRF1	0,3464285	0,122513086	-0,2239154	0,1073598	0,2090691
SCYL3_p1	0,32699057	0,26053372	-,0664568	0,6630608	0,7548693
SCYL3_p2	0,001671843	0,41174734	0,4100755	0,0976853	0,2007976
SCYL3_p3	-0,07134858	-8,58E-04	0,0704905	0,6826345	0,7653781
CCL15_p4	1,5272985	1,5991559	0,0718574	0,6579397	0,7607427
SIGIRR	0,003129179	0,4389424	0,4358132	0,0561617	0,1259384
SNCA (PD1)_p1	-3,7930703	-3,7554681	0,0376022	0,8241526	0,858976
SNCA (PD1)_p2	0,43466184	0,2229363	-0,2117255	0,0907266	0,1918219
SNCA (PD1)_p3	-0,16514872	0,024590408	0,1897391	0,2669695	0,3951148
SNCA (PD1)_p4	-0,19303559	-0,09889966	0,0941359	0,5652606	0,6857260
SNCA (PD1)_p5	-3,107313	-3,562022	-0,454709	0,1262077	0,2334842
SNCA (PD1)_p6	0,26519823	0,3003455	0,0351473	0,7327012	0,7973514
SNCA (PD1)_p7	0,43466184	0,24735269	-0,1873091	0,1321005	0,2384253
SNCA (PD1)_p8	1,1228613	0,7971399	-0,3257214	0,0994329	0,1988659
SPHK1	0,085264176	-0,5988381	-0,6841023	0,0021646	0,0069645
TGF-b_p1	-0,03594376	-0,27716386	-0,2412201	0,1944282	0,3127758
TGF-b_p2	0,5543417	0,33304885	-0,2212928	0,4830291	0,6162785
TGF-b_p3	-1,5054737	-1,1461914	0,3592823	0,0118028	0,0323485
TGF-b_p4	-0,024785852	0,0885486	0,1133344	0,4738212	0,6261209
TGF-b_p5	-1,3685428	-2,3319235	-0,9633807	0,0032141	0,0099101
TGF-b_p6	0,52706355	0,25013992	-0,2769236	0,0724962	0,1577858
TGF-b_p7	-0,54976726	-1,6520457	-1,1022784	0,0037705	0,0111608
TGF-b_p8	-0,24620199	-0,93606937	-0,6898674	0,0279049	0,0737487
TLR1	2,5524895	1,3772388	-1,1752507	2,25E-04	0,0011115
TLR2	3,0121515	1,6631612	-1,3489903	2,40E-07	1,98E-06
TLR4_p1	0,098955266	0,04002804	-0,0589272	0,2784377	0,4040077
TLR4_p2	2,4274368	1,2618816	-1,1655552	6,71E-05	3,82E-04
TMEM173	1,3759522	0,70916986	-0,6667823	2,54E-04	0,0011072

Apêndice 2 – Curvas de sobrevida cancer específica e modelos de regressão de Cox univariado e multivariado para todos os casos de câncer de mama

Quadro 1 - Relação dos pontos de corte calculados para as curvas de SCE.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	4,667
CD4	0,333
CD8	0
CD68	1
CD163	0,333
FOXP3	1,333
PAX5	1

Como foi usada a média da contagem de 3 áreas, a maioria dos pontos de corte se encontram como valores fracionados. Para tornar toda a metodologia viável na rotina clínica arredondamos os valores para o número inteiro mais próximo, tendo os pontos de corte descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Relação dos pontos de corte usados para fazer as curvas de SCE.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	5
CD4	0
CD8	0
CD68	1
CD163	0
FOXP3	1
PAX5	1

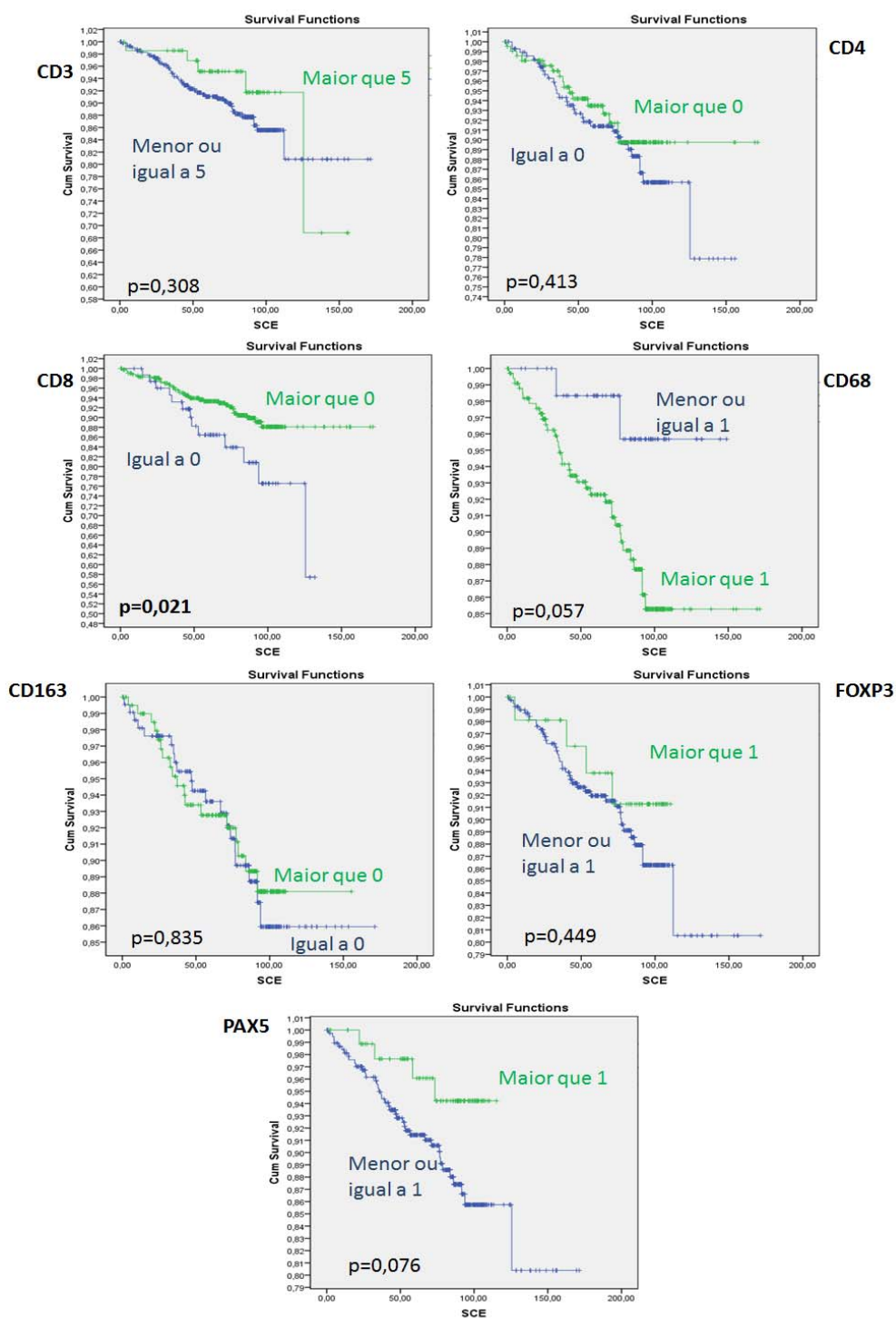


Figura 1 - Curvas de SCE, na qual foi empregada o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD3 ponto de corte: 0 (p=0,308). CD4: ponto de corte: 0 (p=0,413). CD8: ponto de corte: 0 (p=0,021). CD68: ponto de corte: 1 (p=0,057). CD163: ponto de corte: 0 (p=0,835). FOXP3: ponto de corte: 1 (p=0,449). PAX5: ponto de corte: 1 (p=0,076).

Para facilitar o entendimento das sobrevidas câncer específica, criamos a Tabela 1 relacionando cada um dos marcadores com os grupos criados e se a diferença entre eles é estatisticamente significativa.

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	5	Menor: 69% Maior: 81%	0,308
CD4	0	Menor: 78% Maior: 90%	0,413
CD8	0	Menor: 57% Maior: 88%	0,021
CD68	1	Menor: 96% Maior: 85%	0,057
CD163	0	Menor: 86% Maior: 88%	0,835
FOXP3	1	Menor: 81% Maior: 91%	0,449
PAX5	1	Menor: 80% Maior: 94%	0,076

Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

Pela Tabela 1 podemos notar que apenas CD8, dentre todos marcadores tem relevância estatística. Sendo a sua presença relacionada com um melhor prognóstico, aumentando as chances de a paciente não evoluir para óbito, tendo então um caráter protetor.

Após o cálculo das curvas de sobrevida empregamos o modelo de regressão de Cox univariado, incluindo cada um dos imunomarcadores, para associa-lo com seu perfil, seja ele de protetor contra o tumor, quanto de potencializador da agressividade tumoral.

Tabela 2 - Modelo de regressão de Cox univariada para SCE.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD3	Abaixo de 5	0,621	0,246	1,566	0,313
CD4	Igual a 0	0,414	0,424	1,424	0,414
CD8	Igual a 0	0,487	0,253	0,905	0,023
CD68	Acima de 1	3,638	0,875	1,126	0,076
CD163	Igual a 0	0,835	0,494	1,767	0,835
FOXP3	Abaixo de 1	0,673	0,240	1,888	0,452
PAX5	Abaixo de 1	0,406	0,145	1,137	0,086

Na Tabela podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p. Em negrito encontra-se o valor de p estatisticamente significativo.

Pela Tabela 2 podemos notar que apenas CD8 dentre os marcadores manteve a associação coma SCE. As pacientes que não possuem as células imunomarcadas tem mais que o dobro de chance de evoluir a óbito.

Após realizarmos as curvas de sobrevida e o modelo de regressão de Cox univariado, utilizamos o modelo de regressão múltipla de Cox com cada marcador e estadiamento clínico, acometimento linfonodal, grau histológico e subtipos moleculares, já que essas variáveis mostraram associação estatisticamente significante com sobrevida (todos com $p \leq 0,05$).

Tabela 3 - Modelo de regressão de Cox multivariada aplicada à SCE.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD3	Abaixo de 5	0,251	0,015	1,066	0,061
CD4	Igual a 0	0,887	0,424	1,855	0,750
CD8	Igual a 0	0,593	0,253	1,387	0,288
CD68	Acima de 1	2,515	0,472	2,648	0,220
CD163	Igual a 0	0,568	0,253	1,275	0,170
FOXP3	Abaixo de 1	0,744	0,238	2,327	0,611
PAX5	Abaixo de 1	0,327	0,077	1,396	0,131

Usamos como fatores prognósticos o estadiamento clínico, SBR, acometimento linfonodal e subtipo molecular.

Podemos notar que nenhum dos marcadores se mostrou independentemente associado com a SCE.

Apêndice 3 - Curvas de SLD e modelos de regressão de Cox univariado e multivariado para todos os casos de câncer de mama

Após a realização do teste de maximização dos pontos de corte para todos os marcadores com relação à recorrência, foram realizadas as curvas de SLD utilizando o método de Kaplan-Meier com o cálculo de log-rank.

Quadro 1 - Relação dos pontos de corte calculados para as curvas de SCEs.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para recorrência</i>
CD3	13
CD4	32
CD8	38
CD68	26
CD163	3,667
FOXP3	0
PAX5	11

Como foi usada a média da contagem de 3 áreas, um dos pontos de corte se encontra como valor fracionado. Para tornar a metodologia viável para a rotina clínica arredondamos os valores para o número inteiro mais próximo, tendo os pontos de corte descritos abaixo no Quadro 2:

Quadro 2 - Relação dos postos de corte usados para fazer as curvas de SLD.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para recorrência</i>
CD3	13
CD4	32
CD8	38
CD68	26
CD163	4
FOXP3	0
PAX5	11

