

**CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO
INFLAMATÓRIO E ASSOCIAÇÃO COM EXPRESSÃO
PROTEICA DE PD-1, PD-L1 E PD-L2 E SOBREVIDA EM
CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO-NEGATIVO**

MONIQUE CELESTE TAVARES

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Co-orientador: Dr. Victor Pianna de Andrade

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Tavares, Monique Celeste

Caracterização do infiltrado inflamatório e associação com expressão de proteica de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e sobrevida em carcinoma mamário triplo-negativo / Monique Celeste Tavares – São Paulo, 2018.

114p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. Neoplasias da Mama Triplo Negativas/Triple Negative Breast Neoplasms. 2. Sobrevida/Survival. 3. Neoplasias Inflamatórias Mamárias/genética/Inflammatory Breast Neoplasm/genetics. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry

DEDICATÓRIA

Agradeço ao meu marido Tiago pelo incentivo, a minha querida filha Stella, a quem dedico todo meu esforço e trabalho e que eu possa lhe servir de exemplo, e à minha mãe a quem tanto amo e que tanto lutou para que tudo isso se concretizasse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu dedicado orientador Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima a quem tanto admiro, pela oportunidade, aprendizado, ensino e paciência para comigo;

Ao Dr. Victor Pianna pelos ensinamentos, paciência e exemplo;

À toda equipe da Oncologia Clínica, que de alguma forma contribuiu para que eu conseguisse concluir meu mestrado;

À equipe da Patologia, em especial à Dra. Mariana Petaccia, à Dra. Tatianne Neotti e à Dra. Lilian Gimenez, que ajudaram nessa jornada;

Aos residentes de cada dia que nos impulsionam a estudar diariamente;

E aos pacientes, meus grandes mestres, sou grata pela confiança.

RESUMO

Tavares MC. **Caracterização do infiltrado inflamatório e associação com expressão proteica de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e sobrevida em carcinoma mamário triplo-negativo.** São Paulo; 2018. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Os carcinomas mamários triplo-negativos (CMTN) correspondem a cerca de 15 a 20%, sendo o subtipo mais agressivo quando comparado aos demais. A interação entre células do sistema imunológico e o câncer desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão tumoral. Várias evidências sugerem que os linfócitos infiltrantes no tumor (TIL), presentes no câncer de mama antes do tratamento, estão associados à resposta à terapia e a um melhor prognóstico. A expressão de PD-L1 é um dos mecanismos que o tumor emprega para escapar da resposta imune. **Objetivos:** Avaliar a intensidade e composição do infiltrado inflamatório em carcinoma de mama invasivo triplo-negativo (CMTN) operado e sua associação com a expressão proteica de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e desfechos clínicos. **Métodos:** Trata-se de uma coorte retrospectiva composta por pacientes com diagnóstico de CMTN invasivo tratadas no A.C.Camargo Cancer Center. A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada em cortes corados por H&E. A composição do infiltrado foi avaliada através de imuno-histoquímica utilizando-se anticorpos contra CD20, CD4, CD8, FOXP3, CD68, CD163, pSTAT, PD-1, PD-L1 e PD-L2 e PTEN. O método de maximização do log-rank foi empregado para determinação dos pontos de corte ótimos para análise de sobrevida. A distribuição de frequências foi comparada pelo teste do Qui-quadrado ou exato de Fisher, as correlações foram realizadas pelo método de Spearman. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Todos os testes com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** O infiltrado inflamatório tumoral (TIL) foi avaliado em 166 pacientes. A média da intensidade do TIL foi de 20%. Observamos que 47 (28%) tinha infiltrado inflamatório $\leq 5\%$, 86 (52%) entre 5 e 50% e 32 (19%) $> 50\%$. Estabelecemos um ponto de corte ideal de 5% do TIL para análise de SG (a

sobrevida global mediana foi de 85 meses para pacientes com $TIL \leq 5\%$ e de 136 meses para aquelas com $TIL > 5\%$; $p=0,001$). Foram incluídos 76 casos no TMA para análise IHQ. A média de expressão de PD-L1 foi de 4% e 12% no tumor e no estroma, respectivamente. O PD-L1 não se associou à SG nesta população. Encontramos uma correlação positiva e estatisticamente significativa do TIL com marcação para PD-L1 no estroma ($p=0,001$) e no tumor ($p=0,028$). Nós observamos que o infiltrado inflamatório é enriquecido para macrófagos tipo M2 e linfócitos T (CD4+, CD8+ e FOXP3+). O número de células FOXP3+ e a expressão de PTEN nas células tumorais estiveram associadas com SG. **Conclusão:** Em CMTN, a percentagem de TIL está associada a com marcação positiva para PD-L1 tanto no estroma, quanto no tumor, bem como com SG. Expressão de PD-L1 não se associou com SG. Número reduzido de células positivas para FOXP3 e marcação para PTEN nas células tumorais estão associados com melhor SG.

SUMMARY

Tavares MC. [Characterization of the inflammatory infiltrate and association with protein expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 and survival in triple-negative mammary carcinoma.] São Paulo; 2018. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Triple-negative mammary carcinomas (TNBC) correspond to about 15 to 20% and has a more aggressive behaviour when compared to other breast cancer subtypes. The interaction between the immune system and cancer plays a crucial role in tumor development and progression. Lots of evidence suggest that tumor infiltrating lymphocytes (TIL) when present in breast cancer prior to the treatment may predict response to the therapy and a better prognosis. PD-L1 expression is one the mechanisms the tumor uses to escape the immune system response. **Objectives:** To evaluate the intensity and composition of the inflammatory infiltrate in resected triple-negative breast cancer (TNBC) and its association with the expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2. **Methods:** We retrospectively collected from a population composed of patients diagnosed with invasive TNBC, non metastatic, who were treated at the A.C.Camargo Cancer Center. The intensity of the inflammatory infiltrate was evaluated in H&E stained slides. The number of cells expressing CD20, CD4, CD8, FOXP3, CD68, CD163, pSTAT, PD-1, PD-L1, PD-L2 and PTEN was evaluated by immunohistochemistry. Optimal cutoff points for survival analysis were determined by the method of maximization of the log-rank test. Frequencies were compared by Chi-squared test or Fisher's exact test. Correlations were calculated by the Spearman's test. Survival curves were calculated by Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test. All tests were deemed statistically significant when $p < 0.05$. **Results:** TIL was evaluated in 166 patients. The mean TIL frequency was 20%. We observed that 47 (28%) tumors had TIL $\leq 5\%$, 86 (52%) between 5 and 50% and 32 (19%) $> 50\%$. We established an optimal cutoff point of 5% of TIL for OS analysis (median overall survival was 85 months for patients with TIL $\leq 5\%$ and 136 months for those with infiltrate $> 5\%$; $p = 0.001$).

We included 76 cases in the TMA for IHC analysis. We found a mean of 4% and 12% cells expressing PD-L1 in the tumors and in the stroma, respectively. There was no association between PD-L1 expression and OS. We found a positive and statistically significant correlation between TIL and PD-L1 expression in stroma cells ($p=0.001$) and in tumor cells ($p=0.028$). We observed that the inflammatory infiltrate in TNBC is enriched for M2 macrophages and T lymphocytes (CD4+, CD8+ and FOXP3+). The number of FOXP3+ cells and the presence of PTEN staining in tumor cells were associated with OS. **Conclusion:** In TNBC, TIL counts is correlated with the number of PD-L1+ cells both in the stroma and in the tumor and associated with OS. The TIL positively. PD-L1 expression was not associated with OS. Decreased number of FOXP3+ cells and the presence of PTEN staining in tumor cells were associated with better OS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fases da imunoeedição do câncer	6
Figura 2	Fluxograma com descrição dos casos incluídos e excluídos no estudo.....	40
Figura 3	Curvas de sobrevida global de acordo com o tratamento realizado, grupo	48
Figura 4	Curvas de sobrevida global de acordo com a percentagem de TIL no estroma categorizada em $\leq 5\%$, 5-50%, $> 50\%$	49
Figura 5	Curvas de sobrevida global de acordo com a percentagem de TIL no estroma categorizada pelo ponto de corte $>$ ou $\leq 5\%$	49
Figura 6	Curvas de sobrevida global de acordo com a estadiamento clínico categorizado.....	50
Figura 7	Curvas de sobrevida global de acordo com o ponto de corte ótimo de linfonodos ressecados	51
Figura 8	Curva de sobrevida global da população incluída na análise do TMA	66

Figura 9	Curva de sobrevida global de acordo com estádio T categorizado .	66
Figura 10	Curvas de sobrevida global de acordo com estádio N categorizado.....	67
Figura 11	Curvas de sobrevida global de acordo com grau histológico agrupado	68
Figura 12	Curvas de sobrevida global de acordo com a percentagem de TILs (>30% ou ≤30%) no estroma.....	69
Figura 13	Curvas de sobrevida global de acordo com a a percentagem de LITs (>5% ou ≤5%) no estroma.....	70
Figura 14	Curvas de sobrevida global de acordo com marcação para PD-L1 no estroma (>5% ou ≤5%).....	72
Figura 15	Curvas de sobrevida global de acordo com marcação para PD-L1 no tumor (>1 ou ≤1%).....	73
Figura 16	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células do tumor com ausência de marcação para PTEN.....	74
Figura 17	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células FOXP3 positivas.....	74

Figura 18	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD8 positivas	75
Figura 19	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD4 positivas	75
Figura 20	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD20 positivas	76
Figura 21	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células pSTAT1 positivas.....	76
Figura 22	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD68 positivas	77
Figura 23	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD163 positivas	77
Figura 24	Curva de sobrevida global de acordo com o número de células PD-1 positivas	78
Figura 25	Curva de sobrevida global de acordo com a razão entre o número de células CD8 e FOXP3 positivas	79
Figura 26	Curva de sobrevida global de acordo com a razão entre o número de células CD4 e FOXP3 positivas	80

Figura 27 Curva de sobrevida global de acordo com a razão entre o número de células CD8 e CD4 positivas	81
Figura 28 O microambiente imune no CMTN está associado com sobrevida global.....	92

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Características dos anticorpos utilizados no estudo e padronização das reações de imuno-histoquímica	35
Tabela 1	Expressão de PD-L1 em diferentes tipos de tumores.....	12
Tabela 2	Características clínicas e demográficas da amostra incluída na análise da intensidade do infiltrado inflamatório	42-3
Tabela 3	Características patológicas das biópsias representativas dos casos incluídos na análise da intensidade do infiltrado inflamatório.....	45
Tabela 4	Características relacionadas ao tratamento e desfechos pacientes incluídas na análise da intensidade do infiltrado inflamatório.....	46
Tabela 5	Caracterização da intensidade do infiltrado inflamatório e distribuição da população em relação à intensidade do infiltrado inflamatório	47
Tabela 6	Análise multivariada de fatores associados com sobrevida global	51
Tabela 7	Características demográficas e clínicas das 76 pacientes incluídas Tissue Microarray (TMA) para as análises imuno-histoquímicas	53

Tabela 8	Distribuição de acordo com o estadiamento clínico dos tumores incluídos no TMA	54
Tabela 9	Características patológicas dos tumores incluídos no TMA	55
Tabela 10	Dados referentes ao tratamento das pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA.....	56
Tabela 11	Desfecho clínico das pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA.....	56
Tabela 12	Média da frequência de TIL, do número de células positivas para cada marcador avaliado no estroma por mm ² e do percentual de células do tumor positivas para PD-L1 no estroma e no tumor das amostras incluídas no TMA.....	57
Tabela 13	Distribuição das amostras de acordo com a média da frequência de TIL e do número de células positivas ou negativas (no caso do PTEN) para cada marcador avaliado no TMA.....	58
Tabela 14	Associação da marcação para PD-L1 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.....	60
Tabela 15	Associação da marcação para PD-L1 nas células do tumor com variáveis clínico-patológicas.....	61

Tabela 16	Associação marcação para PD-1 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas	62
Tabela 17	Correlação da percentagem de TIL no estroma e da expressão dos marcadores avaliados por imuno-histoquímica entre si	64
Tabela 18	Estimativa do ponto de corte ideal do número de células positivas para cada marcador avaliado para determinação da sobrevida global	71

LISTA DE SIGLAS

APC	<i>Antigen presenting cells</i>
B7	H1 B7 homólogo 1
BCL2	gene <i>B cell lymphoma 2</i>
BL1	<i>basal-like 1</i>
BL2	<i>basal-like 2</i>
BRCA1	gene <i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	gene <i>Breast cancer 2</i>
CID10	Código Internacional de doenças
CHP	Complexo de Histocompatibilidade Principal
CMPL	Câncer de Mama com Predomínio de Linfócitos
CMTN	Câncer de Mama Triplo-Negativo
CPNPC	Carcinoma pulmão não pequenas células
CR	Resposta Completa
CSDM	Células Supressoras Derivadas da Medula
CSR	Resposta do Núcleo-soro, Células Dendríticas e/ou Macrófagos
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DNA	Acido desoxirribonucleico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GEICAM	<i>Grupo Español de Investigación en Cáncer de Mama</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IFN	Interferon
IDO	Indoleamina-2,3-deoxigenase
IIT	Infiltrado inflamatório tumoral
IHQ	Imuno-histoquímica
ILT	Infiltrado linfocitário tumoral
IM	Imunomoduladores
IMC	Índice de massa corpórea

INCA	Instituto Nacional de Câncer
LAR	<i>Luminal Androgen Receptor</i>
LB	Linfócitos B
LCP	Linfócitos da Circulação Periférica
LTc	Linfócitos T Citotóxicos
LTa	Linfocitos T auxiliares
LTreg	Linfocitos T regulatório
M	Mesenquimal
MAT	Macrófagos associados ao tumor
MSL	<i>Mesenchymal stem-like</i>
NK	Células <i>Natural Killer</i>
PARP	Poli-ADP-ribose Polimerase
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PD-L2	<i>Programmed death-ligand</i>
PR	Resposta parcial
pRC	Resposta Patológica Completa
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RA	Receptore de androgênio
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SG	Sobrevida Global
Shc1	<i>src homology 2 domain-containing transforming protein C1</i>
ShcA	<i>SHC adaptor protein 1</i>
SHP1/2	<i>Src homology 2 domain–containing protein tyrosine phosphatase</i>
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLDD	Sobrevida Livre de Doença à Distância
SLP	Sobrevida livre de progressão
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBET	<i>Fator de transcrição T-box TBX21</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>

TGFB	Factor de Crescimento Transformador Beta
TIL	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TN	Triplo-Negativo
TNBC	<i>Triple negative breast cancer</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de mama triplo-negativo (CMTN).....	2
1.2	Resposta imune antitumoral.....	5
1.3	CMTN e resposta imune antitumoral.....	13
1.4	CMTN e expressão de PD-1 e PD-L1.....	20
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS.....	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Desenho e tipo de estudo	31
4.2	População do estudo e coleta de dados	31
4.3	Critérios de inclusão.....	32
4.4	Critérios de exclusão	32
4.5	Análise microscópica	33
4.6	Imuno-histoquímica	34
4.7	Análise estatística.....	37
5	RESULTADOS	39
5.1	Seleção e disposição dos casos estudados.....	39
5.2	Características clínicas e patológicas das pacientes avaliadas quanto à intensidade do infiltrado imune-inflamatório	41
5.3	Características clínicas e patológicas das pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA	47
5.4	Associação entre variáveis clínico-patológicas, demográficas, infiltrado inflamatório e composição do infiltrado inflamatório	52

5.5	Análise de sobrevida e razão entre as médias de contagem de células positivas para cada marcador	57
5.6	Análise de sobrevida global e câncer-específica.....	59
5.7	Correlação dos marcadores avaliados entre si e com a intensidade do infiltrado inflamatório	63
5.8	Análise de sobrevida global e câncer-específica e do impacto da composição do infiltrado inflamatório	65
6	DISCUSSÃO.....	82
7	CONCLUSÃO.....	96
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Protocolo de quantificação linfocitária nos espécimes de mama.
- Anexo 3** Ficha de coleta de dados utilizada nesse projeto.
- Anexo 4** Tabelas de Associação da Média do número de células positivas ou negativas no caso do PTEN) para marcador avaliado com as variáveis clínico-patológicas.
- Anexo 5** Tabelas associação do ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global de cada marcador com as variáveis clínico patológicas.
- Anexo 6** Curvas de sobrevida da população analisada no TMA
- Anexo 7** Microfotografias representativas das lâminas empregadas para análise da intensidade do infiltrado inflamatório e imunohistoquímica.

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada, e é a segunda causa mais comum de morte por câncer em mulheres, perdendo apenas para o câncer de pulmão. É responsável por 266.120 (30%) dos novos casos de câncer por ano, e por 40.920 (14%) das mortes, sendo a segunda principal causa de morte em mulheres com idades entre 40 a 49 anos, podendo afetar 1 em cada 8 mulheres de 49 a 70 anos, de acordo com os dados estatísticos americanos de 2018 (SIEGEL et al. 2018). No Brasil, de acordo com dados de 2018 do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa é de 59.700 casos novos por ano, com um risco estimado 56,33 casos a cada 100 mil mulheres, representando cerca de 29,5% de todas neoplasias em mulheres e sendo a principal causa de morte por câncer em mulheres, o que torna essa doença de elevada relevância epidemiológica e de grande impacto para saúde pública (Ministério da Saúde 2018).

O câncer de mama é uma doença heterogênea composta por pelo menos quatro subtipos moleculares distintos: luminal A e B, hiperexpressores de HER2 e tumores *basal-like* (SLAMON et al. 2011; HARBECK et al. 2013).

Embora o padrão-ouro para a classificação molecular do câncer de mama continue sendo a expressão gênica, por questões de custo e logística, a imunohistoquímica tem sido utilizada para a classificação molecular, sendo reconhecida pelos consensos mundiais como 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 Ki67) os tumores de mama são classificados conforme o consenso de Saint Gallen 2013 e EHINGER et al. (2017) em luminais A, luminais B, HER2 positivos puros e triplo-negativos.

1.1 CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO (CMTN)

O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é um termo aplicado aos cânceres de mama com ausência de expressão de receptores hormonais (de estrogênio, RE, e de progesterona, RP) e do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) ou da amplificação do gene (*ERBB2*) correspondente (HAMMOND et al. 2010).

Ao longo dos anos, o câncer de mama *basal-like* tornou-se sinônimo de CMTN porque a maioria dos tumores desse subtipo molecular não expressam receptores hormonais (RH), além disso, não possuem a superexpressão ou amplificação de HER2, porém nem todos os tumores triplo-negativos (TN) são *basal-like* pelo perfil de expressão gênica, e nem todos os tumores *basal-like* são TN (CAREY et al. 2007).

O subtipo imuno-histoquímico triplo-negativo corresponde a 15-20% dos casos de câncer de mama diagnosticados (HARBECK et al. 2013). A taxa de discordância entre a classificação molecular e imuno-histoquímica é de 20%-30% (LIVASY et al. 2006; CAREY et al. 2007; PRAT et al. 2013). Mais recentemente, dados de três grandes estudos clínicos (GEICAM/9906, MA.12, e MA.5), utilizando o ensaio baseado de RT-PCR quantitativo, PAM50, revelaram que aproximadamente

30% dos tumores identificados como TN por revisão patológica central não pertence à categoria *basal-like* (RAKHA e REIS-FILHO 2009).

Existe uma heterogeneidade biológica significativa dentro do grupo de pacientes diagnosticados com CMTN (PRAT et al. 2010; PRAT e PEROU 2011). De acordo com LEHMANN et al. (2011), avaliando a expressão diferencial de 2.188 genes, é possível classificar os tumores TN em seis classes, sendo elas: imunomoduladores (IM), *basal-like 1* (BL1), *basal-like 2* (BL2), mesenquimal (M), *mesenquimal-stem cell-like* (MSL), e luminal receptor de andrógeno (LAR), além de um sétimo subgrupo classificado como *unstable*, com evoluções clínicas distintas e diferentes respostas a intervenções farmacológicas *in vitro* (LEHMANN et al. 2011).

Morfologicamente, os tumores TN apresentam-se, habitualmente, como tumores volumosos, de alto grau, com alto índice mitótico, presença de necrose geográfica, invasão do tipo *pushing border* e resposta estromal linfocítica. Em relação aos outros carcinomas mamários, têm-se mostrado mais agressivos que os subtipos luminais (RH positivo) e HER2 positivo. Paralelamente, não existe nenhum tratamento específico aprovado para esse subtipo de câncer de mama além de quimioterapia antineoplásica (HAMMOND et al. 2010; PAL et al. 2011)

Embora os princípios básicos de diagnóstico e tratamento do CMTN sejam semelhantes ao tratamento do carcinoma de mama em geral, muitos aspectos, incluindo fatores de riscos, características moleculares e patológicas, história natural e sensibilidade à quimioterapia são únicos deste tumor (HAMMOND et al. 2010).

Os fatores de riscos associados ao CMTN são:

- Mutação no gene *BRCA*: cerca de 20% das pacientes com tumores triplo-negativo possuem um dos genes *BRCA* mutado, particularmente *BRCA1*, em

contraste, menos de 6% dos outros subtipos de câncer de mama apresentam mutação nestes genes (GONZALEZ-ANGULO et al. 2012);

- Raça: vários estudos populacionais demonstraram que mulheres afro-americanas têm maior risco de desenvolver CMTN, em comparação com as não afro-americanas (MILLIKAN et al. 2008);
- *Status* pré-menopausal: tem sido associado ao aumento da incidência de CMTN em relação a mulheres pós-menopausadas (PHIPPS et al. 2011);
- Fatores da história reprodutiva: estudos sugerem que multiparidade e idade jovem na primeira gravidez podem estar associados a maior incidência de CMTN, porém nenhum desses resultados foram estatisticamente significativos (PARISE et al. 2009);
- Obesidade: uma meta-análise com 11 estudos randomizados, incluindo 24.479 mulheres (3.845 sendo do subtipo triplo-negativo) reportou que obesidade (definido como índice de massa corpórea ≥ 30) está associada a um maior risco de desenvolver CMTN, sendo que esse risco foi significativamente maior para mulheres pré-menopausadas (PIEROBON e FRANKENFELD 2011).

O CMTN é mais comumente diagnosticado em mulheres jovens com menos de 40 anos, quando comparado aos cânceres de mama com receptores hormonais positivos, sendo mais prevalente em mulheres negras do que em brancas (TRIVERS et al. 2009). Entre os CMTN há predomínio do subtipo carcinoma ductal invasivo, e, menos frequentemente, dos subtipos medular, metaplásico e adenóide cístico (CAREY et al. 2007).

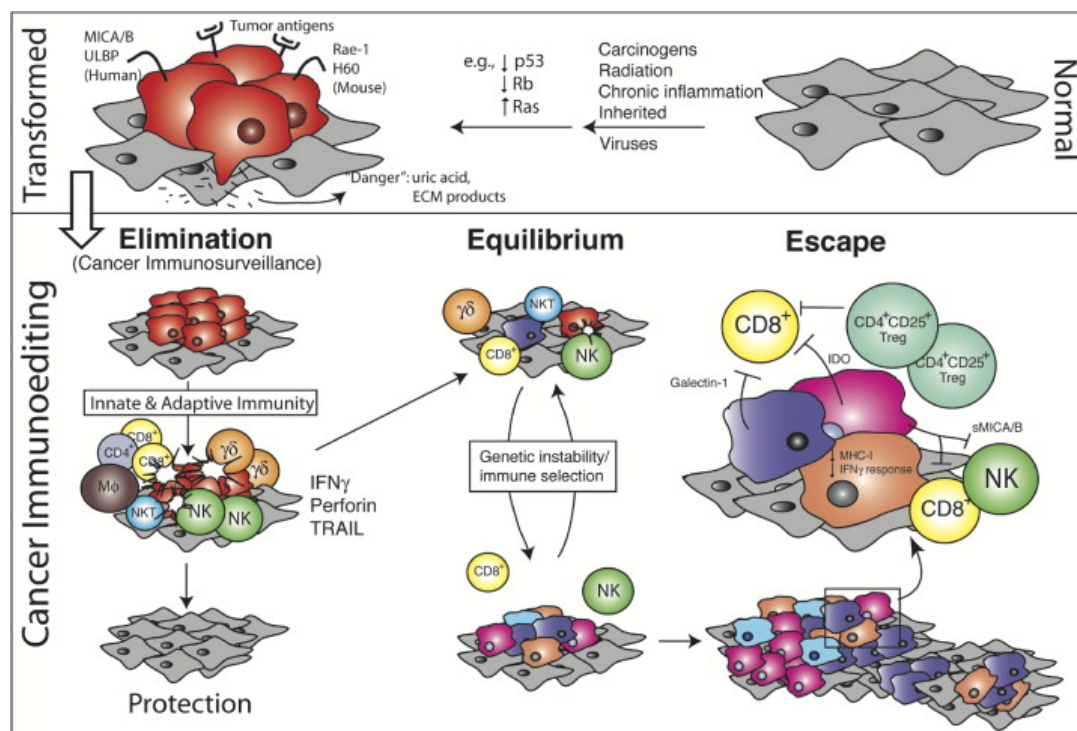
Apesar dos avanços obtidos com o surgimento de novas drogas quimioterápicas e terapias-alvo para o tratamento do câncer de mama, as pacientes com o subtipo TN carecem desse benefício e continuam a ter um pior prognóstico. DENT et al. (2017), em um estudo com 1.601 pacientes com câncer de mama, sendo 11,2% de tumores triplo-negativo, encontraram que a probabilidade de morte foi significativamente maior para as pacientes com esse subtipo em relação aos demais (42,2% versus 28%, respectivamente; $p < 0,0001$). A sobrevida mediana foi de 4,2 anos para pacientes com CMTN contra 6 anos para as pacientes com outros subtipos ($p < 0,0001$) (DENT et al. 2017).

1.2 RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL

A interação entre células do sistema imunológico e o câncer desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão tumoral (URSINI-SIEGEL et al. 2008; PAGÈS et al. 2010; HANAHAN e WEINBERG 2011).