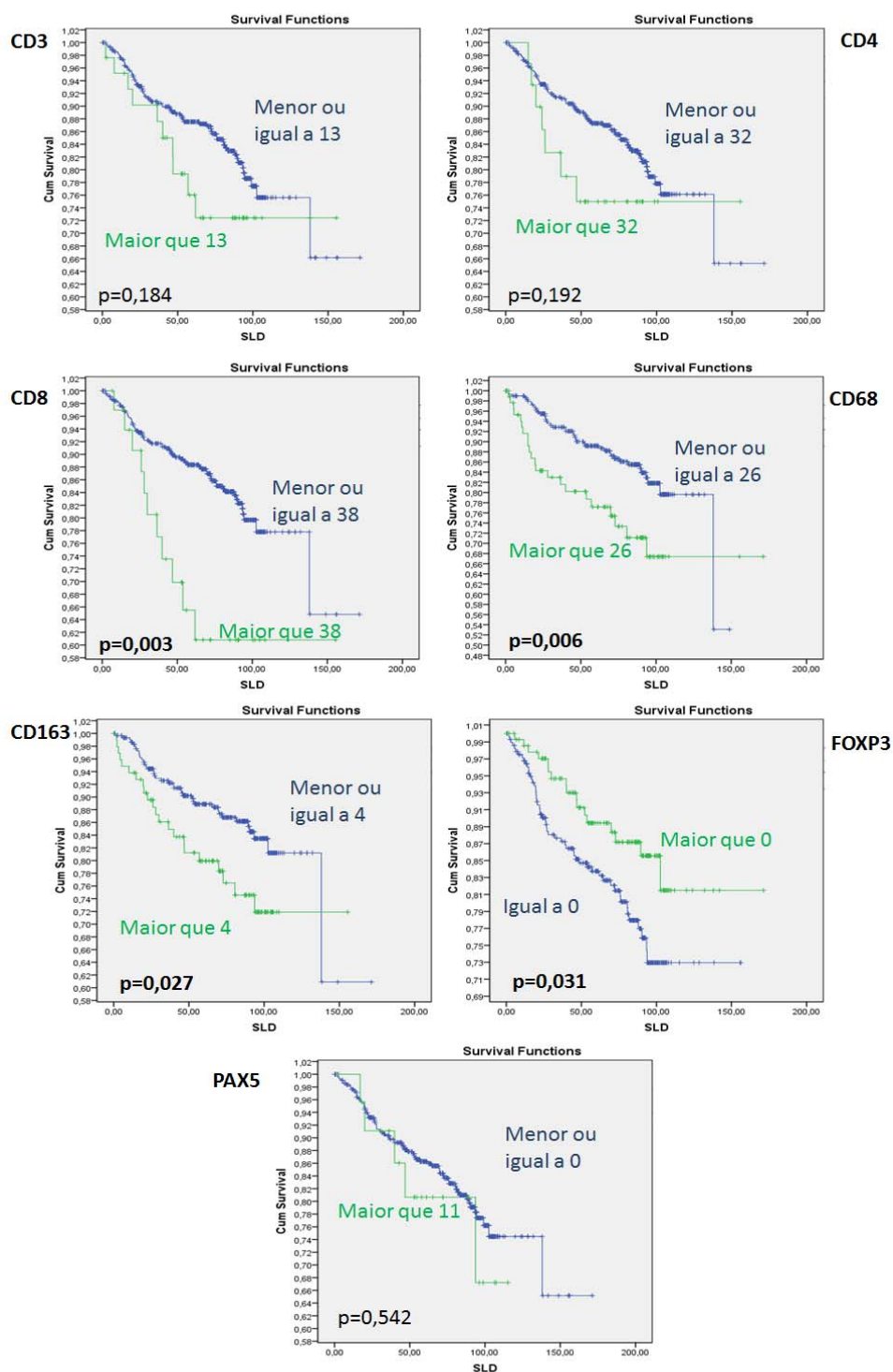


Figura 1 - Curvas de SLD na qual foi empregada o método de Kaplan-Meier e estatística de log-rank. CD3 ponto de corte de 13 (p=0,184). CD4: ponto de corte de 32 (p=0,192). CD8: ponto de corte de 38 (p=0,003). CD68: ponto de corte de 26 (p=0,006). CD163: ponto de corte de 4 (p=0,027). FOXP3: ponto de corte: 0 (p=0,031). PAX5: ponto de corte: 11 (0,542).

Para facilitar o entendimento das sobrevidas livre de doença, criamos a Tabela 1 relacionando cada um dos marcadores com os grupos criados e se a diferença entre eles é estatisticamente significativa.

Tabela 1 - Resumo dos dados de SLD. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	13	Menor: 75% Maior: 72%	0,117
CD4	32	Menor: 75% Maior: 74%	0,140
CD8	38	Menor: 65% Maior: 61%	0,003
CD68	26	Menor: 80% Maior: 68%	0,004
CD163	4	Menor: 81% Maior: 72%	0,027
FOXP3	0	Menor: 73% Maior: 81%	0,031
PAX5	11	Menor: 65% Maior: 67%	0,158

Ao avaliarmos o imunomarcador CD8, notamos que a alta concentração de células marcadas (mais que 38 células), há uma relação com um pior prognóstico, relacionando-se então com uma maior chance de recorrência da doença.

Já CD68 que é pan-imunomarcador para macrófagos e CD163 que é um marcador de macrófagos de perfil M2, relacionam-se ambos com um pior prognóstico e maior probabilidade de recorrência da doença.

Por fim, FOXP3 é o marcador de linfócito T regulatório e a sua presença está associado com uma menor probabilidade de recorrência da doença, portanto relacionando-se com um melhor prognóstico.

Tabela 2 - Modelo de regressão de Cox univariada para SLD. Em negrito encontram-se os valores estatisticamente significativos.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD3	Acima de 13	1,563	0,804	3,037	0,188
CD4	Acima de 32	1,671	0,767	3,640	0,196
CD8	Acima de 38	2,578	1,359	4,891	0,004
CD68	Acima de 26	2,032	1,211	3,408	0,007
CD163	Acima de 4	1,787	1,062	3,008	0,029
FOXP3	Igual a 0	0,554	0,321	0,955	0,033
PAX5	Acima de 11	1,324	0,535	3,279	0,554

Podemos observar na Tabela 2 da regressão univariada de Cox relacionada à SLD que os marcadores CD8, CD68, CD163 e FOXP3 de comum acordo com as curvas de Kaplan-Meier. Enquanto a presença maciça de CD8 e CD68 dobra as chances de recorrência. Já a infiltração de CD163 aumenta as chances de recorrência em cerca de 75% aproximadamente. Por fim, a presença de FOXP3 diminui as chances de reincidência por volta de 50%.

Tabela 3 – Modelo de regressão de Cox multivariada aplicada à SLD. Usamos como fatores prognósticos o estadiamento clínico, SBR, acometimento linfonodal e subtipo molecular.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	Intervalo de confiança		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD3	Acima de 13	1,527	0,217	1,254	0,146
CD4	Acima de 32	1,402	0,331	1,940	0,624
CD8	Acima de 38	1,750	0,892	3,430	0,103
CD68	Acima de 26	1,058	0,540	2,074	0,869
CD163	Acima de 4	1,550	0,825	2,914	0,173
FOXP3	Igual a 0	0,665	0,341	1,298	0,232
PAX5	Acima de 11	1,138	0,390	3,314	0,813

Nenhum marcador se mostrou como um fator prognóstico independente dos fatores preditivos clássicos.

Apêndice 4 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Luminal A

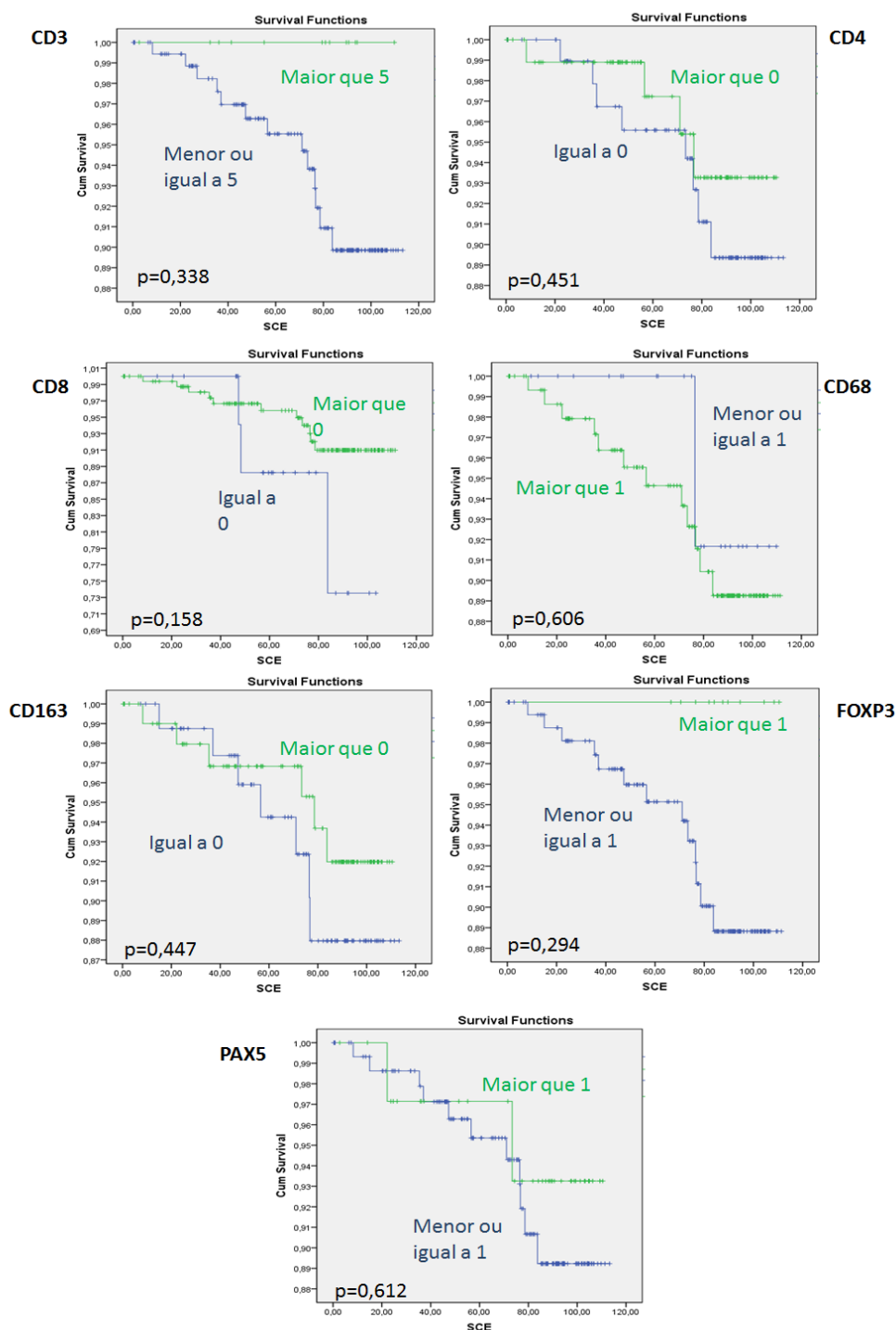


Figura 1 – Curvas de SCE do subtipo LA. CD3 ponto de corte: 5 (p=0,388). CD4: ponto de corte: 0 (p=0,451). CD8: ponto de corte: 0 (p=0,158). CD68: ponto de corte: 1 (p=0,606). CD163: ponto de corte: 0 (p=0,447). FOXP3: ponto de corte: 1 (p=0,294). PAX5: ponto de corte: 1 (p=0,612).

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE do subtipo LA. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	5	Menor: 90% Maior: 100%	0,338
CD4	0	Menor: 89% Maior: 93%	0,451
CD8	0	Menor: 73% Maior: 91%	0,158
CD68	1	Menor: 92% Maior: 89%	0,606
CD163	0	Menor: 88% Maior: 92%	0,447
FOXP3	1	Menor: 88% Maior: 100%	0,294
PAX5	1	Menor: 89% Maior: 93%	0,612

Tabela 2 - Associação dos imunomarcadores avaliados com SCE após avaliação por regressão de Cox univariada do subtipo LA. Na Tabela podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p.

<i>Intervalo de confiança</i>					
<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	Abaixo de 5	0,045	0,257	3,698	0,528
CD4	Igual a 0	0,632	0,190	2,103	0,455
CD8	Igual a 0	0,408	0,113	1,477	0,172
CD68	Acima de 1	1,701	0,221	6,089	0,610
CD163	Igual a 0	0,657	0,220	1,957	0,451
FOXP3	Abaixo de 1	0,440	0,056	3,667	0,492
PAX5	Abaixo de 1	0,678	0,150	3,064	0,614

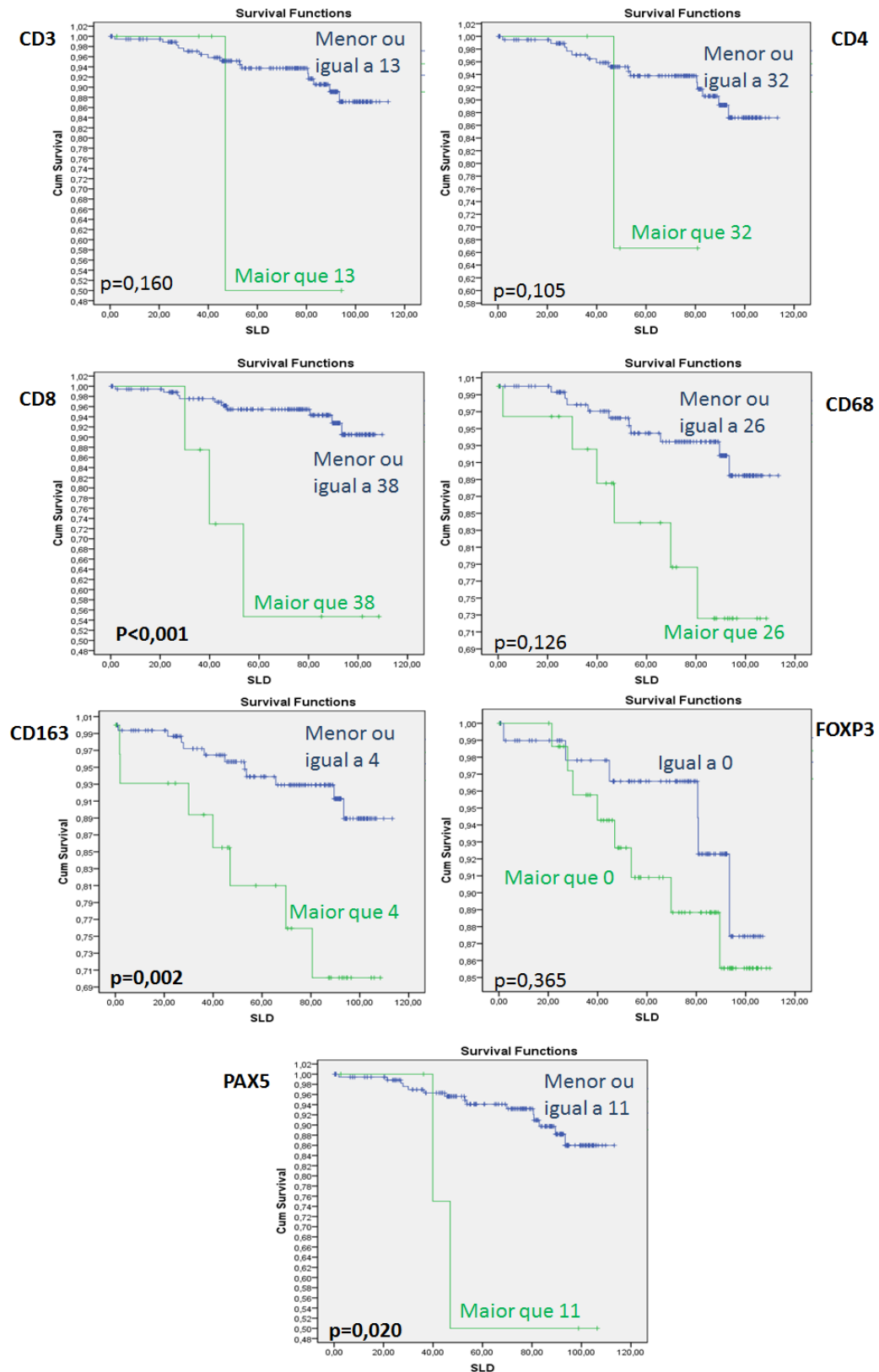


Figura 2 - Curvas de SLD do subtipo LA. CD3 ponto de corte de 1 ($p=0,160$). CD4: ponto de corte de 13 ($p=0,105$). CD8: ponto de corte de 38 ($p<0,001$). CD68: ponto de corte de 26 ($p=0,126$). CD163: ponto de corte de 4 ($p=0,002$). FOXP3: ponto de corte: 0 ($p=0,365$). PAX5: ponto de corte: 11 ($p=0,020$).