O *crosstalk* entre leucócitos, microambiente tumoral e células tumorais controla firmemente o crescimento do câncer. O efeito do sistema imune no câncer é o resultado de uma interação complexa de células e mediadores químicos com atividade anti-tumoral (linfócitos CD8, Th1 e NK, macrófagos M1 e células dendríticas do tipo 1, IFN-gama, TNFA, IL-1 e IL-12, TRAIL, perforina e FasL) e pró-tumorais (linfócitos Treg e Th2, células supressoras derivadas da medula óssea, macrófago do tipo M2, células dendríticas do tipo 2, PD-1, CTLA4, IL-23, IL-10, IDO, TDO, ARG1, COX-2, PGE2) (VIBHAKAR et al; 2007; PATERSON et al. 2011; ZINSELMeyer et al. 2013; MITTAL et al. 2014).

A vigilância imunológica antitumoral envolve células do sistema imune inato (ex. células NK) e do sistema imune adaptativo (ex. linfócitos T citotóxicos CD8+ - LTC, linfócitos T auxiliares CD4+) (BUTTE et al. 2007). O processo de imunoeedição no câncer é complexo e composto por 3 fases distintas: “eliminação”, “equilíbrio” e “escape”; embora nem sempre estas aconteçam nessa ordem (TITANJI et al. 2010; ZIELINSKI et al. 2013) (Figura 1).



Fonte: DUNN et al. (2004)

Figura 1 - Fases da imunoeedição do câncer. Na fase de eliminação, o sistema imune inato e adaptativo trabalham em conjunto para detectar a presença do tumor em desenvolvimento e destruí-lo, antes deste se tornar clinicamente aparente. A fase de equilíbrio possui a maior duração no processo de imunoeedição tumoral. Nesta fase, o sistema imune mantém as células tumorais residuais em um estado funcional de latência. Este processo leva à seleção de células tumorais com imunogenicidade reduzida. Na fase de escape, as células tumorais adquirem a habilidade de não serem reconhecidas pelo sistema imune e crescem progressivamente até formarem tumores visíveis.

Na fase de eliminação, o sistema imune inato e adaptativo trabalham em conjunto para detectar a presença do tumor em desenvolvimento e destruí-lo, antes deste se tornar clinicamente aparente. São efetores do sistema imune inato as células NK e as células T NK ativadas pelas citocinas inflamatórias liberadas pelas células tumorais em crescimento, pelos macrófagos e pelas células estromais que circundam as células tumorais. As citocinas secretadas recrutam mais células imunes, as quais produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IFNG. Perforina, FasL e TRAIL medeiam a morte das células tumorais pelas células NK e liberam antígenos tumorais, os quais levam à resposta imune adaptativa. As células NK promovem a maturação das células dendríticas e a migração destas para os linfonodos que drenam a região do tumor, resultando no aumento da apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4 *naive*, os quais, após ativados, ativam linfócitos T CD8 específicos contra os antígenos tumorais, promovendo a expansão clonal destes. Os linfócitos T CD8 também podem ser diretamente ativados por células apresentadoras de antígenos, sem a intermediação de linfócitos CD4. Estes linfócitos citotóxicos atacam e matam as células tumorais. Se a destruição das células tumorais for completa, a fase de eliminação representa o ponto final do processo de imunoeedição tumoral (revisado em SCHREIBER et al. 2011).

A fase de equilíbrio possui a maior duração no processo de imunoeedição tumoral. Nesta fase, o sistema imune mantém as células tumorais residuais em um estado funcional de latência. Este processo leva à seleção de células tumorais com imunogenicidade reduzida. Muitos estudos experimentais, empregando camundongos, com diferentes graus de deficiência de moléculas efetoras, indicam vários graus de pressão seletiva imunológica. Neste processo, os linfócitos e o IFNG

possuem um papel crítico na seleção imune das células tumorais (revisado em SCHREIBER et al. 2011).

Na fase de escape, as células tumorais adquirem a habilidade de não serem reconhecidas pelo sistema imune e crescem progressivamente até formarem tumores visíveis. O escape das células tumorais pode ocorrer de diferentes formas. As células tumorais podem sofrer alterações que reduzem o reconhecimento imune (por exemplo, pela perda de antígenos) ou aumento da resistência aos efetores da resposta imune citotóxica (por exemplo, através da indução de mecanismos anti-apoptóticos, envolvendo a ativação persistente do fator de transcrição pró-oncogênico STAT3 ou a expressão de moléculas efectoras anti-apoptóticas como BCL2). Alternativamente, o escape pode resultar do estabelecimento de um estado imunossupressor dentro do microambiente tumoral. As células tumorais podem promover tal estado através da produção de citocinas imunossupressoras como o fator vascular de crescimento endotelial (VEGF), o fator transformador do crescimento β (TGF β), galectina-3, indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) ou pelo recrutamento de células imunes regulatórias (PENTCHEVA-HOANG et al. 2009; revisado em SCHREIBER et al. 2011).

As células T regulatórias (células Treg) e as células supressoras derivadas da medula (CSDM) são os dois principais tipos de células imunossupressoras que participam da resposta inibitória (revisado em SCHREIBER et al. 2011).

As células Treg são uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺/CD25⁺ e são produzidas durante o processo de maturação no timo ou induzidas na periferia. Nos seres humanos, elas representam cerca de 2 a 5% do total de linfócitos T CD4⁺ circulantes no sangue periférico (KIM et al. 2007). As células Treg expressam

constitutivamente CD25 e o fator de transcrição FOXP3. Quando estimuladas, as células Treg inibem a função efetora de linfócitos T pela produção de citocinas imunossupressoras, como IL-35, IL-10 e TGF β ; pela expressão de moléculas co-inibitórias, como CTLA-4, PD-1 e PD-L1; e consumindo IL-2, uma citocina que é crítica para a manutenção da função citotóxica dos linfócitos. Em pacientes com câncer, as células Treg conferem vantagens para o crescimento e potencial metastático através da inibição da imunidade anti-tumoral (PELICCI et al. 1992; revisado em SCHREIBER et al. 2011).

As CSDM são um grupo heterogêneo de células progenitoras mielóides e células mielóides imaturas, que inibem a função dos linfócitos através da indução de células Treg, produção de TGF β , depleção ou sequestro de aminoácidos arginina, triptofano e cisteína, os quais são necessários para o funcionamento dos linfócitos T, ou adicionando nitratos ao receptor de linfócitos T (FRANCISCO et al. 2009; AMARNATH et al. 2011).

O principal componente da resposta imune adaptativa contra os tumores ocorre nos linfonodos, onde as células T encontram os antígenos tumorais. Se deste encontro ocorre ativação, as células T ativadas entram na circulação e migram até o sítio tumoral onde reconhecem os antígenos tumorais e eliminam as células tumorais. Pelo menos duas interações receptor-ligante são necessárias para a completa ativação das células T: (a) o reconhecimento pelo receptor de célula T do seu respectivo ligante apresentado no contexto do complexo de histocompatibilidade principal (CHP), e (b) um segundo sinal co-estimulatório transmitido a partir de uma célula apresentadora de antígeno (APC) para o linfócito T. Este segundo sinal é transmitido

a partir da molécula B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86) na APC para a molécula CD28 no linfócito T (CHEN et al. 2012).

Existem múltiplos *checkpoints* para moderar esta resposta imune nascente com o objetivo de suprimir respostas inapropriadas contra auto-antígenos e evitar o dano a tecidos normais. Como alguns tumores utilizam estes *checkpoints* imunes para escapar da resposta imune antitumoral, o bloqueio dos *checkpoints* imunes é uma possível estratégia terapêutica anticâncer. Os dois principais receptores envolvidos nos *checkpoints* imunes estudados no contexto de imunoterapia clínica contra o câncer são: CTLA-4 e PD-1, os quais possuem papéis distintos na regulação imune (revisado em SCHREIBER et al. 2011; MACCALLI et al. 2017).

O CTLA-4 regula a amplitude da ativação precoce de linfócitos T *naive* e de memória, atuando como um regulador negativo. A sua importância como modulador da resposta dos linfócitos T é demonstrada pelo fenótipo autoimune/hiperimune rapidamente fatal de camundongos depletados de CTLA-4 (PARRY et al. 2005; AERTS et al. 2013).

Em contraste ao CTLA-4, o principal papel do PD-1 é limitar a atividade dos linfócitos T na periferia durante uma resposta à infecção e a auto-antígenos (HONDA et al. 2004; FIFE et al. 2008; MATSUZAKI et al. 2010).

O PD-1 é expresso na superfície dos linfócitos T ativados e a ligação entre PD-1 e PD-L1 gera um sinal inibitório que reduz a produção de citocinas e a proliferação dos linfócitos T (ISHIDA et al. 1992; TOPALIAN et al. 2015). Desta maneira, a expressão de PD-L1 pelas células pode mediar um mecanismo de proteção contra o ataque de linfócitos T citotóxicos e representa um mecanismo regulador que, potencialmente, desenvolve-se para diminuir a resposta imune crônica

durante uma infecção viral. O câncer, como uma doença crônica e frequentemente inflamatória, durante a sua progressão, costuma ativar esta via de regulação do sistema imune para evadir da vigilância imunológica através da superexpressão de PD-L1 (DAY et al. 2006; revisado em KIM et al. 2007; JUNG e CHOI 2013).

O PD-L1, o ligante principal de PD-1, é expresso amplamente em múltiplos tecidos incluindo células T e B, células dendríticas e macrófagos. A expressão de PD-L1 está frequentemente aumentada em múltiplos tumores humanos (Tabela 1), sendo superexpresso nos tumores pela ativação de vias-chaves da oncogênese, por exemplo, fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K) e quinase ativada por mitógeno (MAPK), ou, mais fortemente, em resposta ao INFG produzido no microambiente tumoral. O PD-L2, que similarmente se liga ao PD-1 para regular a resposta imune, apresenta uma expressão mais restrita, sendo primariamente expresso nas células dendríticas, nos macrófagos e nos mastócitos. Este padrão diferente de distribuição sugere funções distintas na regulação imune entre os diferentes tipos celulares. A expressão restrita de PD-L2, principalmente as células apresentadoras de antígeno, é consistente com o papel de regular do *priming* ou da polarização das células T, enquanto a ampla distribuição do PD-L1, sugere um papel mais geral na proteção dos tecidos periféricos contra a inflamação excessiva. Similar a esta expressão mais restrita, a expressão de PD-L2 entre os tumores é bem menos prevalente que do PD-L1 (OKAZAKI et al. 2006; revisado em KIM et al. 2007).

Tabela 1 - Expressão de PD-L1 em diferentes tipos de tumores.

Tipo de câncer	Frequência de expressão do PD-L1 (%)
Melanoma	40-100
Câncer de Pulmão	35-95
Câncer de Nasofaringe	68-100
Glioblastoma	100
Colón	53
Carcinoma Hepatocelular	45-93
Câncer Urotelial	28-100
Mieloma Múltiplo	93
Câncer de óvário	33-80
Câncer Gástrico	42
Câncer esôfago	42
Câncer de pâncreas	39
Câncer de rim	15-24
Linfoma	17-94
Leucemias	11-42
Câncer de mama	31-34

Fonte: OKAZAKI et al. (2006); revisado em KIM et al. (2007).

Os linfócitos Treg são mediadores-chave da tolerância periférica, estes suprimem ativamente os linfócitos T efetores e impedem o dano tissular imunomediado. Os linfócitos Treg podem ser divididos em: linfócitos Treg naturais (nTreg) e induzidos (iTreg). Os linfócitos nTreg desenvolvem-se no timo, expressam FOXP3, altos níveis de CD25 e possuem um repertório de receptores de células T direcionadas contra auto-antígenos. Já os linfócitos iTreg são formados na periferia; os linfócitos T *naive* na presença de TGFB são induzidos a expressar FOXP3 e são

convertidos em linfócitos iTreg. O estudo de FRANCISCO et al. (2009), realizado para investigar a influência do PD-L1 no desenvolvimento dos linfócitos Treg, utilizou culturas de células apresentadoras de antígenos de ratos *wild type* (WT) ou PD-L1^{-/-} e demonstrou o papel essencial do PD-L1 na regulação de linfócitos iTreg e na sua função. As células apresentadoras de antígeno PD-L1^{-/-} converteram linfócitos T CD4 *naive* em linfócitos iTreg de maneira ineficiente, porém quando grânulos revestidos de PD-L1 foram adicionados ao meio de cultura, linfócitos Treg foram induzidos *in vitro*, indicando que o PD-L1 regula o desenvolvimento dos linfócitos Treg. Além disso, o PD-L1 aumenta e sustenta a expressão de FOXP3 e a função supressora dos linfócitos iTreg. O papel obrigatório do PD-L1 em controlar o desenvolvimento e a função dos linfócitos iTreg foi ilustrado através da comparação de linhagens de células WT com células PD-L1^{-/-}, PD-L2^{-/-} e Rag^{-/-}. As moléculas Rag são proteínas responsáveis pela recombinação gênica dos receptores de células T e a sua ausência resulta na ausência da maturação de linfócitos T e B. Neste estudo, houve redução marcada na conversão de linfócitos iTreg, e o rápido desenvolvimento de um fenótipo inflamatório fatal em recipientes PD-L1^{-/-}, PD-L2^{-/-} e Rag^{-/-} ao receberem linfócitos T CD4 *naive* (FRANCISCO et al. 2009). Assim, PD-L1 pode inibir a resposta das células T pela indução e manutenção dos linfócitos iTreg (NISHIMURA et al.1999; TOPALIAN et al. 2012).