Tabela 3 - Resumo dos dados de SLD para LA. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	13	Menor: 86% Maior: 50%	0,160
CD4	32	Menor: 88% Maior: 67%	0,105
CD8	38	Menor: 91% Maior: 55%	<0,001
CD68	26	Menor: 89% Maior: 73%	0,126
CD163	4	Menor: 89% Maior: 70%	0,002
FOXP3	0	Menor: 84% Maior: 86%	0,365
PAX5	11	Menor: 86% Maior: 50%	0,020

Tabela 4 - Modelo de regressão simples de Cox relacionado à SLD para cada um dos imunomarcadores nos casos LA.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Acima de 13	3,866	0,507	29,504	0,192
CD4	Acima de 32	4,657	0,600	36,136	0,141
CD8	Acima de 38	7,367	2,017	26,908	0,003
CD68	Acima de 26	2,384	0,756	7,514	0,138
CD163	Acima de 4	3,387	1,231	9,323	0,018
FOXP3	Igual a 0	1,624	0,563	4,688	0,370
PAX5	Acima de 11	4,888	1,111	21,507	0,036

Apêndice 5 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Luminal A com os pontos de cortes específicos desse subtipo.

Quadro 1 - Relação dos pontos de corte calculados para as curvas de SCEs do subtipo LA.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	0,333
CD4	8,667
CD8	3,333
CD68	3
CD163	1
FOXP3	1,333
PAX5	0

Como foi usada a média da contagem de 3 áreas, a maioria dos pontos de corte se encontram como valores fracionados. Para tornar toda a metodologia viável na rotina clínica arredondamos os valores para o número inteiro mais próximo, tendo os pontos de corte descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Relação dos pontos de corte usados para fazer as curvas de SCEs do subtipo LA.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	0
CD4	9
CD8	3
CD68	3
CD163	1
FOXP3	1
PAX5	0

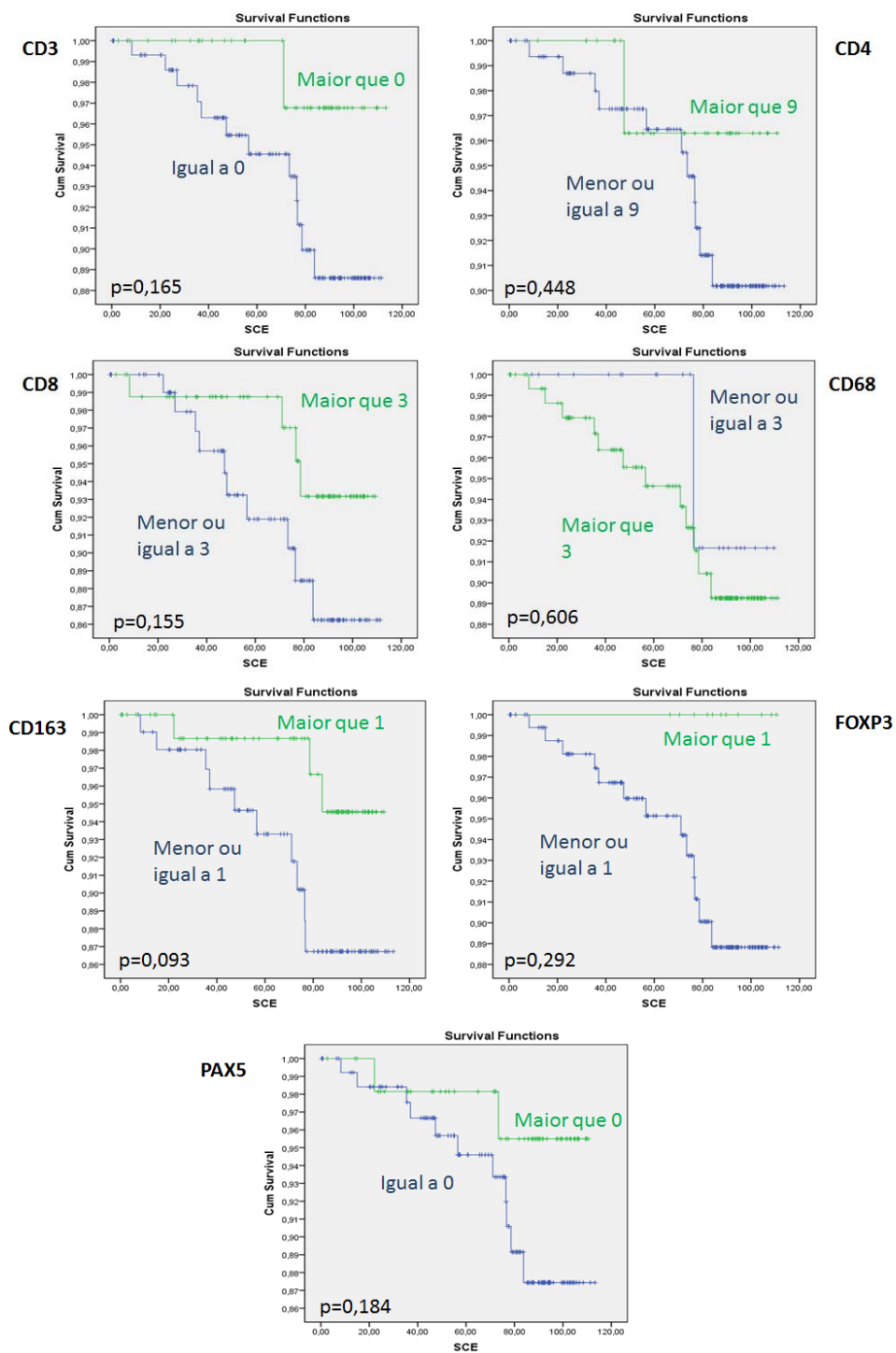


Figura 1 – Curvas de SCE do subtipo LA com pontos de corte específicos.

CD3 ponto de corte: 0 ($p=0,165$). CD4: ponto de corte: 9 ($p=0,448$). CD8: ponto de corte: 3 ($p=0,155$). CD68: ponto de corte: 3 ($p=0,606$). CD163: ponto de corte: 1 ($p=0,093$). FOXP3: ponto de corte: 1 ($p=0,292$). PAX5: ponto de corte: 0 ($p=0,184$).

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE com ponte de corte específico de LA. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	0	Menor: 88% Maior: 100%	0,165
CD4	9	Menor: 90% Maior: 96%	0,448
CD8	3	Menor: 86% Maior: 93%	0,155
CD68	3	Menor: 91% Maior: 88%	0,606
CD163	1	Menor: 86% Maior: 94%	0,093
FOXP3	1	Menor: 89% Maior: 100%	0,292
PAX5	0	Menor: 86% Maior: 95%	0,184

Tabela 2 - Associação dos imunomarcadores avaliados com SCE após avaliação por regressão de Cox univariada para o ponto de corte específico de LA. Podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Abaixo de 0	0,261	0,034	2,008	0,197
CD4	Abaixo de 9	0,462	0,060	3,579	0,459
CD8	Abaixo de 3	0,441	0,138	1,407	0,167
CD68	Acima de 3	1,701	0,221	3,089	0,610
CD163	Abaixo de 1	0,348	0,096	1,266	0,109
FOXP3	Abaixo de 1	0,440	0,056	3,667	0,492
PAX5	Igual a 0	0,374	0,083	1,691	0,202

Quadro 3 - Relação dos pontos de corte calculados para as curvas de SLD do subtipo LA.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para recidiva</i>
CD3	1,333
CD4	13,333
CD8	29
CD68	48,667
CD163	3,667
FOXP3	1,333
PAX5	1

Como foi usada a média da contagem de 3 áreas, a maioria dos pontos de corte se encontram como valores fracionados. Para tornar toda a metodologia viável na rotina clínica arredondamos os valores para o número inteiro mais próximo, tendo os pontos de corte descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Relação dos pontos de corte usados para fazer as curvas de SLD do subtipo LA.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para recidiva</i>
CD3	1
CD4	13
CD8	29
CD68	49
CD163	4
FOXP3	1
PAX5	1

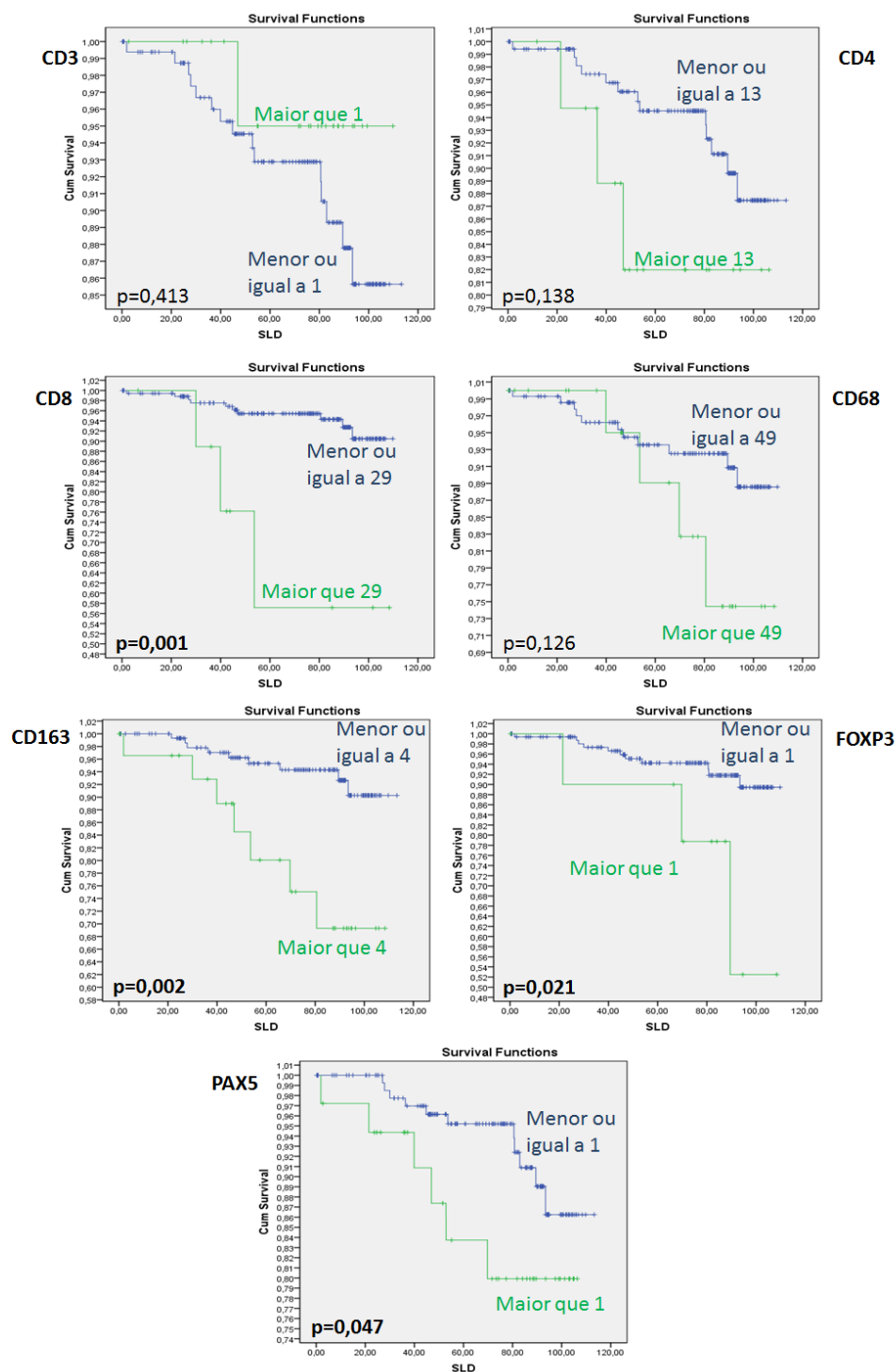


Figura 2 – Curvas de SLD do subtipo LA com pontos de corte específicos. CD3 ponto de corte: 1 ($p=0,413$). CD4: ponto de corte: 13 ($p=0,138$). CD8 ponto de corte: 29 ($p=0,001$). CD68 ponto de corte: 49 ($p=0,126$). CD163: ponto de corte: 4 ($p=0,002$). FOXP3: ponto de corte: 1 ($p=0,021$). PAX5: ponto de corte: 1 ($p=0,047$).

Tabela 3 - Resumo dos dados de SLD com pontos específicos de LA. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	1	Menor: 85% Maior: 95%	0,413
CD4	13	Menor: 86% Maior: 83%	0,138
CD8	29	Menor: 91% Maior: 57%	0,001
CD68	49	Menor: 88% Maior: 74%	0,126
CD163	4	Menor: 91% Maior: 69%	0,002
FOXP3	1	Menor: 91% Maior: 52%	0,021
PAX5	1	Menor: 86% Maior: 80%	0,047

Tabela 4 - Associação dos imunomarcadores avaliados com SLD após avaliação por regressão de Cox univariada. Na Tabela podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Abaixo de 1	0,439	0,058	3,329	0,426
CD4	Acima de 13	2,512	0,711	8,873	0,152
CD8	Acima de 29	6,732	1,838	24,654	0,004
CD68	Acima de 49	2,384	0,756	7,514	0,138
CD163	Acima de 4	3,387	1,231	9,323	0,018
FOXP3	Acima de 1	4,037	1,124	14,499	0,032
PAX5	Acima de 1	2,273	0,840	6,151	0,076

Apêndice 6 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Luminal B

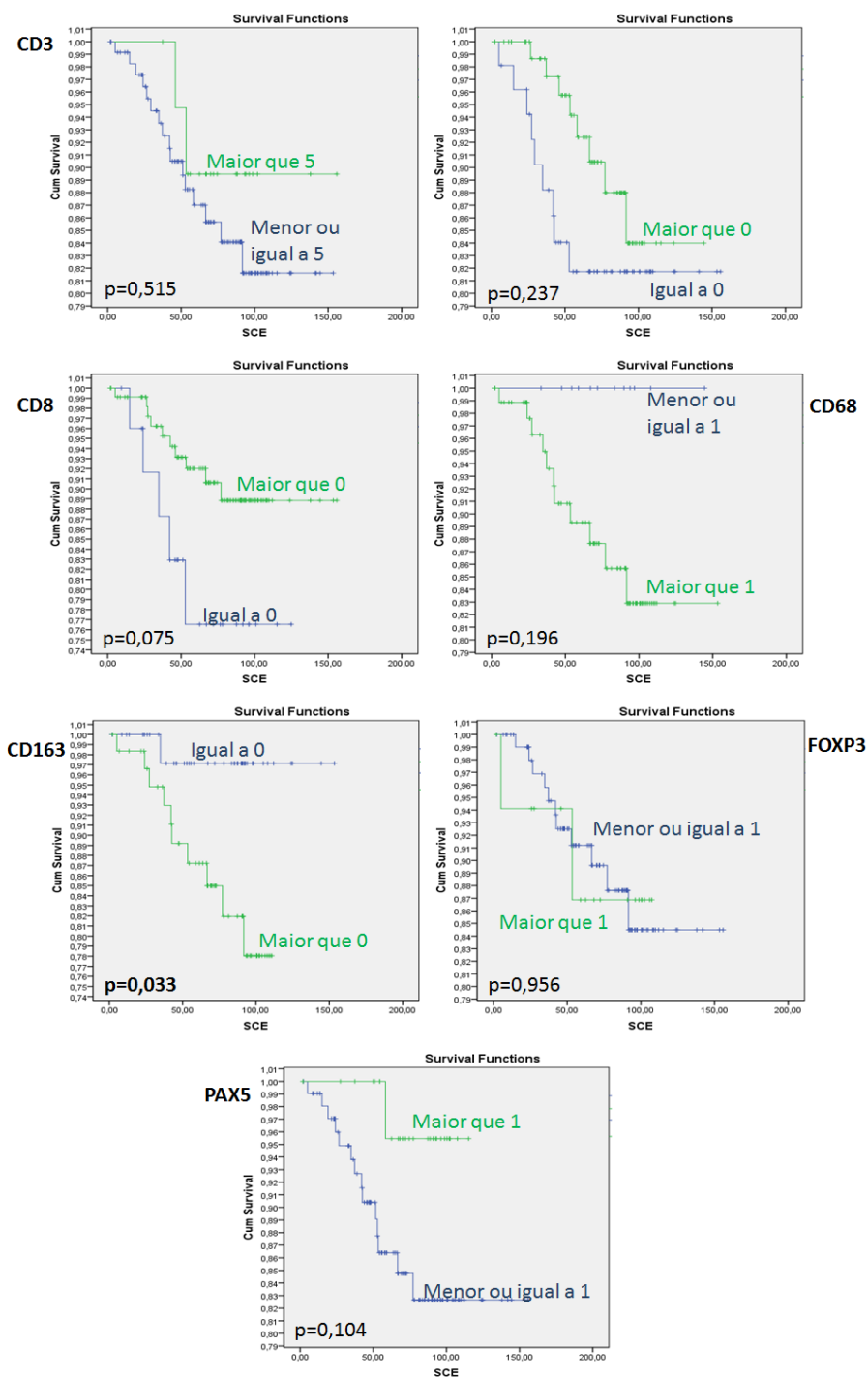


Figura 1 – Curvas de SCE do subtipo LB. CD3: ponto de corte: 5 (p=0,515). CD4: ponto de corte: 0 (p=0,237). CD8: ponto de corte: 0 (p=0,075). CD68: ponto de corte: 1 (p=0,196). CD163: ponto de corte: 0 (p=0,033). FOXP3: ponto de corte: 1 (p=0,956). PAX5: ponto de corte: 1 (p=0,104).

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE do subtipo LB. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	5	Menor: 81% Maior: 89%	0,515
CD4	0	Menor: 81% Maior: 85%	0,237
CD8	0	Menor: 76% Maior: 88%	0,075
CD68	1	Menor: 100% Maior: 83%	0,196
CD163	0	Menor: 97% Maior: 78%	0,033
FOXP3	1	Menor: 84% Maior: 91%	0,956
PAX5	1	Menor: 82% Maior: 96%	0,104

Tabela 2 - Associação dos imunomarcadores avaliados com SCE após avaliação por regressão de Cox univariada. Podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Abaixo de 5	0,617	0,142	2,683	0,519
CD4	Igual a 0	0,509	0,194	1,337	0,171
CD8	Igual a 0	0,390	0,133	1,142	0,086
CD68	Acima de 1	3,767	1,029	22,078	0,460
CD163	Acima de 0	4,513	0,459	3,370	0,052
FOXP3	Abaixo de 1	0,944	0,231	4,717	0,956
PAX5	Abaixo de 1	0,217	0,028	1,650	0,140

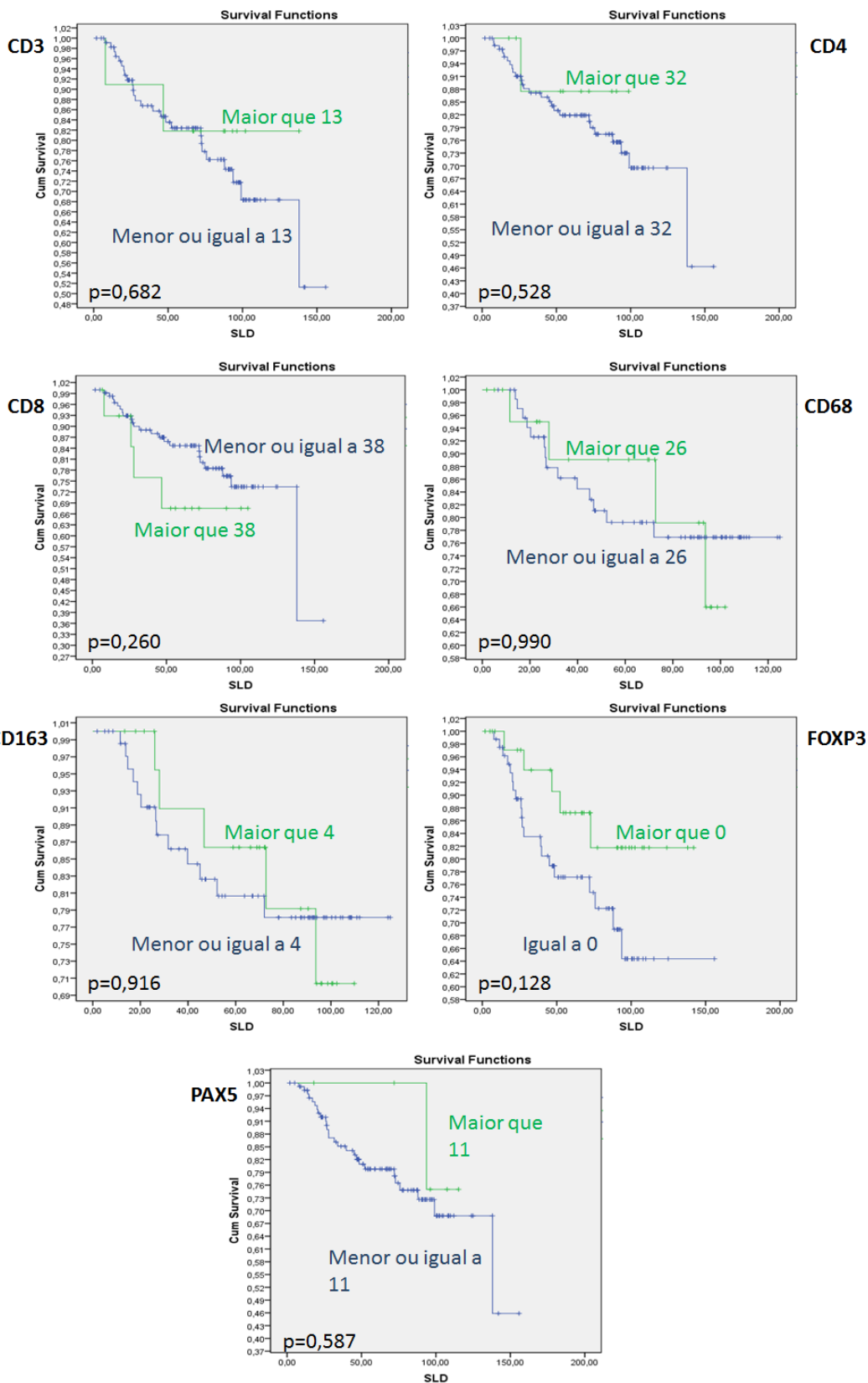


Figura 2 - Curvas de SLD do subtipo Luminal B. CD3 ponto de corte de 13 ($p=0,682$). CD4: ponto de corte de 32 ($p=0,528$). CD8: ponto de corte de 38 ($p=0,260$). CD68: ponto de corte de 26 ($p=0,990$). CD163: ponto de corte de 4 ($p=0,916$). FOXP3: ponto de corte: 0 ($p=0,128$). PAX5: ponto de corte: 11 ($p=0,587$).

Tabela 3 - Resumo dos dados de SLD. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	13	Menor: 51% Maior: 82%	0,682
CD4	32	Menor: 46% Maior: 88%	0,528
CD8	38	Menor: 76% Maior: 67%	0,260
CD68	26	Menor: 76% Maior: 66%	0,990
CD163	4	Menor: 78% Maior: 71%	0,916
FOXP3	0	Menor: 64% Maior: 82%	0,128
PAX5	11	Menor: 46% Maior: 77%	0,587

Tabela 4 - Modelo de regressão de Cox univariado relacionado à SLD para cada um dos imunomarcadores.

Marcadores	Grupo de risco	Risco Relativo	<i>Intervalo de confiança</i>		Valor de p
			Inferior	Superior	
CD3	Abaixo de 13	0,741	0,175	3,130	0,683
CD4	Abaixo de 32	0,531	0,072	3,930	0,535
CD8	Acima de 38	1,831	0,629	5,333	0,267
CD68	Acima de 26	1,424	0,562	3,609	0,456
CD163	Acima de 4	1,146	0,337	2,657	0,916
FOXP3	Igual a 0	0,944	0,231	4,717	0,956
PAX5	Abaixo de 11	0,578	0,078	4,281	0,592

Apêndice 7 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Luminal B com os pontos de cortes específicos desse subtipo.