1.3 CMTN E RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL

Os linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) são observados em alguns tumores sólidos, incluindo o câncer de mama. Essa população de células imunes compreende

um mistura de células T citotóxicas, células T auxiliares (*T helper*), bem como linfócitos B, macrófagos, células *natural-killer* (NK) e células dendríticas. Dados de expressão gênica e de análises de citometria têm demonstrado que a quantidade de TIL representa um marcador indireto de uma resposta de células T ativadas anti-tumoral pré-existente (RAVELLI et al. 2017). Os TIL são mais comumente observados em níveis aumentados em tumores triplo-negativos e HER2 positivos quando comparados a tumores com receptores estrogênio (RE) positivos e HER2 negativo (YAMAGUCHI et al. 2012), indicando que o CMTN e o câncer de mama HER2 positivo são subtipos mais imunogênicos e, por razões ainda não elucidadas, são capazes de gerar respostas antitumorais mediadas por células T mais robustas (BUISSERET et al. 2017). Ultimamente, a importância clínica da presença de TIL vem sendo relatada, estando associada com melhor prognóstico e maior taxa de resposta a terapias neoadjuvantes em câncer de mama em estágios iniciais (WEIN et al. 2017; CHEN et al. 2017).

Historicamente, não se pensava que o câncer de mama fosse imunologicamente ativo, particularmente quando comparado a tumores como melanoma. No entanto, evidências recentes sugerem que o infiltrado linfocitário tumoral (TIL) presente no câncer de mama antes do tratamento pode prever a resposta à terapia e um melhor prognóstico. Não só a quantidade da infiltração linfocítica, mas também o fenótipo desse infiltrado determinam o desfecho clínico. As células T CD4 *helper 1* (Th1) facilitam a apresentação de antígeno através da secreção de citocinas e ativação de células apresentadoras de antígenos. As células T citotóxicas CD8 (CTL) são essenciais para a destruição do tumor. Por outro lado, as células T CD4 *helper* (Th2), incluindo as células T reguladoras CD4⁺/FOXP3⁺,

inibem a função de CTLs, a proliferação de linfócitos B e promovem uma resposta imune anti-inflamatória que poderia facilitar o crescimento tumoral (SERRELS et al. 2015; STANTON et al. 2016).

A presença de TILs é um fator prognóstico favorável no câncer de mama, e os TILs podem sinergizar com quimioterapia e terapia com inibidores de *checkpoint* imune para melhorar a resposta clínica. Níveis de TIL podem identificar os cânceres de mama mais susceptíveis à imunomodulação e indicar estratégias adicionais para aumentar a imunogenicidade em tumores com níveis baixos a moderados de TIL (KUZNAR et al. 2017). SASHA et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática de estudos clínicos que analisaram infiltrados celulares tumorais linfocíticos com expressão de CD8 e FOXP3. Quinze estudos (n=13.914) que tinham os critérios especificados foram incluídos e analisados, e levaram às seguintes conclusões: cerca de 11% (5%-26%) dos cânceres de mama são classificados como câncer de mama com predomínio linfocitário (CMPL), e, aproximadamente, 16% dos cânceres não apresentam evidência de LIT. Os CMTNs demonstraram a maior incidência de LITs 20% (variando de 4% a 37%). Esta incidência é semelhante a dos cânceres de mama HER2 positivos, nos quais se encontrou uma mediana de 16% (variando entre 11%-24%). Infiltrado de células T CD8, indicativos de imunidade do tipo I, foi encontrado em 48% de todos os cânceres de mama (32%-80%) com níveis semelhantes observados em CMTN, 60% (40%-91%), e tumores HER2 positivos, 61% (40%-83%), sendo sua expressão reduzida em tumores RH positivos, 43% (30%-73%). Os níveis mais altos de células FOXP3 + foram observados em TN, 70% (65%-76%), e tumores HER2 positivos, 67% (61%-74%). Uma minoria dos cânceres de mama RH positivo demonstrou níveis elevados de células FOXP3+, 38% (35%-41%).

Observou-se que a frequência de TILs é variável dentre os subtipos de câncer de mama (SASHA et al. 2016; MIYASHITA et al. 2014).

DENKERT et al. (2010) avaliaram TILs estromais em 3.771 pacientes de seis estudos clínicos prospectivos do grupo alemão de neoadjuvância em câncer de mama. Na coorte global, a presença de TILs >60% foi encontrada em 19% dos tumores, 44% dos quais obtiveram uma resposta patológica completa. Uma frequência aumentada de TIL (>60%) foi observado em 30% dos CMTN, 19% dos tumores HER-2 positivo e 13% dos tumores HR positivos/HER negativos. A percentagem de TIL foi fortemente preditiva de resposta patológica completa nos três subtipos de carcinoma mamário ($p < 0,0005$). Em uma análise multivariada de TIL como variável contínua, cada aumento de 10% melhorou as chances de alcançar resposta patológica completa em 17% ($p < 0,0001$ para todos os subtipos). A resposta patológica completa traduziu-se em benefício de sobrevida em pacientes com CMTN e HER2 positivo, mas não em câncer de mama luminal, HER2 negativo. Em pacientes com tumores luminais, um baixo nível de TILs foi associado a melhor SG. Uma hipótese colocada pelo autor é que os TIL podem estar ligados a uma resposta à terapia endócrina reduzida (DENKERT et al. 2010).

A presença de uma tal resposta imune tem sido sugerida como sendo capaz de identificar os doentes com câncer da mama com bom prognóstico, particularmente em tumores triplo-negativos (MITTAL et al. 2014). Numa meta-análise, no entanto, não foram observadas diferenças significativas quando a análise dos TILs levou em conta a localização dos linfócitos (estromais versus intratumoral). Para estudos que relatam a presença de TIL no estroma peritumoral, a presença de níveis elevados de TIL foi associada a uma melhor SG (HR, 0,74; IC 95%, 0,62-0,90; P; 002). A análise

de TILs do estroma não mostrou heterogeneidade significativa. A associação entre TILs e SG foi semelhante quando foram incluídos apenas estudos que incluíram cânceres de mama triplo-negativos (HR, 0,78; IC 95%, 0,69-0,88; p=0,001). A presença de TILs no estroma esteve relacionada com um melhor resultado do tratamento, tanto em tumores triplo-negativos, como em outros subtipos de câncer de mama. Inversamente, a presença de TILs intratumorais esteve associada a resultados altamente heterogêneos, levando a um alto grau de incerteza quanto à interpretação dos dados publicados (MITTAL et al. 2014). A heterogeneidade observada nessas análises pode ser explicado pela variabilidade nos marcadores usados para identificar os TILs (por exemplo, CD3, CD8, ou FOXP3, entre outros), a variabilidade do ponto de corte utilizado para definir níveis elevados de TILs (por exemplo, números absolutos versus proporção de linfócitos compreendendo o infiltrado inflamatório), ou a definição da localização das TILs no estroma, com TILs peritumorais eventualmente rotulados como intratumorais (MITTAL et al. 2014).

O papel prognóstico dos TILs em CMTN foi originalmente sugerido pelo estudo de LOI et al. (2013), avaliando 256 doentes incluídas no estudo BIG 02-98 e tratadas com antraciclina (AC) ou AC e docetaxel (T), que observou que cada incremento de 10% no número de linfócitos no estroma foi associado com uma redução de 18% do risco de morte (LOI et al. 2013). Estes resultados foram posteriormente confirmados pelo mesmo grupo em 134 pacientes com CMTN do estudo FinHER e por ADAMS et al. (2014) que avaliaram 481 pacientes com CMTN incluídos nos estudos ECOG 2197 e 1199 (LOI et al. 2014; ADAMS et al. 2014).

No estudo de PRUNERI et al. (2016), que avaliou tumores TN de 897 pacientes diagnosticadas e tratadas no Instituto Europeu de Oncologia entre 1995 e

2010, com acompanhamento médio de 8,2 anos, todas as células mononucleares foram avaliadas na área de estroma do tumor invasivo, relatadas como um valor percentual e tratadas como uma variável contínua na análise de sobrevida. A percentagem média de TILs foi de 20%, e 21,9% dos casos tinham $\geq 50\%$ (câncer de mama com predomínio de linfócitos, CMPL) de TILs. Na análise de sobrevida univariada, a percentagem de TILs foi um preditor de melhor SLD, SLDD (sobrevida livre de doença à distância) e SG ($p < 0,0001$). A análise multivariada confirmou que cada aumento de 10% no TIL esteve fortemente associado a melhor sobrevida, independentemente da idade do paciente, do estado dos linfonodos, do tamanho do tumor, do grau histológico, da invasão vascular peritumoral e do Ki-67. Pacientes com CMPL tiveram uma taxa de sobrevida em 10 anos de 71%, 84% e 96% para SLD, SLDD e SG, respectivamente. A análise estratificada revelou uma correlação positiva entre TIL e sobrevida global em todos os subgrupos analisados (PRUNERI et al. 2016).

TIAN et al. (2016) avaliaram o papel prognóstico do TIL mensurado pelos métodos recomendados pelo grupo de trabalho Internacional TIL 2014. Eles avaliaram, retrospectivamente, o TIL em 425 CMTN invasivos primários em uma população chinesa com um acompanhamento médio de 4 anos. Avaliaram o TIL intratumoral (iTIL) e o TIL estromal (sTIL) e os correlacionaram com SLD, SLDD e SG. Observaram que maior sTIL esteve associado com melhor prognóstico. Por cada aumento de 10% no sTIL houve redução de 5% do risco de recorrência ou morte ($p < 0,001$), redução de 5% do risco de recorrência à distância ($p < 0,001$) e 4% de redução do risco de morte ($p = 0,002$). Na análise multivariada, observaram que o sTIL pode ser um marcador prognóstico independente, sendo que 3,5% dos CMTN

tiveram mais de 50% de linfócitos (CMPL) e associação entre o status CMPL e prognóstico foi observada, mas não alcançou significância estatística. CMTNs com mais de 20% de sTIL apresentaram um prognóstico significativamente melhor do que os pacientes com menos de 20% de sTIL (TIAN et al. 2016).

O alto número de células T CD8 tem se mostrado um preditor de melhores resultados clínicos. Alta infiltração intra-tumoral por células T CD8 esteve associada a aumento de sobrevida câncer-específica (SCE) (HR 0.55; 95%CI, 0,39-078; p=0,001) em um estudo envolvendo cerca de 1.334 pacientes (MAHMOUD et al. 2011). Entretanto, isso não foi replicado em outros estudos (BAKER et al. 2011; ODA et al. 2012).

Por outro lado, a expressão do marcador FOXP3+ em células infiltrando o tumor foi associada com pior prognóstico. Em uma avaliação de mais de 200 pacientes com diagnóstico de câncer de mama, a presença de mais que 15 células FOXP3+ esteve associada com redução de SLR (sobrevida livre de recorrência) (HR 1,58; IC 95% 1,01-2,47; p=0,04) e SG (HR 1,62; 95%CI 0,96-2,74; p=0,07) (BATES et al. 2006).

Como discutido acima, o TIL parece estar associado a desfecho clínico em CMTN. No entanto, a falta de metodologias padronizadas na avaliação do TIL tem impedido sua aplicação na prática clínica. Entre os tumores da mama, o CMTN é o que está associado com os níveis mais elevados de TILs, possivelmente como resultado da maior carga de mutações somáticas, levando ao aparecimento de neoantígenos capazes de desencadear uma resposta imune.

Apesar de todos esses dados, a maioria dos votantes do Consenso 2015 St. Gallen não recomendou o uso dos TILs como um novo fator de prognóstico em

pacientes com CMTN, tendo em vista a ausência de diretrizes padronizadas para a sua avaliação, dados sobre a reprodutibilidade do método e validação clínica (COATES et al. 2015). Nessa linha, um grupo de profissionais com experiência em avaliação de TILs estabeleceu recomendações para harmonizar e melhorar a consistência, incluindo diretrizes detalhadas para anotar a infiltração de linfócitos no tumor, o que pode melhorar a reprodutibilidade interobservador (SALGADO et al. 2015; WIMBERLY et al. 2015).

No geral, a alta contagem de TIL em CMTN, comparado com os tumores RH positivos, tem sido um atrativo para o uso de imunoterapias (HOEIJMAKERS et al. 2016), no entanto, 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 ponto de corte ideal e se todos ou apenas um subtipo específico de câncer de mama têm essas células correlacionadas com valores preditivos e prognóstico (McCALLI et al. 2017) (BENSE RD et al 2017).

1.4 CMTN E EXPRESSÃO DE PD-1 E PD-L1

Estudos clínicos com terapias envolvendo a inibição dos chamados *checkpoint* imunes, ou seja, a inibição das moléculas co-inibitórias do sistema imunológico (como PD-1/PD-L1) têm demonstrado altas taxas de resposta tumoral em melanoma e em câncer de pulmão de células não pequenas, carcinoma gástrico, câncer de cabeça e pescoço e carcinoma urotelial e a expressão de PD-L1 tem sido sugerida como um potencial biomarcador de resposta a esses tratamentos

(BRAHMER et al. 2012; TAUBE et al. 2014; BECKERS et al. 2015; GARON et al. 2015).