Quadro 1 - Relação dos pontos de corte calculados para as curvas de SCEs do subtipo LB.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	20
CD4	0,333
CD8	0,667
CD68	7
CD163	0,333
FOXP3	1,333
PAX5	0,667

Como foi usada a média da contagem de 3 áreas, a maioria dos pontos de corte se encontram como valores fracionados. Para tornar toda a metodologia viável na rotina clínica arredondamos os valores para o número inteiro mais próximo, tendo os pontos de corte descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Relação dos pontos de corte usados para fazer as curvas de SCEs do subtipo LB.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	20
CD4	0
CD8	1
CD68	7
CD163	0
FOXP3	1
PAX5	1

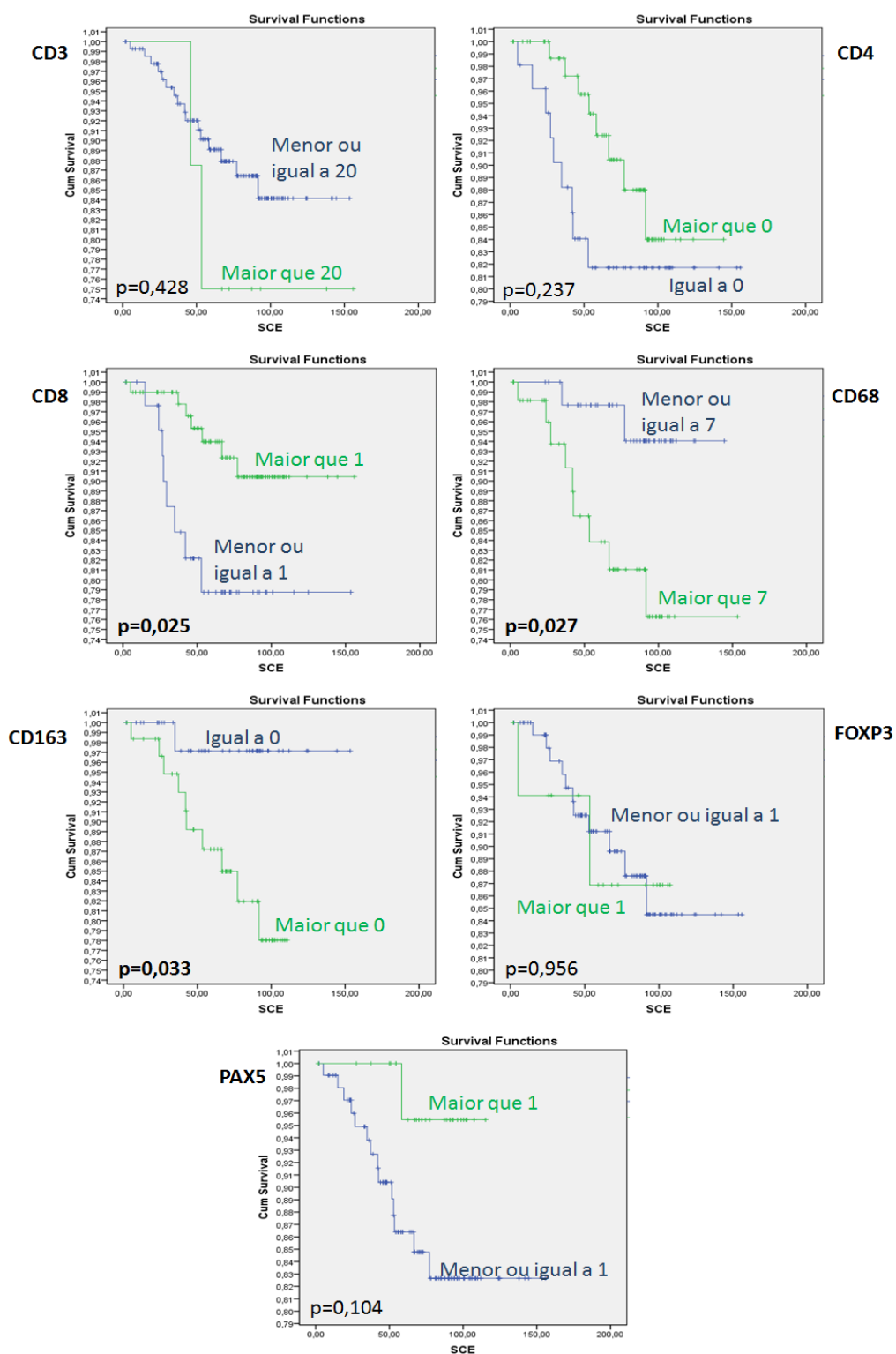


Figura 1 – Curvas de SCE do subtipo LB. CD3: ponto de corte: 20 ($p=0,428$). CD4: ponto de corte: 0 ($p=0,237$). CD8: ponto de corte: 1 (**$p=0,025$**). CD68: ponto de corte: 7 (**$p=0,027$**). CD163: ponto de corte: 0 (**$p=0,033$**). FOXP3: ponto de corte: 1 ($p=0,956$). PAX5: ponto de corte: 1 ($p=0,104$).

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE do subtipo LB. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	20	Menor: 84% Maior: 75%	0,428
CD4	0	Menor: 81% Maior: 84%	0,237
CD8	1	Menor: 78% Maior: 91%	0,025
CD68	7	Menor: 94% Maior: 76%	0,027
CD163	0	Menor: 97% Maior: 78%	0,033
FOXP3	1	Menor: 85% Maior: 87%	0,956
PAX5	1	Menor: 82% Maior: 95%	0,104

Tabela 2 - Associação dos imunomarcadores avaliados com SCE após avaliação por regressão de Cox univariada. Podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Acima de 20	1,797	0,413	7,819	0,435
CD4	Igual a 0	0,567	0,219	1,470	0,243
CD8	Abaixo de 1	0,331	0,120	0,916	0,033
CD68	Acima de 7	4,767	1,029	22,078	0,046
CD163	Acima de 0	4,513	0,557	35,271	0,051
FOXP3	Abaixo de 1	0,944	0,231	4,717	0,956
PAX5	Abaixo de 1	0,217	0,028	1,650	0,140

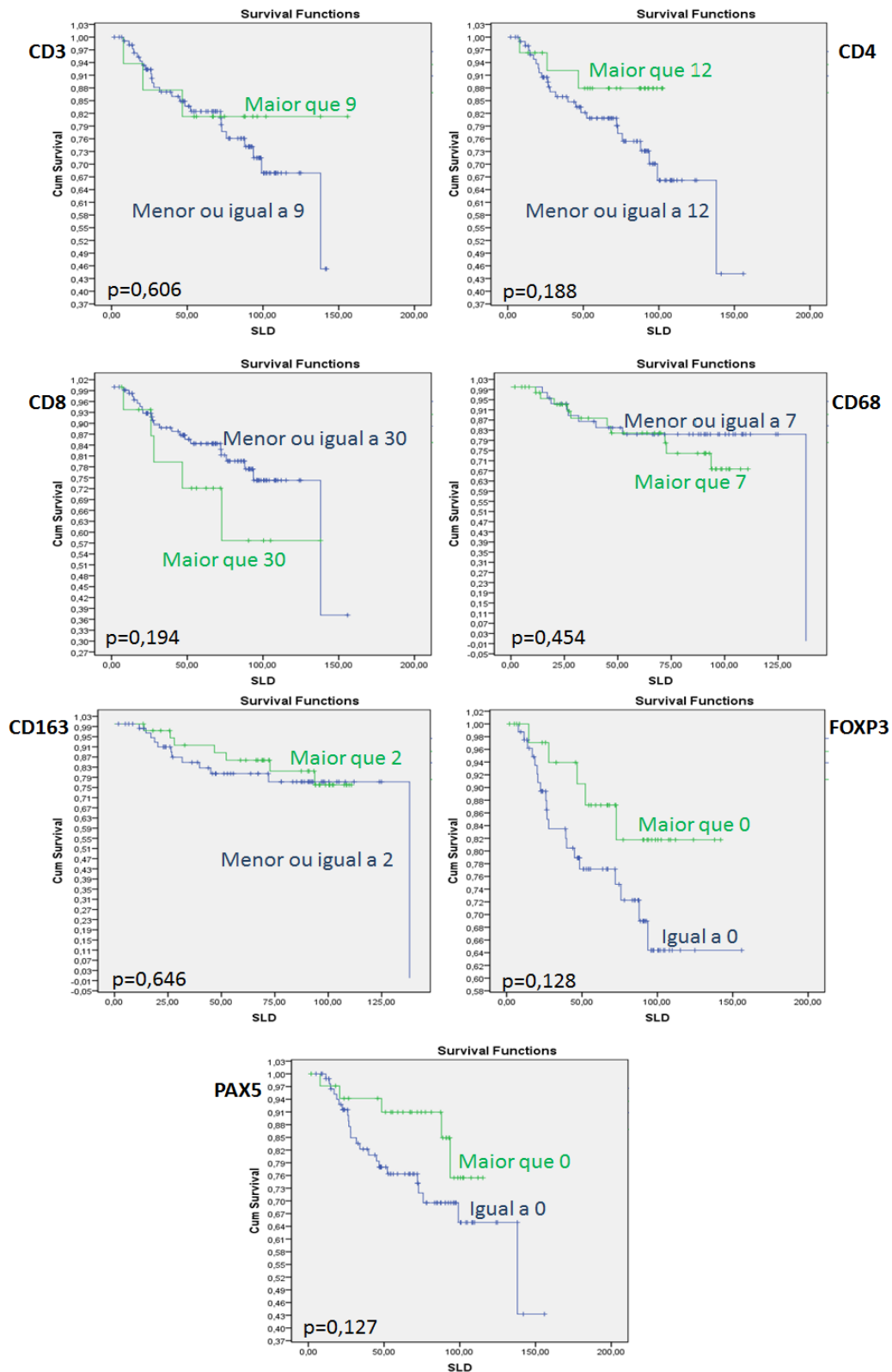


Figura 2 - Curvas de SLD do subtipo Luminal B. CD3 ponto de corte de 9 (p=0,606). CD4: ponto de corte de 12 (p=0,188). CD8: ponto de corte de 30 (p=0,194). CD68: ponto de corte de 7 (p=0,454). CD163: ponto de corte de 2 (p=0,646). FOXP3: ponto de corte: 0 (p=0,128). PAX5: ponto de corte: 0 (0,127).

Tabela 3 - Resumo dos dados de SLD. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	9	Menor: 44% Maior: 82%	0,606
CD4	12	Menor: 42% Maior: 88%	0,188
CD8	30	Menor: 37% Maior: 57%	0,194
CD68	7	Menor: 81% Maior: 68%	0,454
CD163	2	Menor: 74% Maior: 75%	0,646
FOXP3	0	Menor: 64% Maior: 82%	0,128
PAX5	0	Menor: 43% Maior: 76%	0,127

Tabela 4 - Modelo de regressão de Cox univariado relacionado à SLD para cada um dos imunomarcadores.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Abaixo de 9	0,730	0,220	2,424	0,608
CD4	Abaixo de 12	0,455	0,137	1,517	0,200
CD8	Abaixo de 30	0,890	0,712	5,019	0,201
CD68	Acima de 7	1,424	0,562	3,609	0,456
CD163	Abaixo de 2	0,800	0,309	2,071	0,646
FOXP3	Igual a 0	0,475	0,178	1,267	0,137
PAX5	Igual a 0	0,477	0,180	1,261	0,135

Apêndice 8 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Triplo Negativo.

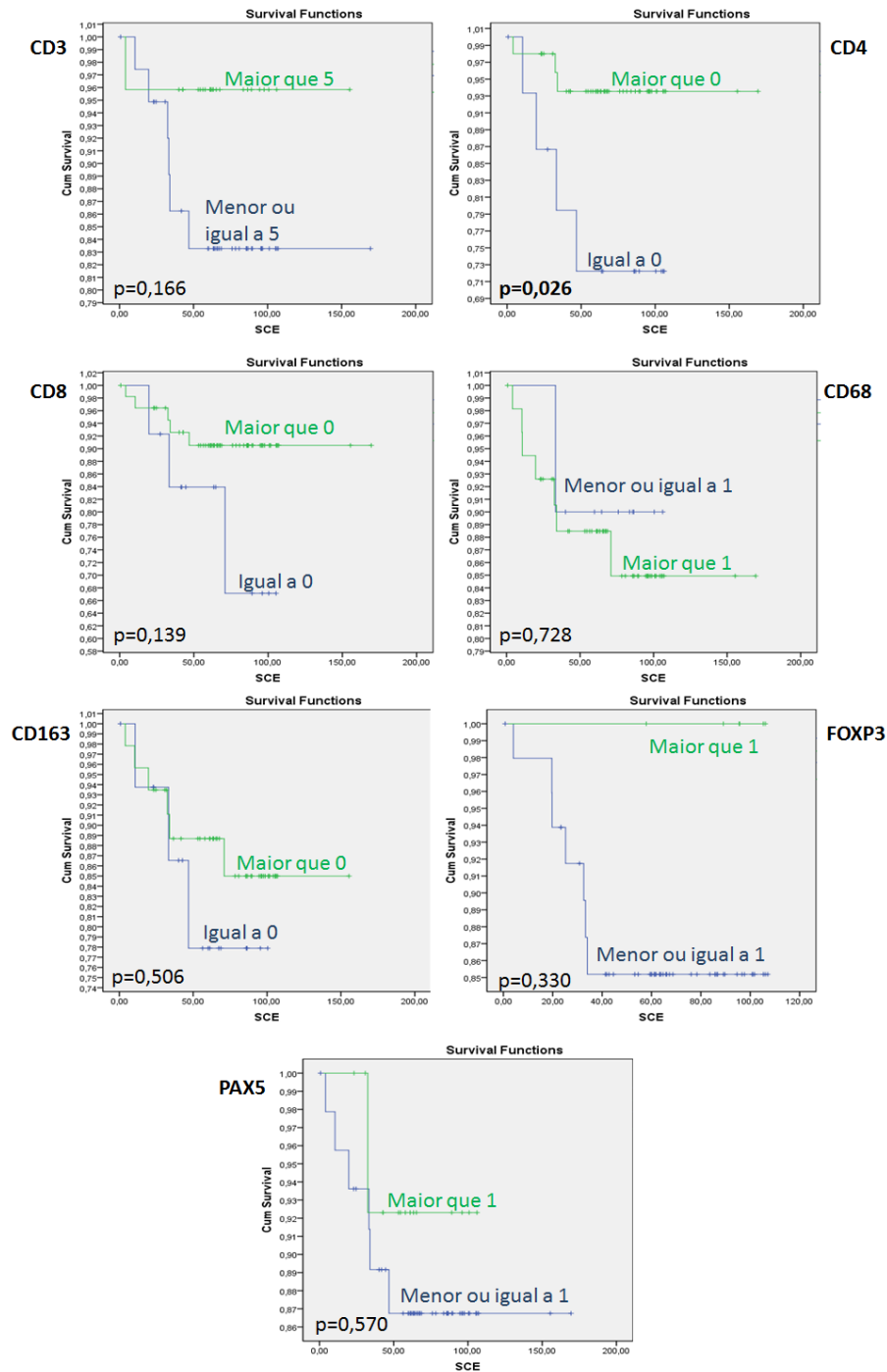


Figura 1 – Curvas de SCE do subtipo Triplo Negativo. CD3 ponto de corte: 5 (p=0,166). CD4: ponto de corte: 0 (**p=0,026**). CD8: ponto de corte: 0 (p=0,139). CD68: ponto de corte: 1 (p=0,728). CD163: ponto de corte: 0 (p=0,506). FOXP3: ponto de corte: 1 (p=0,330). PAX5: ponto de corte: 1 (p=0,570).