O PD-1 é uma molécula reguladora da resposta imune, e auxilia na manutenção da tolerância ao *self*, sendo expressa em linfócitos ativados. Apesar do seu nome, a proteína PD-1 não controla diretamente a morte celular, mas reduz a atividade de sinais de sobrevivência. PD-1 interage com dois ligantes, PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-DC). O PD1 funciona como um regulador negativo do sistema imune, através da interação com seus ligantes (PD-L1 e PD-L2). A ativação de PD-1 por PD-L1 ou PD-L2 diminui a atividade das células T, reduz a produção de citocinas e induz tolerância a antígenos (BODHANKAR et al. 2014; ŚLEDZIŃSKA et al. 2015). Esta interação resulta em proliferação e ativação reduzida de células T CD8. PD-L1 é expresso em células epiteliais, hematopoiéticas e endoteliais em resposta à inflamação, e é expresso em tumores, onde se acredita que desempenhe um papel importante na supressão imunitária dentro do microambiente tumoral (BLANK et al. 2005).

MUENST et al. (2013) avaliaram a expressão de PD-1 nos linfócitos do infiltrado inflamatório de 660 casos de câncer de mama empregando TMA. Eles observaram a presença de TILs em 15,8% dos casos, e a presença dos mesmos esteve associada com tamanho do tumor, grau histológico e acometimento linfonodal. A presença de TILs expressando PD-1 esteve associada à pior sobrevida global (HR = 2,736; p=0001), notadamente nos subtipos luminal B (HER2+ e HER2-) e *basal-like* (MUENST et al. 2013).

Os dados de ensaios clínicos com inibidores de PD-1/PD-L1 em melanoma e carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPCNP) têm sugerido que a

expressão de PD-L1 está associada com maior taxa de resposta e demonstraram segurança e respostas clínicas duráveis associadas a estas drogas (AERTS et al. 2013).

BECKERS et al. (2015) avaliaram por imuno-histoquímica a expressão de PD-L1 em 161 CMTN primários, bem como as células do sistema imunológico no estroma tumoral. Foi visto que a expressão de PD-L1 é muito comum no CMTN, sendo expresso na membrana celular (64%) e no citoplasma (80%) do tumor, bem como no estroma (93%). A expressão tumoral citoplasmática de PD-L1 esteve associada com um menor risco de morte por câncer de mama (HR 0,45; p=0,035), enquanto a expressão estromal de PD-L1 esteve associada com uma taxa mais baixa de mortes por todas as causas (HR 0,305; p=0,0042). A expressão de PD-L1 na membrana das células tumorais não esteve associada com nenhum desfecho. Embora a expressão de PD-L1 nos linfócitos infiltrantes estivesse associada com um resultado melhor, somente a invasão linfática e linfócitos infiltrantes tumorais elevados foram fatores prognósticos independentes para morte específica por câncer de mama (BECKERS et al. 2015). Entretanto, o resultado deve ser encarado com cautela, uma vez que não é muito claro o papel na regulação da resposta imune antitumoral representado pelo PD-L1 presente no citoplasma das células, uma vez que esta é uma proteína que desempenha sua função na membrana.

O significado clínico da inibição do eixo PD-L1/PD-1 como uma opção de imunoterapia efetiva contra o câncer, está sendo avaliado em vários estudos, sendo que alguns já foram publicados, demonstrando aumento de sobrevida global quando comparada à terapia padrão no tratamento de melanoma (ROBERT et al. 2015),

câncer de pulmão de células não pequenas (BORGHAEI et al. 2015), carcinoma renal de células claras (MOTZER et al. 2015), dentre outros.

Os primeiros dados de estudos clínicos de anticorpos anti-PD-1 no tratamento de CMTN se mostraram promissores. Os resultados preliminares de ensaios clínicos com pembrolizumabe (um anticorpo monoclonal anti-PD-1), numa coorte de pacientes com CMTN metastático politratado (n=27), mostraram uma taxa de resposta geral de 18,5%, incluindo uma resposta completa (3,7%) (NANDA et al. 2016).

Em outro estudo de fase I, um total de 54 pacientes com CMTN foram tratadas com atezolizumabe, um anticorpo anti-PD-L1 humano com uma região Fc modificada para evitar citotoxicidade dependente de anticorpos ou indução de citotoxicidade complementar-dependente. A taxa de resposta objetiva foi de 19% e a duração da resposta variou de 0,1 a 41,6 semanas (GIBSON 2015). Num outro ensaio clínico em CMTN metastático com expressão de PD-L1 (N=9), relatou-se uma taxa de resposta de 33,3%, com uma paciente apresentando resposta completa (MITTENDORF e HUNT 2015).

Mais recentemente, ADAMS et al. (2017) avaliaram, em um estudo de fase II (KEYNOTE-086), com 177 pacientes com CMTN (44% delas já tinham recebido ≥ 3 linhas de quimioterapia e $>60\%$ dos tumores apresentavam PD-L1 $\geq 1\%$), com uso de pembrolizumabe observaram uma taxa de resposta geral de 5%, independentemente da expressão de PD-L1. A melhor resposta geral foi 0,6% de (RC), 4% (RP), e 21% (DE). As SLP e SG medianas foram de 2 meses e 8,9 meses, respectivamente, e em 6 meses foi de 12% e 69%, respectivamente. A taxa de resposta foi numericamente menor em pacientes com fatores prognósticos desfavoráveis como DHL alto e

metástases hepáticas (ADAMS et al. 2017).

LOI et al. (2017), usando os dados do estudo KEYNOTE-086, analisaram a quantidade de TILs como biomarcador para imunoterapia e determinaram a relação entre a quantidade de TIL estromais e resposta ao pembrolizumabe. Foram analisados 193 tumores. Foi observado uma alta percentagem de TIL nos tumores de pacientes da coorte B (pacientes sem tratamento prévio e com PD-L1 positivo), com TIL médio de 17,5% versus 5% na coorte A (pacientes previamente tratados sem expressão de PD-L1) ($p < 0,001$). O pembrolizumabe mostrou resposta significativamente relacionada aos níveis de TILs estromais. A taxa de resposta em pacientes com TIL estromal maior ou igual a mediana *versus* menor que a mediana foi de 6,4% *versus* 1,9% na coorte A, e 39,1% *versus* 8,7% na coorte B. A contagem média de TILs estromais em respondedores em comparação ao que não responderam foi de 10% (5-30%) *versus* 5% (1-10%) na coorte A, e 50% (35-70%) *versus* 15% (5-40%) na coorte B, respectivamente. Números mais elevados de TIL foram associados a melhores taxas de resposta ($p = 0,014$). Os autores concluíram que os níveis de TIL podem indentificar os pacientes com CMTN que têm maior chance de obter resposta com pembrolizumabe como monoterapia, particularmente na primeira linha de tratamento metastático (LOI et al. 2017).

Entretanto apenas uma minoria de pacientes com câncer apresenta remissão de tumor clinicamente relevante após o tratamento anti-PD-1 isolado, sendo ainda necessário se identificar um fator preditivo para determinar com mais exatidão quais pacientes obterão benefício com o uso de inibidores de *checkpoints* imunes. Existem várias questões não resolvidas em relação à análise de PD-L1: anticorpos de detecção variáveis, técnicas de imuno-histoquímica diferentes, preparação do tecido a ser

analisado, variabilidade de processamento, biópsias primárias *versus* metastásicas, expressão oncogênica *versus* induzida de PD-L1 e avaliação da marcação no tumor *versus* células imunes (SZÉKELY et al. 2017).

MITTENDORF et al. (2014) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a expressão de PD-L1 em 120 amostras de carcinomas mamários triplo-negativos, e observaram expressão desta proteína em 19% dos casos. A expressão de PD-L1 esteve associada com maior infiltrado linfocitário CD8+, e cerca de 50% dos tumores que expressavam PD-L1 tinha perda de expressão de PTEN. Estes autores demonstraram ainda que a deleção de PTEN em linhagens celulares promoveu aumento da expressão de PD-L1 nas células tumorais, confirmando os dados do TCGA (MITTENDORF et al. 2014).

A análise oriunda do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) mostrou que PD-L1 está expresso numa percentagem alta dos cânceres de mama do tipo *basal-like*. Da mesma forma, 35% destes tumores têm perda ou mutação de *PTEN*, e 7% apresenta mutação em *PI3KCA*, sugerindo uma associação causal entre estas proteínas (MU et al. 2011; LI et al. 2017).

A expressão de PD-L1 também pode ser regulada em resposta a ativação de vias envolvidas com sinalização dependente de citocinas, notadamente a ativação de STAT1 ou da via PI3K-AKT (PARDOLL 2012). Em linhagens celulares de carcinoma mamário com perfil *basal-like*, foi visto que a exposição a interferon-gama aumentou os níveis de PD-L1 de forma mais significativa nestas linhagens em comparação às de outros subtipos, da mesma forma, a expressão de PD-L1 nestas linhagens esteve associada a níveis mais altos de STAT1 (SOLIMAN et al. 2014).

As proteínas da família STAT foram descobertas após serem reconhecidas

por agirem conjuntamente com as citocinas e os receptores de crescimento, e desempenham um papel crucial na determinação das características fenotípicas do tumor. As STATs detectam uma variedade de sinais na membrana celular e os transduzem para o núcleo, afetando diretamente a regulação de genes envolvidos em crescimento celular, sobrevivência, diferenciação e motilidade. STAT1 é um mediador central da via de sinalização do interferon tipo I e tipo II (IFN), no entanto, ambos os IFNs também podem ativar o STAT3. STAT1 e STAT3 têm uma interação complexa tanto com as células tumorais quanto com o microambiente tumoral, incluindo o infiltrado imune, de modo que STAT1 e STAT3 desempenham papéis opostos na tumorigênese, regulando assinaturas de genes distintos (TURKSON et al. 2000; CHAPMAN et al. 2000; GU et al. 2000; SUTHERLAND et al. 2006; AVALLE et al. 2012).

O STAT1 foi considerado como um supressor de crescimento tumoral com base em seu papel como uma molécula pró-apoptótica e anti-proliferativa, já o STAT3, está bem estabelecido como um fator-chave no crescimento e diferenciação de células epiteliais mamárias e se comporta como um oncogene. É também essencial na apoptose e na involução das células epiteliais da glândula mamária. Além disso, estudos em células animais deficientes em STAT, revelaram a existência de mecanismos regulatórios recíprocos de STAT1 e STAT3, com regulação cruzada entre as duas moléculas, de modo que a inativação do gene STAT3 resulta em fosforilação aumentada e prolongada de STAT1 em resposta a gp130 (RAMANA et al. 2000; TURKSON et al. 2000; CHAPMAN et al. 2000; SUTHERLAND et al. 2006; AVALLE et al. 2012).

Claramente, há uma grande necessidade de se compreender melhor a biologia do CMTN e desenvolver tratamentos eficazes para este tipo de câncer de mama tão agressivo e letal, além de melhor caracterizar qual o papel que a resposta imune e inflamatória desempenha neste contexto.

2 JUSTIFICATIVA

O CMTN é um dos subtipos de carcinoma mamário mais agressivos. Dessa forma, têm-se procurado fatores prognósticos a fim de se identificar aquelas pacientes que evoluirão com pior desfecho e criar estratégias para modificar de alguma forma seu tratamento e curso evolutivo.

O tipo de resposta inflamatória e imunológica ao redor do tumor parece estar relacionados tanto com a evolução do tumor, quanto com resposta a tratamento.

Os avanços recentes no entendimento do funcionamento do microambiente tumoral e do funcionamento do sistema imunológico foram essenciais para o surgimento de novas opções terapêuticas, baseadas na modulação da resposta imune antitumoral, como os reguladores de *checkpoints* imunológicos (anti-CTLA-4, anti-PD1 e PD-L1/L2). Torna-se também necessário o desenvolvimento de métodos preditores de resposta a estes novos tratamentos. Sendo assim, a expressão tumoral de PD-1, PD-L1 e PD-L2 pode emergir como um potencial biomarcador.

Dessa forma, nosso estudo procura avaliar a presença desses marcadores imuno-histoquímicos e correlacioná-los com os dados clínicos e com o tipo de resposta imune/inflamatória.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a intensidade e composição do infiltrado inflamatório em carcinoma de mama invasivo triplo-negativo operado e sua associação com a expressão protéica de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e desfechos clínicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar a intensidade do infiltrado inflamatório (percentagem de TILs no estroma) e determinar a frequência absoluta de células com expressão de CD8, CD4, FOXP3, CD68, CD163 e CD20, por imuno-histoquímica, no infiltrado inflamatório tumoral.
- 2 Testar a associação do número de cada tipo de célula inflamatória infiltrando o tumor, bem como de células que expressam PD1, PD-L1 e PD-L2, com outras variáveis clínico-patológicas e demográficas.
- 3 Investigar a expressão de PTEN nas células tumorais e de pSTAT1 (fosfo-STAT1) no infiltrado inflamatório e testar a associação destes com a expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2.
- 4 Avaliar se existe correlação entre as células expressando CD8, CD4, FOXP3, CD68, CD163, CD20, PD-1, PD-L1, PD-L2, PTEN e pSTAT1.

- 5 Determinar o impacto do número de células expressando CD8, CD4, FOXP3, CD68, CD163, CD20, PD-1, PD-L1, PD-L2, PTEN e pSTAT1 na sobrevida global.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO E TIPO DE ESTUDO

O estudo foi realizado através do método observacional, descritivo, de natureza quantitativa e caracterizado como uma coorte retrospectiva.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO E COLETA DE DADOS

A população do estudo foi composta por todos os casos diagnosticados com câncer de mama invasivo do subtipo triplo-negativo definido por imunohistoquímica, de mulheres tratadas no A.C.Camargo Cancer Center de janeiro de 2002 a dezembro de 2014. Toda análise do material anatomo-patológico foi realizada somente nas biópsias obtidas antes do início de qualquer tratamento sistêmico e da radioterapia. As pacientes potenciais foram identificadas a partir do registro eletrônico de prontuários do hospital através da ferramenta de informática RECRUIT, empregando o CID-10 C50 e o termo “triplo-negativo“.

Foram coletados dados demográficos, clínicos, patológicos e de tratamento, empregando ficha de coleta estabelecida para esse estudo (Anexo 3), a partir de informações registradas no prontuário médico das pacientes. O estadiamento foi realizado empregando-se a sétima edição da AJCC. Todos os dados foram tabulados em planilha Excel.

Este estudo foi submetido a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center e aprovado para execução sob o número 1914/14B (Anexo 1). Como se trata de estudo retrospectivo com análise de dados de resgistro médico e material patológico de arquivo, solicitamos dispensa de aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido, o que foi concedido pelo Comitê de ética médica.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes do sexo feminino com diagnóstico confirmado histologicamente de carcinoma mamário invasivo de mama, subtipo triplo-negativo (definido pela expressão de RE<1%, expressão de RP<1%, e ausência de expressão da proteína HER2 ou de amplificação do gene *c-ERBB2*), operadas, com material anatomopatológico revisado no A.C.Camargo Cancer Center.
- Ter recebido tratamento no A.C.Camargo Cancer Center.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes metastáticas ao diagnóstico.
- Ausência de material biológico disponível no arquivo do departamento de Anatomia Patológica do hospital A.C.Camargo Cancer Center.
- Pacientes que só disponham de material (biópsia ou peça cirúrgica) pós-quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante.
- Pacientes sem dados do seguimento clínico.

4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada em H&E e determinada pela percentagem de TILs no estroma, utilizando-se os critérios e recomendações descritos por DENKERT et al. (2010) e LOI et al. (2013) e uniformizados por SALGADO et al. (2014) (Anexo 2), sendo avaliado por dois patologistas com experiência em patologia mamária (Dr. Victor Piana de Andrade e Dra Tatianne Neotti). Fotos representativas das lâminas coradas por H&E empregadas na avaliação do infiltrado inflamatório estão mostradas no Anexo 2 (Quadro 1 e Figuras 1 e 2).

De acordo com SALGADO et al. (2014), a uniformização da avaliação do infiltrado inflamatório deve seguir as recomendações abaixo:

- Os TILs devem ser avaliados no estroma (= % de TIL estromal); ou seja, área ocupada por células inflamatórias mononucleares no estroma;
- Os TILs também devem ser avaliados dentro das bordas do tumor invasivo;
- Deve ser excluído TIL nas áreas fora da borda do tumor, em torno de carcinomas ductais in situ (CDIS) e lóbulos normais;
- Excluir áreas com artefatos, necroses, áreas de regressão e sítios de biópsias prévias;
- Todas as células mononucleares devem ser incluídas, porém os polimorfonucleares devem ser excluídas;
- Uma secção (4,0-5,0 μ m, ampliação \times 200-400) por paciente é considerada como suficiente;

- Cortes inteiros de peças devem ser preferido em relação a biópsias, quando possível;
- Os TILs devem ser analisados como um parâmetro contínuo, por exemplo, 80% de TILs estromais significa que 80% da área estromal mostra um infiltrado mononuclear denso;
- O câncer de mama com predomínio de linfócitos pode ser usado como termo descritivo para tumores que contêm mais linfócitos do que células tumorais, no entanto, os limiares variam entre 50% e 60% de linfócitos estromais.

As lâminas originais foram revistas e 2 áreas representativas de tumor das pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo de mama com perfil triplo-negativo foram selecionadas para a obtenção de dois *cores* de 1,0 mm de cada amostra, que foram transferidos do bloco de parafina original para um bloco “receptor” de TMA, onde foram, posteriormente, realizadas as reações imuno-histoquímicas.

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

As análise imuno-histoquímica foram realizadas com protocolo automatizado e reagentes prontos para uso no equipamento Benchmark Ultra (Ventana Medical Systems, Inc.) seguindo as diluições e condições de reação padronizadas para cada anticorpo (Quadro 1).

Quadro 1 - Características dos anticorpos utilizados no estudo e padronização das reações de imuno-histoquímica.

Anticorpo	Fabricante	Cone	Referência	Padronização (equipamento/diluição/tempo de recuperação antigênica+tipo de solução/tempo de incubação do anticorpo)	Padrão de marcação	Controle positivo
PD-L1/CD274	Spring Bioscience	SP263	M442S	Ventana; 1/50 36CC2/56Ab	Membrana	Placenta
PD-L2/CD273	Sigma-Aldrich	Policlonal	SAB35003 95	Ventana; 1/400 30CC1/32Ab (ultrawash)	Membrana	Placenta
CD163	Vector Laboratories	10D6	VP-C374	Ventana; 1/50 30CC1/32Ab	Membrana	Baço
PD1	Abcam	NAT105	ab52587	Ventana; 1/50 30CC1/32Ab	Membrana	Tonsila
FOXP3	Abcam	236A/ E7	ab20034	Ventana; 1/5 30CC1/32Ab	Núcleo	Tonsila
pSTAT1 (Tyr701)	Cell Signaling	58D6	#9167	Ventana; 1/100 30CC1/32Ab	Núcleo	Linfoma não-Hodgkin
PTEN	Thermo Scientific	17-A	MS-1601	Ventana; 1/50 60CC1/48Ab	Citoplasma	Estômago
CD4	Ventana	SP35	790-4423	Ventana; pré-diluído 30CC1/32Ab	Membrana	Tonsila
CD8	Ventana	SP57	790-4460	Ventana; pré-diluído 30CC1/32Ab	Membrana	Tonsila
CD20	Ventana	L26	760-2531	Ventana; pré-diluído 30CC1/32Ab	Membrana	Tonsila
CD68	Ventana	KP-1	790-2931	Ventana; pré-diluído 30CC1/32Ab	Citoplasma, membrana	Tonsila

Nota: *Solução CC1 equivale ao Tris-EDTA pH=9.0

*Solução CC2 equivale ao Citrato pH=6.0

As diluições e reações de imuno-histoquímica foram devidamente padronizadas por Marina França, do Departamento de Anatomia Patológica, sob a supervisão do Dr. Victor Pianna.

A expressão dos marcadores CD20 (linfócito B), CD4 e CD8 (linfócito T), FOXP3 (linfócitos T regulatórios - Treg), CD68 (macrófagos), CD163 (macrófagos de resposta M2), pSTAT1 e PD-1 foi avaliada nas células inflamatórias localizadas no estroma do tumor, PD-L1 e PD-L2 nas células tumorais e no infiltrado inflamatório localizado no estroma do tumor, e PTEN nas células tumorais (ausência

de marcação). O anticorpo anti PD-L2 demonstrou marcação difusa e inespecífica apesar das várias tentativas de otimização do protocolo, impedindo sua análise. Fotos representativas das marcações imuno-histoquímicas estão representadas no Anexo 7 (Figuras 7.1 a 7.16).

Foi realizada a contagem automatizada do número total de células positivas no estroma tumoral para cada marcador de avaliado utilizando-se o equipamento Aperio AT2 (Leica Biosystems) e os protocolos sugeridos pelo fabricante para marcação de membrana (*Aperio Membrane Algorithm*) e citoplasma (*Positive PixelCount v9*) em área delimitada manualmente por um patologista (VPA), sem conhecimento dos dados clínicos, direcionada para a maior densidade de células positivas com boa distinção do estroma tumoral. Em cada uma das replicatas técnicas dos casos no TMA foi delimitada uma área, obtendo-se assim o número de células marcadas por mm^2 e, posteriormente, foi calculada a média do número de células marcadas dos dois *cores* analisados em cada caso (nos casos com apenas um *core* avaliável, esse valor único foi utilizado, e casos com perda dois *cores* no TMA foram excluídos da análise daquele anticorpo).

A análise da marcação com o anticorpo PD-L1 foi feita tanto no infiltrado inflamatório do estroma como nas células tumorais, e registrados separadamente, pelo método de análise direta em microscópio ótico, por um patologista com treinamento especializado para avaliação da expressão de PD-L1 (Dra. Mariana Pettacia). A média aritmética da contagem de dois *cores* de cada amostra (replicatas) foi utilizada para a análise estatística (quando apenas um *core* estava representado, apenas este foi considerado para análise).

Os dados coletados foram tabulados em planilha Excel.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregada análise descritiva das variáveis em que foram apresentadas as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%), para as variáveis qualitativas, e medidas de tendência central e dispersão, como a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo, para as variáveis quantitativas.

O teste de qui-quadrado ou exato de Fisher foram usados para testar a associação entre variáveis qualitativas de interesse; e os testes t de Student ou de U Mann-Whitney foram aplicados com o objetivo de comparar as médias de variáveis quantitativas contínuas entre subgrupos de interesse. Nas situações em que houve mais de dois grupos, o teste ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis foram aplicados.

Para o teste de correlação dos marcadores utilizamos o teste de correlação de Spearman, cuja interpretação, dado os valores numéricos obtidos para ρ (rho) podem ser: $\rho = 0,00$ a $0,019$ (correlação muito fraca), $\rho = 0,20$ a $0,39$ (correlação fraca), $\rho = 0,40$ a $0,69$ (correlação moderada), $\rho = 0,70$ a $0,89$ (correlação forte), $\rho = 0,90$ a $1,00$ (correlação muito forte).

A sobrevida global (SG) foi definida como o tempo em meses entre a data do diagnóstico e a morte por qualquer causa. Sobrevida câncer-específica (SCE) foi definida como o tempo em meses entre a data do diagnóstico e a data da morte por câncer de mama.

Usamos o estimador de Kaplan–Meier para calcular as curvas de sobrevivência. Os casos vivos na data do último seguimento registrado em prontuário foram censurados. A sobrevida global e a sobrevida câncer-específica dos pacientes que expressam por imuno-histoquímica PD-L1, bem como o impacto das demais

variáveis demográficas, clínicas e patológicas, foram comparadas utilizando o teste de log-rank. Os fatores prognósticos foram avaliados por meio do modelo de regressão de Cox simples e múltiplo (COX 1972).

A estimativa do ponto de corte ideal das variáveis correlacionadas com sobrevida global foi obtida pela técnica da maximização da estatística log-rank (LAUSEN e SCHUMACHER 1992).

Consideramos estatisticamente significativas as análises cujos valores de p foram menores que 0,05. As análises foram realizadas por meio do software livre R versão 3.4 e do software IBM SPSS 24.0.

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO E DISPOSIÇÃO DOS CASOS ESTUDADOS

Inicialmente foram selecionadas 379 pacientes, registradas nos prontuários médicos, com diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo no período de Janeiro de 2002 a Dezembro de 2014. Porém, dessas, foram excluídas as pacientes com diagnóstico de carcinoma ducal *in situ*, pacientes que não realizaram o tratamento nessa instituição, pacientes sem biópsia ou peça presentes no arquivo e aquelas que na verdade eram de subtipos luminais ou HER2 após revisão do prontuário. Dessas, restaram 267 pacientes das quais foram coletadas todas as informações clínicas e demográficas. Deste grupo, 166 pacientes que dispunham de lâminas de H&E no arquivo da Anatomia Patológica foram selecionadas para análise do infiltrado imune/inflamatório, e dessas pacientes, 76 também dispunham de blocos de parafina e tiveram material biológico recuperado para construção de um TMA para realização das análises imuno-histoquímicas (Figura 2).