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	5	Menor: 83% Maior: 96%	0,166
CD4	0	Menor: 72% Maior: 94%	0,026
CD8	0	Menor: 67% Maior: 90%	0,139
CD68	1	Menor: 90% Maior: 85%	0,728
CD163	0	Menor: 78% Maior: 85%	0,506
FOXP3	1	Menor: 85% Maior: 100%	0,330
PAX5	1	Menor: 86% Maior: 92%	0,570

Tabela 2 - Associação dos imunomarcadores avaliados com SCE após avaliação por regressão de Cox univariada. Na Tabela podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Abaixo que 5	0,251	0,030	2,085	0,200
CD4	Igual a 0	0,213	0,048	0,951	0,043
CD8	Igual a 0	0,355	0,085	1,489	0,157
CD68	Maior que 1	1,448	0,178	11,778	0,729
CD163	Igual a 0	0,626	0,155	2,519	0,509
FOXP3	Abaixo de 1	0,041	0,085	5,066	0,531
PAX5	Abaixo de 1	0,546	0,066	4,541	0,576

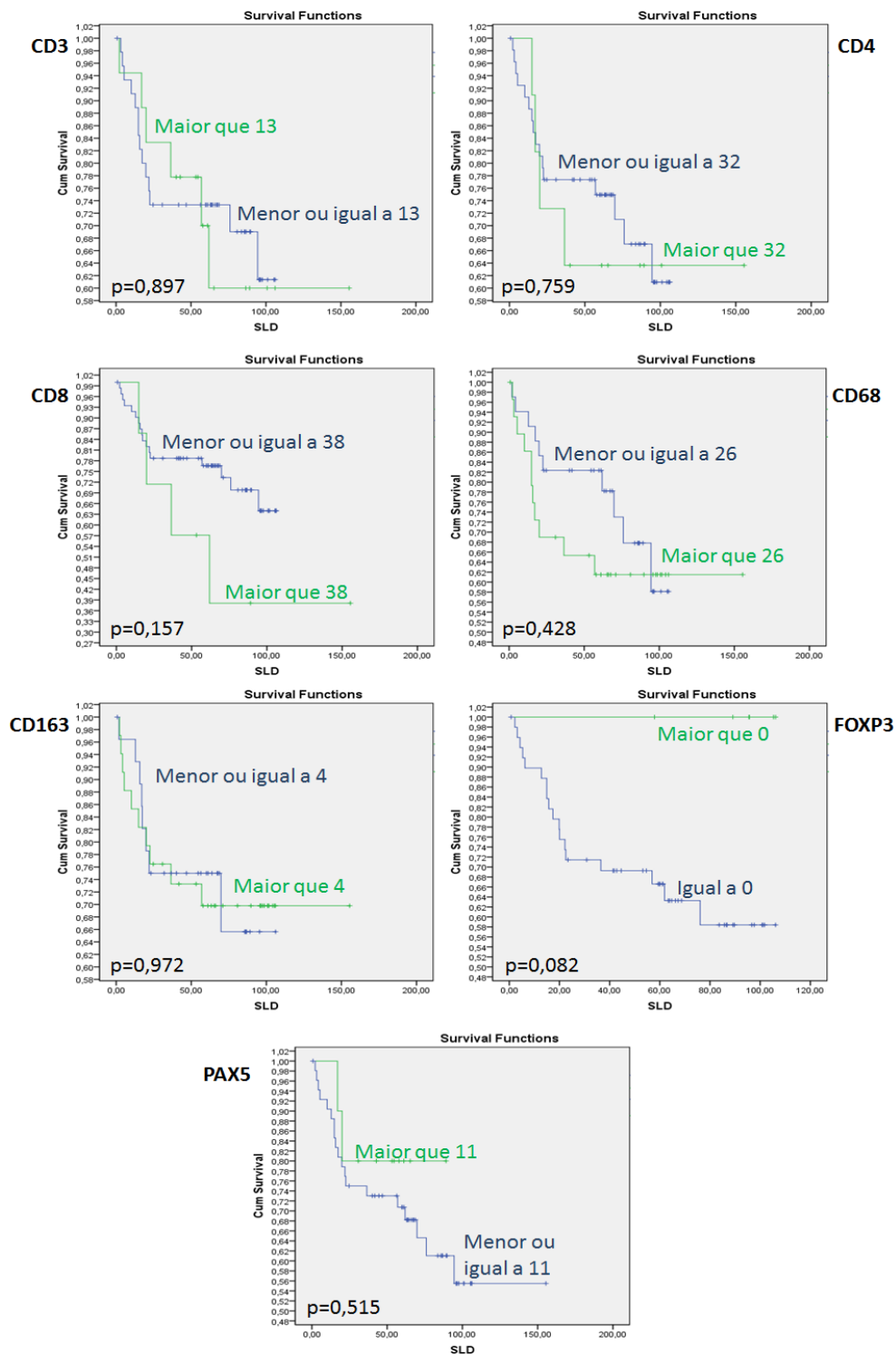


Figura 2 - Curvas de SLD do subtipo Triplo Negativo. CD3 ponto de corte de 13 ($p=0,897$). CD4: ponto de corte de 32 ($p=0,759$). CD8: ponto de corte de 38 ($p=0,157$). CD68: ponto de corte de 26 ($p=0,428$). CD163: ponto de corte de 4 ($p=0,972$). FOXP3: ponto de corte de 0 ($p=0,082$). PAX5: ponto de corte: 11 (0,515).

Tabela 3 - Resumo dos dados de SLD. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	13	Menor: 62% Maior: 60%	0,897
CD4	32	Menor: 61% Maior: 64%	0,759
CD8	38	Menor: 63% Maior: 37%	0,157
CD68	26	Menor: 58% Maior: 61%	0,428
CD163	4	Menor: 66% Maior: 70%	0,927
FOXP3	0	Menor: 58% Maior: 100%	0,082
PAX5	11	Menor: 55% Maior: 80%	0,515

Tabela 4 - Valores da regressão simples de Cox relacionado à SLD para cada um dos imunomarcadores.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Acima de 13	1,065	0,409	2,778	0,897
CD4	Acima de 32	1,186	0,396	3,550	0,760
CD8	Acima de 38	2,156	0,724	6,417	0,167
CD68	Acima de 26	1,412	0,599	3,329	0,431
CD163	Abaixo de 4	0,984	0,388	2,496	0,972
FOXP3	Igual a 0	0,038	0,032	12,438	0,269
PAX5	Abaixo de 11	0,617	0,142	2,679	0,520

Apêndice 9 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo Triplo Negativo com os pontos de corte específicos desse subtipo.

Quadro 1 - Relação dos pontos de corte calculados para as curvas de SCEs do subtipo TN.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	0
CD4	1,333
CD8	6,333
CD68	7
CD163	83
FOXP3	0
PAX5	3,33

Como foi usada a média da contagem de 3 áreas, a maioria dos pontos de corte se encontram como valores fracionados. Para tornar toda a metodologia viável na rotina clínica arredondamos os valores para o número inteiro mais próximo, tendo os pontos de corte descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Relação dos pontos de corte usados para fazer as curvas de SCEs do subtipo TN.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte para óbito</i>
CD3	0
CD4	1
CD8	6
CD68	7
CD163	83
FOXP3	0
PAX5	3

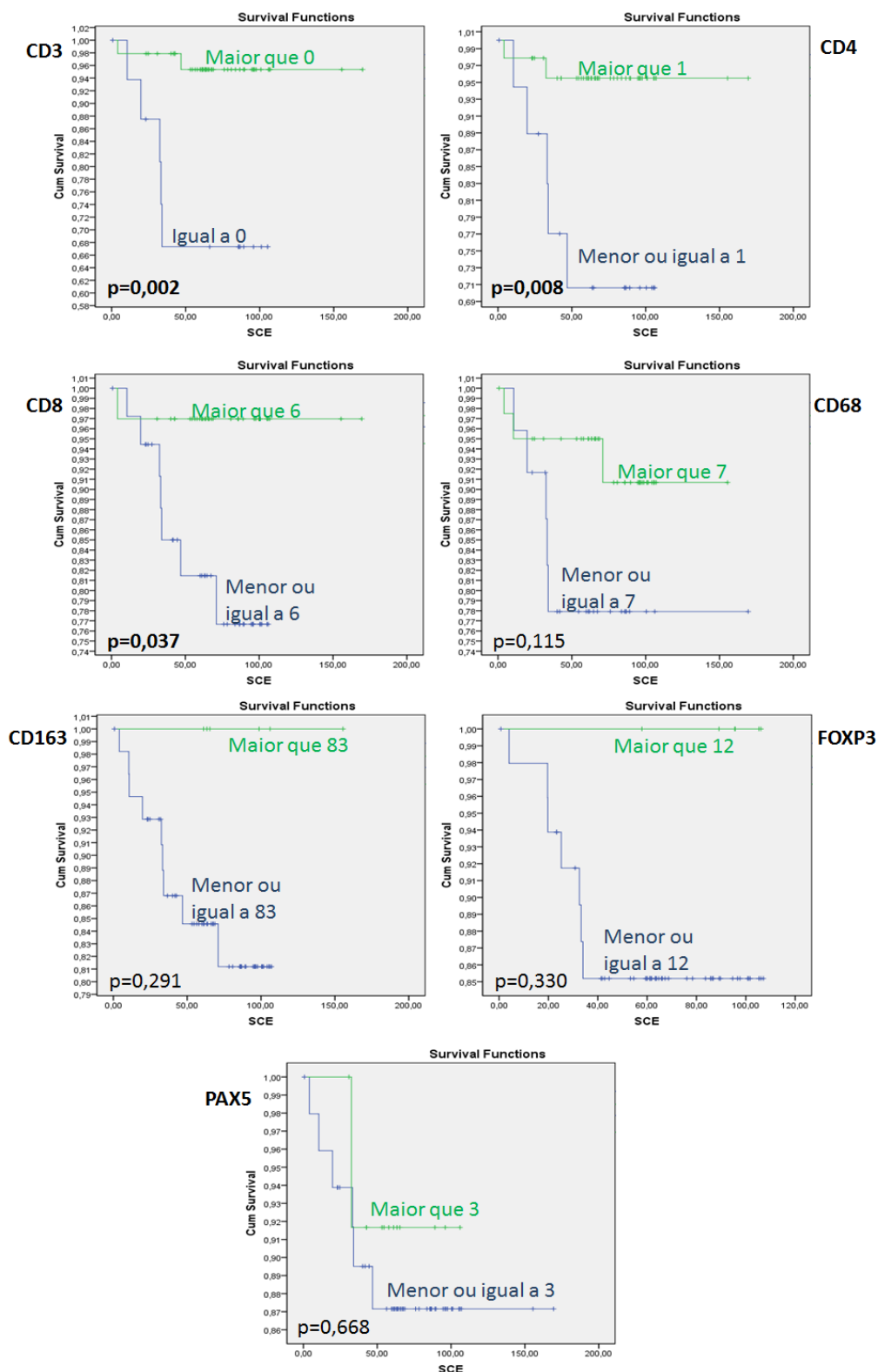


Figura 1 – Curvas de SCE do subtipo Triplo Negativo. CD3 ponto de corte: 0 ($p=0,002$). CD4: ponto de corte: 1 ($p=0,008$). CD8: ponto de corte: 6 ($p=0,037$). CD68: ponto de corte: 7 ($p=0,115$). CD163: ponto de corte: 0 ($p=0,291$). FOXP3: ponto de corte: 12 ($p=0,330$). PAX5: ponto de corte: 1 ($p=0,668$).

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	0	Menor: 67% Maior: 96%	0,002
CD4	1	Menor: 71% Maior: 96%	0,008
CD8	6	Menor: 76% Maior: 97%	0,037
CD68	7	Menor: 78% Maior: 90%	0,115
CD163	83	Menor: 81% Maior: 100%	0,291
FOXP3	12	Menor: 85% Maior: 100%	0,330
PAX5	3	Menor: 87% Maior: 91%	0,668

Tabela 2 - Associação dos imunomarcadores avaliados com SCE após avaliação por regressão de Cox univariada. Na Tabela podemos observar os pontos de corte de cada marcador, o grupo de maior risco em relação ao ponto de corte, o risco relativo, o intervalo de confiança e o valor de p.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Igual a 0	0,119	0,023	0,616	0,011
CD4	Abaixo de 1	0,146	0,028	0,752	0,021
CD8	Abaixo de 6	0,146	0,018	1,186	0,072
CD68	Abaixo de 7	0,333	0,079	1,399	0,133
CD163	Abaixo de 83	0,442	0,211	9,539	0,496
FOXP3	Abaixo de 12	0,455	0,365	8,066	0,531
PAX5	Abaixo de 3	0,632	0,076	5,250	0,671

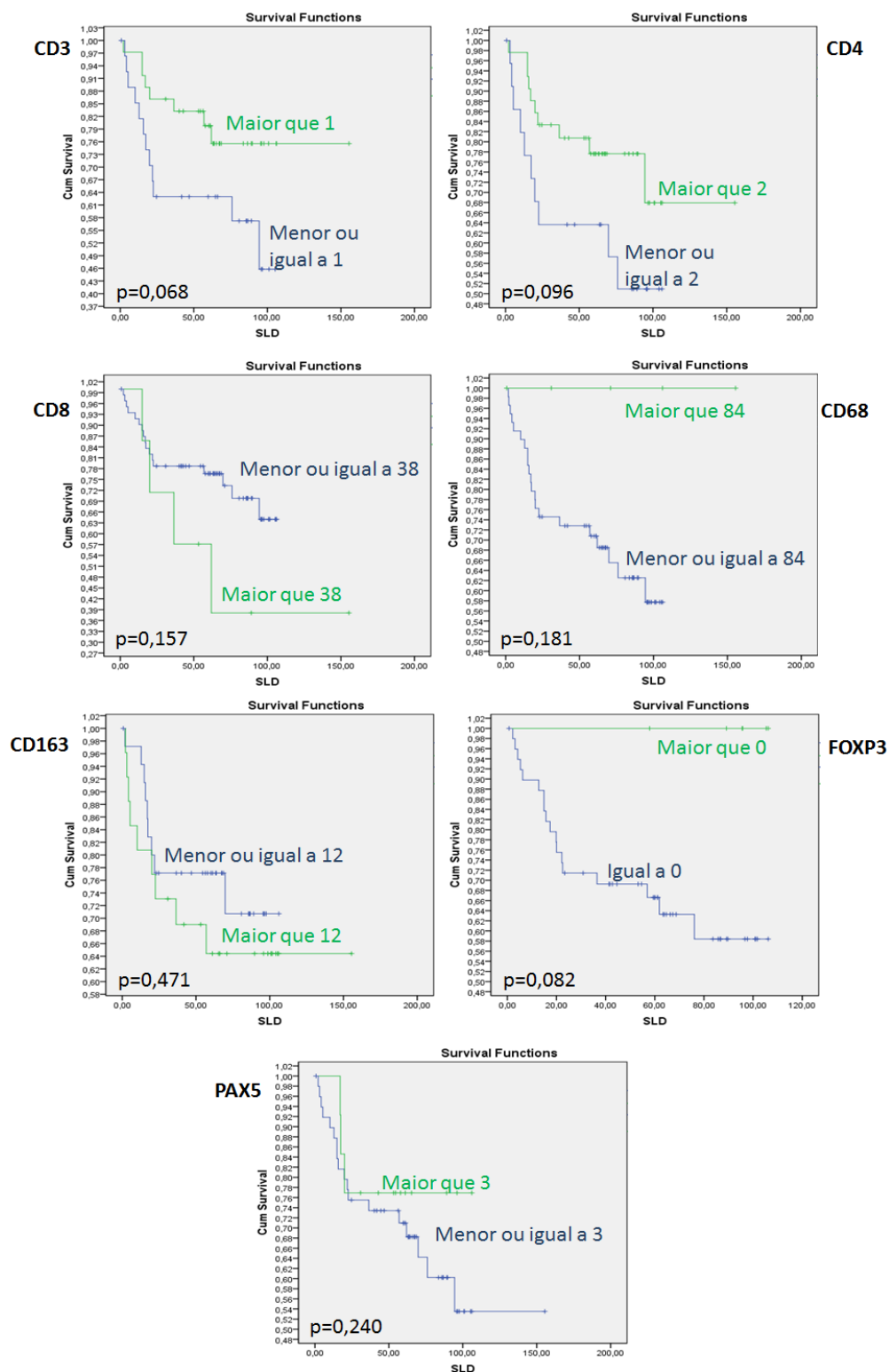


Figura 2 - Curvas de SLD do subtipo Triplo Negativo. CD3 ponto de corte de 1 (p=0,068). CD4: ponto de corte de 2 (p=0,096). CD8: ponto de corte de 38 (p=0,157). CD68: ponto de corte de 84 (p=0,181). CD163: ponto de corte de 12 (p=0,471). FOXP3: ponto de corte: 0 (p=0,082). PAX5: ponto de corte: 3 (0,240).

Tabela 3 - Resumo dos dados de SLD. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	1	Menor: 46% Maior: 76%	0,068
CD4	2	Menor: 51% Maior: 77%	0,096
CD8	38	Menor: 64% Maior: 38%	0,157
CD68	84	Menor: 57% Maior: 100%	0,181
CD163	12	Menor: 71% Maior: 65%	0,471
FOXP3	0	Menor: 58% Maior: 100%	0,082
PAX5	3	Menor: 53% Maior: 77%	0,240

Tabela 4 - Modelo de regressão de Cox univariado relacionado à SLD para cada um dos imunomarcadores.

<i>Marcadores</i>	<i>Grupo de risco</i>	<i>Risco Relativo</i>	<i>Intervalo de confiança</i>		<i>Valor de p</i>
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	
CD3	Abaixo de 1	0,444	0,181	1,088	0,076
CD4	Abaixo de 2	0,482	0,200	1,162	0,104
CD8	Acima de 38	2,156	0,724	6,417	0,167
CD68	Abaixo de 84	0,460	0,589	9,855	0,383
CD163	Acima de 12	1,403	0,557	3,538	0,473
FOXP3	Igual a 0	0,038	0,032	12,438	0,269
PAX5	Abaixo de 3	0,640	0,188	2,178	0,475

Apêndice 10 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo HER2

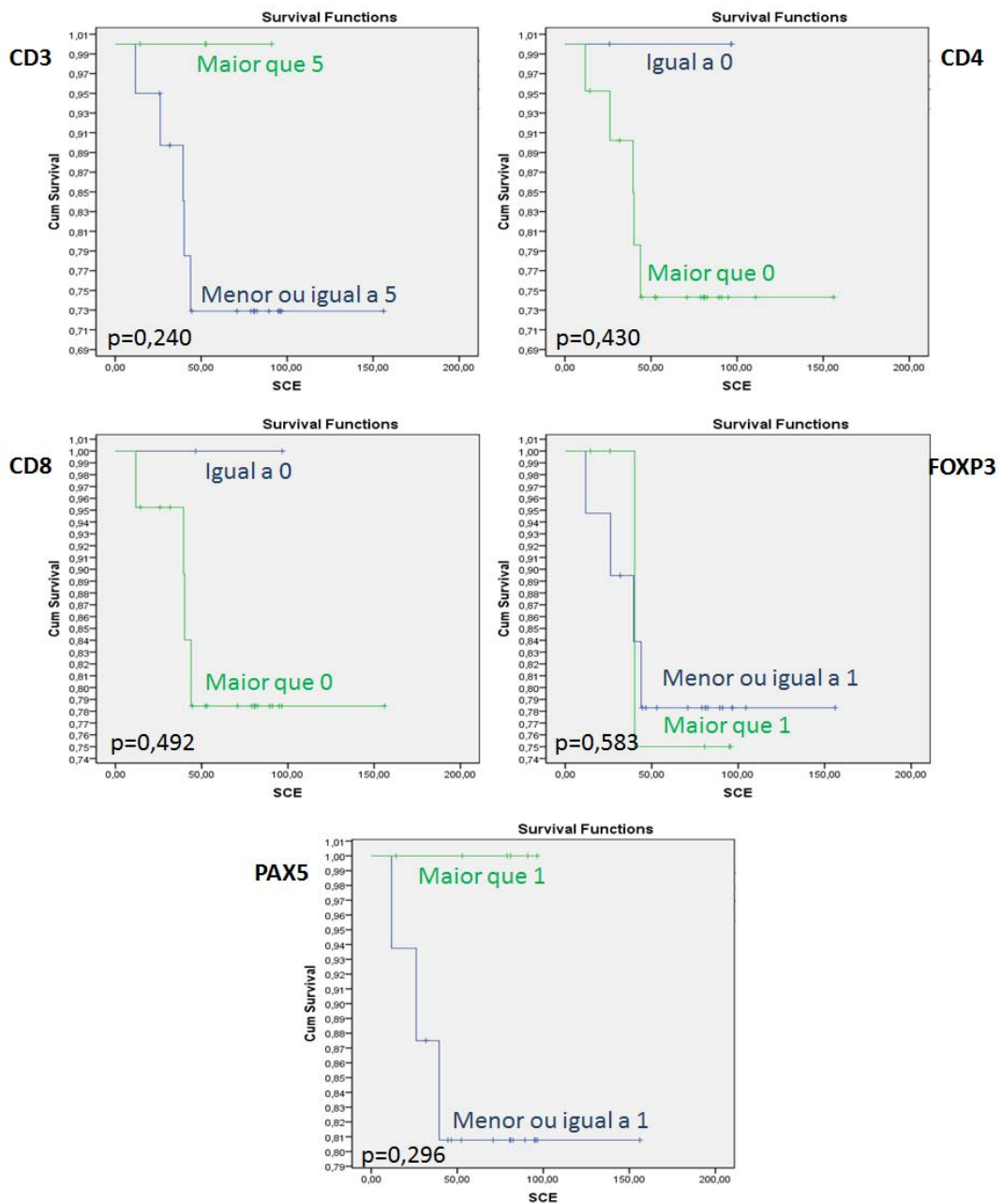


Figura 12 - Curvas de SCE do subtipo HER2. CD3. CD3 ponto de corte: 0 (p=0,240). CD4: ponto de corte: 0 (p=0,430). CD8: ponto de corte: 0 (p=0,492). FOXP3: ponto de corte: 1 (p=0,583). PAX5: ponto de corte: 1 (p=0,296). Não foi possível gerar estatística de CD68 e CD163 pois todos os dados são censurados.

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	5	Menor: 72% Maior: 100%	0,240
CD4	0	Menor: 100% Maior: 72%	0,430
CD8	0	Menor: 100% Maior: 78%	0,492
FOXP3	1	Menor: 78% Maior: 75%	0,999
PAX5	1	Menor: 81% Maior: 100%	0,296

Não foi possível realizar o modelo de regressão de Cox univariado pois há poucas amostras nos grupos.

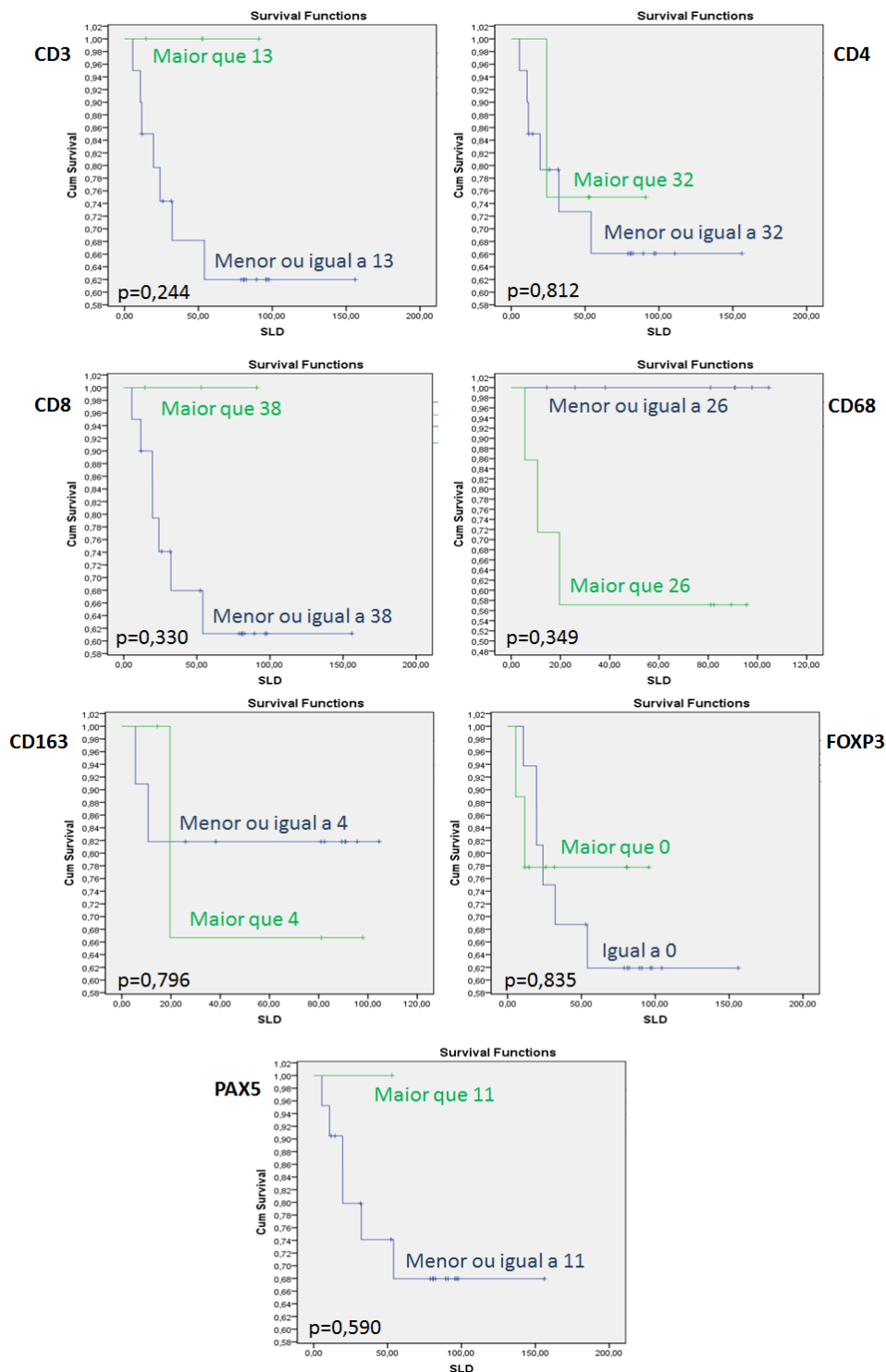


Figura 2 - Curvas de SLD do subtipo HER2. CD3 ponto de corte de 13 ($p=0,244$). CD4: ponto de corte de 32 ($p=0,812$). CD8: ponto de corte de 38 ($p=0,330$). CD68: ponto de corte de 26 ($p=0,349$). CD163: ponto de corte de 4 ($p=0,796$). FOXP3: ponto de corte: 0 ($p=0,835$). PAX5: ponto de corte: 11 (0,590).