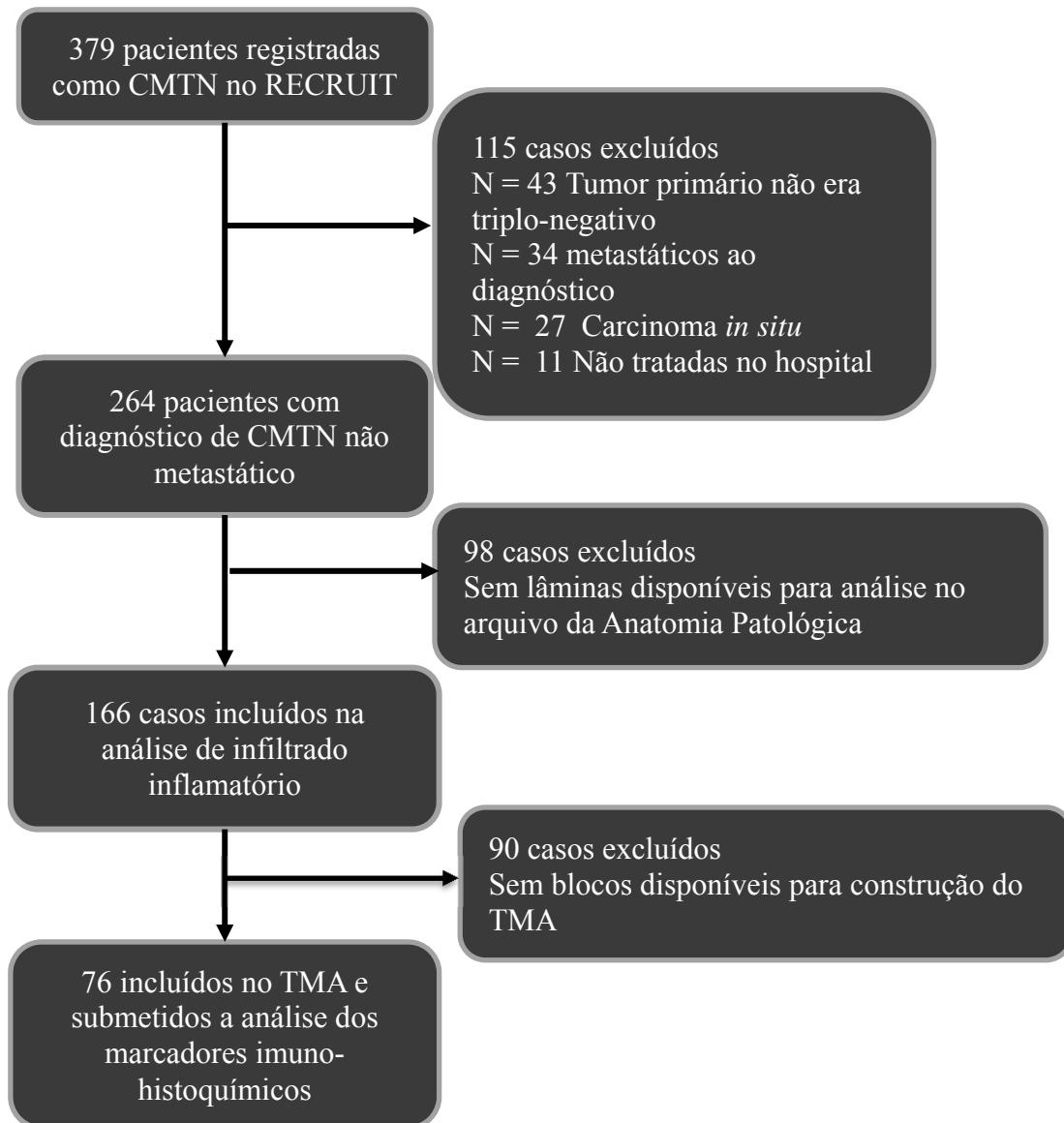


Figura 2 - Fluxograma com descrição dos casos incluídos e excluídos no estudo.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS DAS PACIENTES AVALIADAS QUANTO À INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO.

Foram incluídas nesta parte da análise 166 pacientes com diagnóstico de carcinoma mamário invasivo triplo-negativo, operadas e tratadas no A.C.Camargo Cancer Center, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2014.

Trinta e quatro por cento (34%) das pacientes eram brancas e apenas 8 (0,6%) negras, com média de idade de 47 anos. O peso médio foi de 69,1Kg, e o IMC médio de 26,7kg/m². A idade média da menarca foi aos 11 anos, e a idade média para menopausa foi aos 47,2 anos. Dezesesseis pacientes (9,6% do total) com informação disponível apresentavam o gene *BRCA1/2* mutado. Dez (6%) pacientes apresentavam história pessoal de câncer de mama e 11 (6,6%) apresentavam história pessoal de outro tipo de câncer que não câncer de mama. Trinta e oito por cento das pacientes apresentavam história de câncer de mama na família e 45,8% história familiar de outro tipo de câncer (Tabela 2).

Das 166 pacientes, 111 (66,9%) eram não tabagistas e 134 (80,7%) eram também não etilistas. Noventa e duas pacientes (55,4%) tinham alguma comorbidade, 51 (30,7%) eram mulheres menopausadas e 95 (56,6%) eram pré-menopausadas. Doze (7,2%) tinham história prévia de terapia de reposição hormonal. Cento e doze (67,5%) pacientes tinham tido gestação prévia, 90 (54,2%) já haviam amamentado, 34 pacientes (20,5%) já haviam sofrido aborto e uma (0,6%) realizou fertilização. Da nossa amostra, 89 (53,6%) usaram contraceptivos orais (Tabela 2).

Em relação ao estadiamento clínico, as pacientes foram divididas em estágio IA (13,9%), IB (1,2%), IIA (28,9%), IIB (21,1%), IIIA (12,7%), IIIB (16,3%) e IIIC (6%), empregando o estadiamento da sétima edição da AJCC. Os dados demográficos e clínicos desta população estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Características clínicas e demográficas da amostra incluída na análise da intensidade do infiltrado inflamatório.

Variável	Descritor	Valor	Frequência N (%)
Raça	Branca		57 (34,3)
	Negra		1 (0,6)
	Outra		14 (8,4)
	Sem informação		94 (56,6)
Idade (anos)	Média	47,2	
	Mediana	47	
Peso (Kg)	Média	69,1	
	Mediana	67	
Índice de Massa Corpórea	Média	26,7	
	Mediana	26	
Mutação no gene <i>BRCA1/2</i>	Selvagem		7 (4,2)
	Mutado		16 (9,6)
	Desconhecido		143 (86,2)
História pessoal de câncer de mama	Sim		10 (6)
	Não		109 (65,7)
	Sem informação		47 (28,3)
História pessoal de outro câncer	Sim		11 (6,6)
	Não		109 (65,7)
	Sem informação		46 (27,7)
História familiar de câncer de mama	Sim		63 (38)
	Não		83 (50)
	Sem informação		20 (12)
História familiar de outros cânceres	Sim		76 (45,8)
	Não		66 (39,8)
	Sem informação		24 (14,5)
Tabagismo	Sim		29 (17,5)
	Não		111 (66,9)
	Sem informação		26 (15,7)
Álcool	Sim		5 (3)
	Não		134 (80,7)
	Sem informação		27 (16,3)

Cont/ Tabela 2

Variável	Descritor	Valor	Frequência N (%)
Comorbidades	Sim		92 (55,4)
	Não		60 (36,1)
	Sem informação		14 (8,4)
Menopausa	Sim		51 (30,7)
	Não		94 (56,6)
TRH* prévia	Sim		12 (7,2)
	Não		112 (67,5)
	Sem informação		42 (25,3)
Gestação prévia	Sim		112 (67,5)
	Não		26 (15,7)
Amamentação	Sim		90 (54,2)
	Não		36 (21,7)
	Sem Informação		40 (24,1)
Aborto	Sim		34 (20,5)
	Não		101 (60,8)
	Sem informação		31 (18,7)
Fertilização	Sim		1 (0,6)
	Não		116 (69,8)
	Sem informação		49 (29,5)
Uso de anticoncepcional oral	Sim		89 (53,6)
	Não		27 (16,3)
	Sem informação		50 (30,1)
Estadiamento clínico**	IA		23 (13,9)
	IB		2 (1,2)
	IIA		48 (28,9)
	IIB		35 (21,1)
	IIIA		21 (12,7)
	IIIB		27 (16,3)
	IIIC		10 (6)
Estadiamento (T)	T0		1 (0,6)
	TX		2 (1,2)
	T1		33 (19,9)
	T2		81 (48,8)
	T3		19 (11,4)
	T4		30 (18,1)
Estadiamento (N)	N0		77 (46,4)
	NX		2 (1,2)
	N1		56 (33,8)
	N2		20 (12)
	N3		11 (6,6)
Estadiamento (M)	M0		166 (100)
	M1		0 (0)

*TRH – terapia de reposição hormonal

** 7ª Edição da AJCC

Referente às características patológicas da biópsia, 88% foram classificados como carcinoma ductal invasivo, 4,2% como metaplásico, 3% como carcinoma lobular invasivo e 0,6% como medular. Nove (5,4%) eram tumores multicêntricos e 31 (18,7%) apresentavam CDIS associado. Em relação ao grau histológico, 3% apresentavam grau histológico (G) 1; 33,2%, G2; e 53%, G3. Grau nuclear 1 foi encontrado em 1,3%, 2 em 14,8%, e 3 em 75,3%. Foi observada presença de necrose em 63 (38%) das amostras e em 127 (76,5%) foi vista presença de inflamação. Presença de invasão vascular foi vista em 1,8%, invasão linfática em 8,4% e invasão perineural em 3% (Tabela 3).

Os dados relacionados ao tratamento estão resumidos na Tabela 4. Noventa e três (56%) pacientes foram submetidas à mastectomia total e 72 (43,4%) à ressecção segmentar. Radioterapia adjuvante foi realizada em 133 (80,1%) pacientes. Noventa (54,2%) receberam quimioterapia adjuvante. Das pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante, 31,6% obtiveram resposta patológica completa, 22,4% resposta parcial e 19,7% ausência de resposta à quimioterapia neoadjuvante e 26,3% sem informações.

Um total de 50 pacientes (30,1%) recidivaram. De todas as pacientes analisadas, 34 (20,5%) morreram por câncer. Em relação ao status do seguimento, 115 (69,3%) apresentavam-se sem evidência de doença, 37 (22,3%) haviam tido progressão de doença, 2 (1,2%) tinham doença estável e 12 (7,2%) apresentaram perda de seguimento (Tabela 4).

Tabela 3 - Características patológicas das biópsias representativas dos casos incluídos na análise da intensidade do infiltrado inflamatório.

Variável	Descritor	Frequência N (%)
Classificação histológica *CDI - Carcinoma ductal	CDI*	146 (88,0)
	CLI [#]	5 (3,2)
	Medular	1 (0,6)
	Metaplásico	7 (4,2)
	Outros	7 (4,2)
Multicentricidade invasivo.	Sim	9 (5,4)
	Não	100 (60,2)
	Sem informação	57 (34,4)
CDIS associado^s #CLI	Sim	31 (18,7)
	Não	90 (54,2)
	Sem informação	45 (27,1)
Grau Histológico (Scarff-Richardson-Blood) - carcinoma lobular invasivo.	G1	5 (3,0)
	G2	55 (33,2)
	G3	88 (53,0)
	Sem informação	18 (10,8)
Grau Nuclear ^s CDIS – carcinoma ductal in situ.	G1	2 (1,3)
	G2	24 (14,8)
	G3	125 (75,3)
	Sem informação	15 (8,6)
Necrose	Sim	63 (38)
	Não	71 (42,8)
	Sem informação	32 (19,2)
Inflamação	Sim	127 (76,5)
	Não	12 (7,2)
	Sem informação	27 (16,3)
Invasão Vascular	Sim	3 (1,8)
	Não	137 (82,6)
	Sem informação	26 (15,6)
Invasão linfática	Sim	14 (8,4)
	Não	121 (72,9)
	Sem informação	31 (18,7)
Invasão Perineural	Sim	5 (3,0)
	Não	135 (81,3)
	Sem informação	26 (15,7)

Tabela 4 - Características relacionadas ao tratamento e desfechos das pacientes incluídas na análise da intensidade o infiltrado inflamatório.

Variável	Descritor	Frequência N (%)
Tipo de cirurgia	Mastectomia total	93 (56)
	Ressecção segmentar	72 (43,4)
	Sem informação	1 (0,6)
Radioterapia	Sim	133 (80,1)
	Não	33 (19,9)
Recidiva	Sim	50 (30,1)
	Não	114 (68,7)
	Sem informação	2 (1,2)
Óbito por câncer	Sim	34 (20,5)
	Não	132 (79,5)
Óbito geral	Sim	36 (21,7)
	Não	130 (78,3)
Status da doença	Sem evidência de doença	115 (69,3)
	Progressão de doença	37 (22,3)
	Doença estável	2 (1,2)
	Perda de seguimento	12 (7,2)
Quimioterapia	Adjuvante	90 (54,2)
	Neoadjuvante	76 (45,8)
Resposta à quimioterapia neoadjuvante	Resposta completa	24 (31,6)
	Resposta parcial	17 (22,4)
	Ausência de resposta	15 (19,7)
	Sem informação	20 (26,3)

A percentagem de TILs no estroma foi avaliado em 165 pacientes, e variou de 0 a 90% de células inflamatórias. Categorizamos a percentagem de TILs em 3 níveis: $\leq 5\%$, entre 5 e 50%, e $>50\%$. Observamos que 47 (28%) tinha percentagem de TILs $\leq 5\%$, 86 (52%) entre 5 e 50% e 32 (19%) $>50\%$ (Tabela 5).

Tabela 5 - Caracterização da intensidade do infiltrado inflamatório e distribuição da população em relação a intensidade do infiltrado inflamatório.

Variável	%	Número de indivíduos com a variável presente N (%)
TILs no estroma		
Média	26	
Mediana	15	
Mínimo-Máximo	0-90	
Per centagem de TILs categorizado		
≤5%		47 (28)
5-50%		86 (52)
>50%		32 (19)
Total		165 (100)
Per centagem de TILs categorizado pelo ponto de corte		
≤5%		47 (28,5)
>5%		118(71,5)
Total		165 (100)

5.3 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TUMORAL (TIL) NA SOBREVIDA GLOBAL

O seguimento mediano da população avaliada para intensidade do TIL foi de 73,2 meses (6,1 anos), a sobrevida global mediana foi de 102 meses (8,5 anos), e a sobrevida câncer-específica mediana foi de 111 meses (9,2 anos).

A sobrevida global mediana dos pacientes que receberam quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante foi de 102 e 107 meses ($p < 0,001$), respectivamente (Figura 3).