Tabela 2 - Resumo dos dados de SLD. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	13	Menor: 62% Maior: 100%	0,244
CD4	32	Menor: 66% Maior: 75%	0,812
CD8	38	Menor: 61% Maior: 100%	0,330
CD68	26	Menor: 100% Maior: 57%	0,349
CD163	4	Menor: 81% Maior: 67%	0,796
FOXP3	0	Menor: 62% Maior: 78%	0,835
PAX5	11	Menor: 68% Maior: 100%	0,590

Não foi possível realizar o modelo de regressão de Cox univariado pois há poucas amostras nos grupos.

Apêndice 11 - Curvas de SCE e SLD e modelo de regressão de Cox univariado para o subtipo HER2

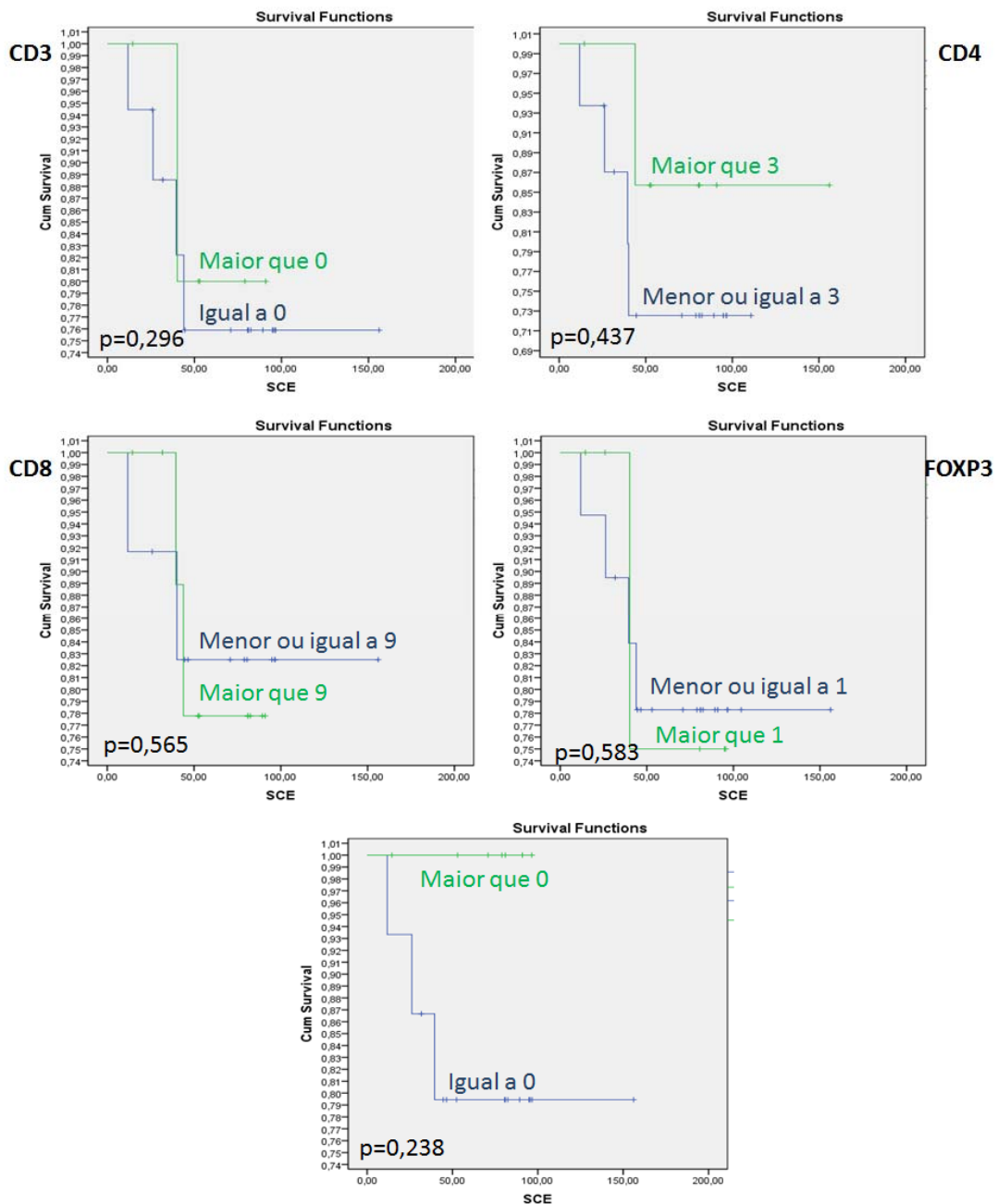


Figura 1 - Curvas de SCE do subtipo HER2. CD3: CD3 ponto de corte: 0 ($p=0,296$). CD4: ponto de corte: 3 ($p=0,437$). CD8: ponto de corte: 9 ($p=0,565$). FOXP3: ponto de corte: 1 ($p=0,583$). PAX5: ponto de corte: 0 ($p=0,238$). Não foi possível gerar estatística de CD68 e CD163 pois todos os dados são censurados.

Tabela 1 - Resumo dos dados de SCE. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos.

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	0	Menor: 75% Maior: 80%	0,296
CD4	3	Menor: 72% Maior: 86%	0,437
CD8	9	Menor: 82% Maior: 78%	0,565
FOXP3	1	Menor: 78% Maior: 75%	0,583
PAX5	0	Menor: 79% Maior: 100%	0,238

Não foi possível realizar o modelo de regressão de Cox univariado pois há poucas amostras nos grupos.

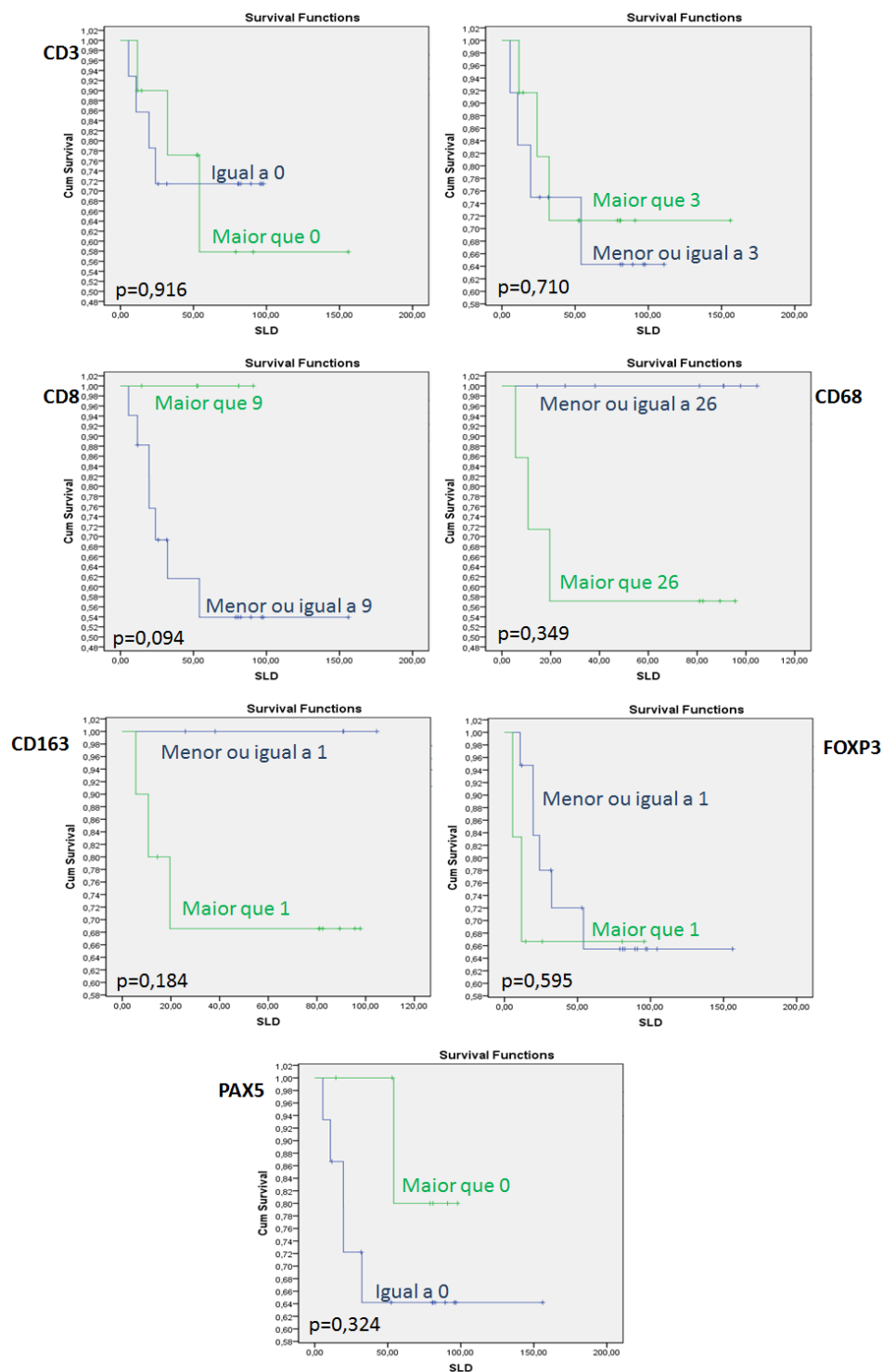


Figura 2 - Curvas de SLD do subtipo HER2. CD3 ponto de corte de 0 (p=0,916). CD4: ponto de corte de 3 (p=0,710). CD8: ponto de corte de 9 (p=0,094). CD68: ponto de corte de 26 (p=0,349). CD163: ponto de corte de 1 (p=0,184). FOXP3: ponto de corte: 1 (p=0,595). PAX5: ponto de corte: 0 (0,324).

Tabela 2 - Resumo dos dados de SLD. Todas as curvas foram separadas em maior ou menor que o ponto de corte. Em negritos os valores de p estatisticamente significativos

<i>Marcador</i>	<i>Ponto de corte</i>	<i>Sobrevida em 120 meses (%)</i>	<i>Valor de p</i>
CD3	0	Menor: 62% Maior: 100%	0,916
CD4	3	Menor: 66% Maior: 75%	0,710
CD8	9	Menor: 61% Maior: 100%	0,094
CD68	26	Menor: 100% Maior: 57%	0,349
CD163	1	Menor: 81% Maior: 67%	0,184
FOXP3	1	Menor: 62% Maior: 78%	0,595
PAX5	0	Menor: 68% Maior: 100%	0,324

Não foi possível realizar o modelo de regressão de Cox univariado pois há poucas amostras nos grupos.

Apêndice 12 - Curvas de sobrevida câncer específica e SLD para o modelo de associação CD8/FOXP3

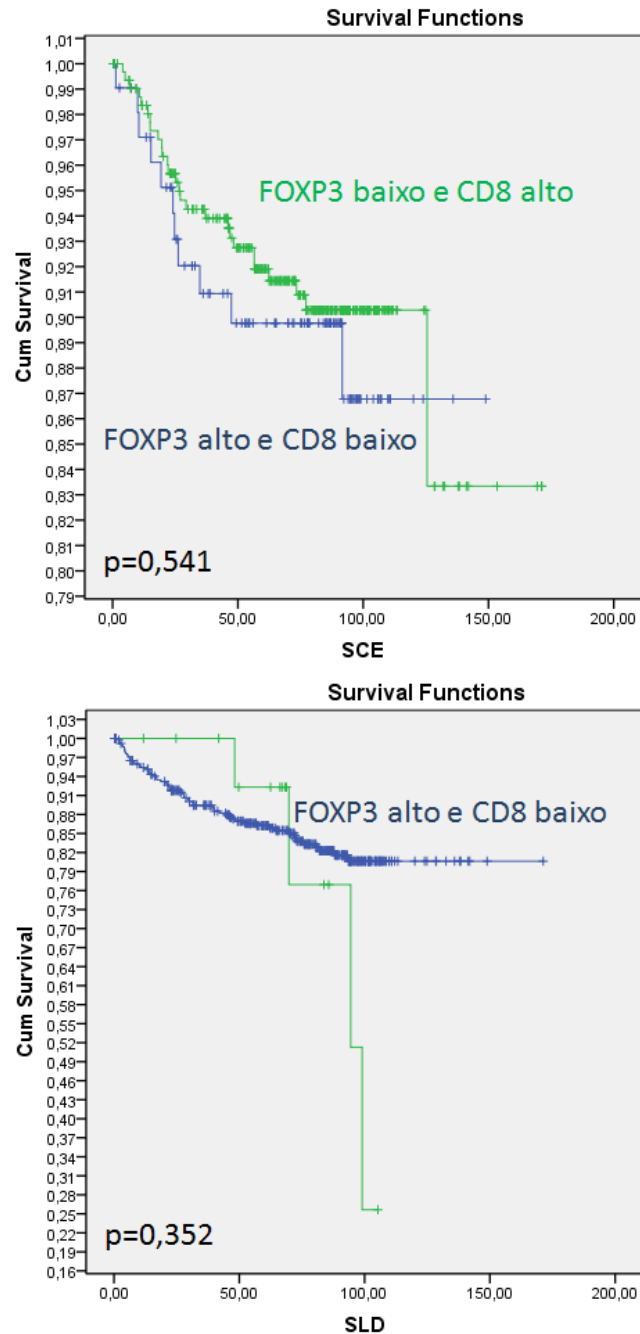


Figura 1 - Curvas de sobrevida câncer específica e SLD da correlação CD8/FOXP3. SCE com todos os subtipos ($p=0,591$). SLD com todos os subtipos ($p=0,591$). Não foi possível realizar a mesma análise com cada subtipo individualmente pois o número de eventos era muito pequeno e impossibilitava a estatística.