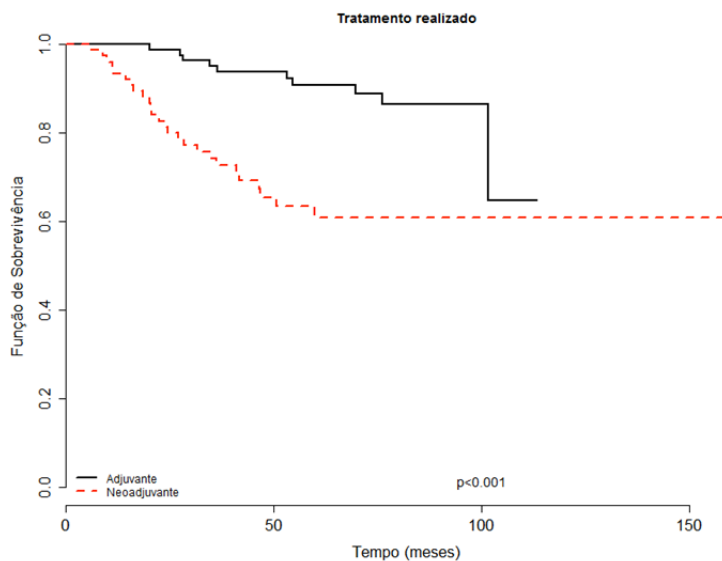


Figura 3 - Curvas de sobrevida global de acordo com o tratamento realizado.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

A sobrevida global mediana nos grupos de pacientes com percentagem de TILs no estroma $\leq 5\%$, entre 5 e 50% e $> 50\%$ foi, respectivamente, de 85 meses, 104 meses e 148 meses ($p=0,002$) (Figura 4).

Estabelecemos um ponto de corte ideal, para avaliação de SG, de 5% para percentagem de TILs no estroma, sendo que 28,5% dos pacientes tinham $\leq 5\%$ de TILs e a grande maioria (71,5%) tinha $> 5\%$ de TILs. A sobrevida global mediana foi de 85 meses para pacientes com $\leq 5\%$ de TILs e 136 meses para aquelas com $> 5\%$ de TILs ($p=0,001$) (Figura 5).

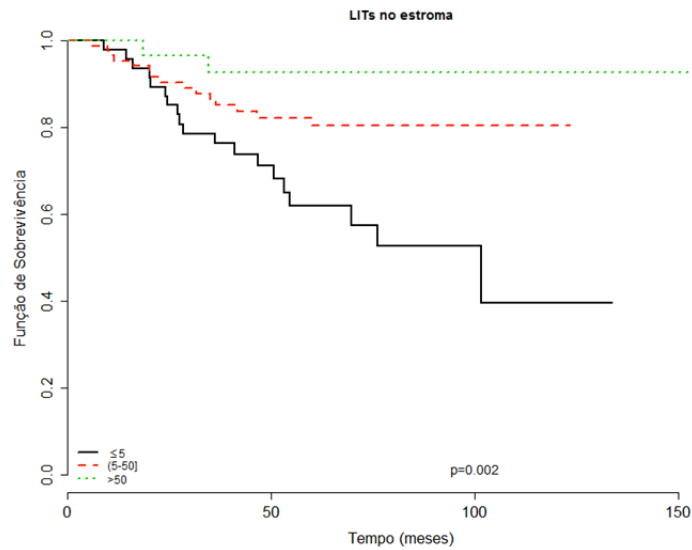


Figura 4 - Curvas de sobrevida global de acordo com a percentagem de TILs no estroma categorizada em $\leq 5\%$, 5-50%, $>50\%$. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

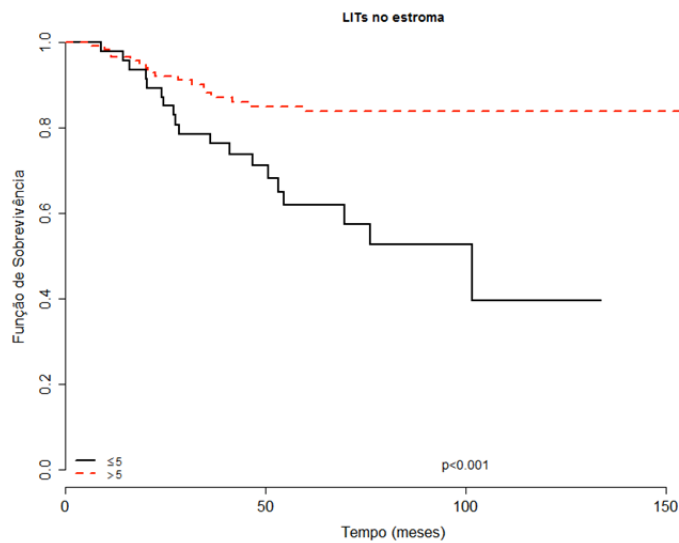


Figura 5 - Curvas de sobrevida global de acordo com a percentagem de TILs no estroma categorizada pelo ponto de corte $>$ ou $\leq 5\%$. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Para análise de SG, agrupamos o estadiamento clínico em 3 categorias, sendo que a sobrevida global mediana foi 69,2 meses para os estádios IA e IB agrupados, 62 meses para os estádios IIA e IIB, e 42,8 meses para os estádios IIIA, IIIB e IIIC ($p=0,001$) (Figura 6).

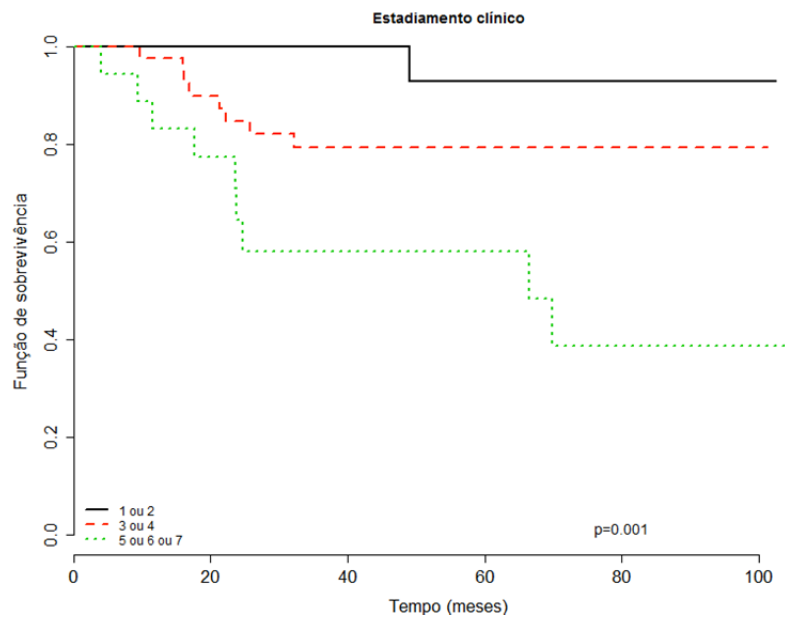


Figura 6 - Curvas de sobrevida global de acordo com a estadiamento clínico categorizado. Os pacientes foram agrupados quanto ao estadiamento nos seguintes grupos. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

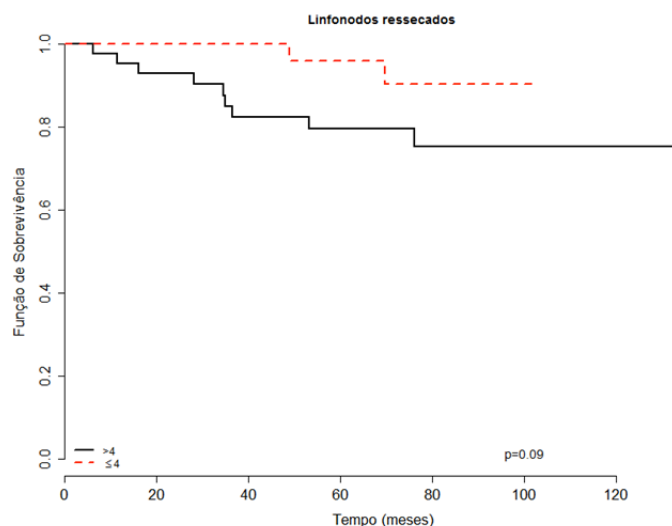


Figura 7 - Curvas de sobrevida global de acordo com o número de linfonodos ressecados. O ponto de corte ótimo para essa análise foi 4 linfonodos (>4 linfonodos ou ≤4 linfonodos ressecados). As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados

Nessa população, os fatores independentemente associados com maior sobrevida global foram: percentagem de TILs no estroma >5%, ter recebido quimioterapia adjuvante e ter menos de 4 linfonodos ressecados (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise multivariada de fatores associados com sobrevida global.

Variáveis	<i>p</i>	Intervalo	HR
Percentagem de TILs de acordo com o ponto de corte ≤5% versus >5%	0,005	(0,203-0,801)	0,708
Tratamento adjuvante versus neoadjuvante	0,039	(0,370-4,797)	0,460
Linfonodos ressecados de acordo com o ponto de corte ≤4 versus >4	0,039	(0,555-3,612)	0,689
Estadiamento clínico categorizado, IB e IA versus IIA e IIB versus IIIA, IIIB e IIIC	0,447	(0,390-5,555)	0,547

Foram incluídos na análise a percentagem de TILs no estroma, o tipo de tratamento sistêmico, o número de linfonodos acometidos e o estadiamento clínico categorizado. O método de regressão de Cox foi empregado para determinação dos fatores independentemente associados com sobrevida global.

5.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS DAS PACIENTES CUJAS AMOSTRAS FORAM INCLUÍDAS NO TMA

Foram incluídas amostras de 76 casos no TMA para análise imuno-histoquímica (Figura 2). Não foi possível recuperar os blocos de parafina das demais pacientes para tal análise, devido a esgotamento do bloco, extravio ou remoção da amostra do arquivo pela paciente.

A idade média dessas mulheres foi de 48,4 anos, a média de peso foi 71,8kg e o IMC médio de 27,2. A idade média para menarca foi de 11 anos. Vinte e uma (27,6%) pacientes eram brancas e 7 (9,2%) eram mutadas para *BRCA1/2*. Oito (10,5%) tinham história pessoal de câncer de mama e duas (2,6%) história pessoal de outro tipo de câncer, sendo que 39,5% tinha história familiar de câncer de mama e 48,7 % história familiar de outro tipo de câncer que não mama. Onze (14,5%) dessas pacientes eram tabagistas e 2 (2,6%) eram etilistas. Quarenta e uma (53,9%) pacientes tinham alguma comorbidade. Vinte e três (30,3%) eram menopausadas e cinco (6,6%) fizeram terapia de reposição hormonal. Cinquenta e duas (68,4%) pacientes apresentaram gestação a termo e dessas quarenta e duas (55,3%) amamentaram. Uso de contraceptivos orais foi relatado por 57,9% das pacientes. Vinte pacientes (26,3%) tiveram aborto e apenas 1 (1,3%) fez fertilização artificial (Tabela 7).

Tabela 7 - Características demográficas e clínicas das 76 pacientes cujas amostras forma incluídas no *Tissue Microarray* (TMA) para as análise imuno-histoquímica.

Variáveis	Descritor	Frequência N (%)
Raça	Branca	21 (27,6)
	Negra	0 (0)
	Amarela	7 (9,2)
	Sem informação	48 (63,2)
Idade (anos)	Média	48,4
	Mediana	47
Peso (Kg)	Médio	71,8
	Mediana	69,5
IMC*	Médio	27,2
	Mediana	26,6
Menarca	Média	10,4
	Mediana	11
Mutação de BRCA	Selvagem	1 (1,3)
	Mutado	7 (9,2)
	Desconhecido	68 (89,5)
História pessoal de câncer de mama	Sim	8 (11)
	Não	34 (44,5)
	Desconhecido	34 (44,5)
História pessoal de outro tipo de câncer	Sim	2 (2,6)
	Não	41 (53,9)
	Desconhecido	33 (43,5)
História familiar de câncer de mama	Sim	30 (39,5)
	Não	33 (43,5)
	Desconhecido	13 (17)
História familiar de outro tipo de câncer	Sim	37 (48,7)
	Não	23 (30,3)
	Desconhecido	16 (21)
Tabagismo	Sim	11 (14,5)
	Não	47 (61,8)
	Desconhecido	18 (23,7)
Etilismo	Sim	2 (2,6)
	Não	55 (72,4)
	Desconhecido	19 (25)
Comorbidades	Sim	41 (53,9)
	Não	23 (30,3)
	Desconhecido	12 (15,8)
Menopausa	Sim	23 (30,3)
	Não	40 (52,6)
	Desconhecido	13 (17,1)
TRH**	Sim	5 (6,6)
	Não	46 (60,5)
	Desconhecido	25 (32,9)
Amamentação	Sim	42 (55,3)
	Não	15 (19,7)
	Desconhecido	19 (25)
Aborto	Sim	20 (26,6)
	Não	38 (50)
	Desconhecido	18 (23,7)
ACO***	Sim	44 (57,9)
	Não	10 (13,2)
	Desconhecido	22 (28,9)

*IMC Índice de massa corpórea

**TRH - Terapia de reposição hormonal

***ACO - Contraceptivos orais

Em relação ao estadiamento clínico, treze (17,1%) eram estágio IA; duas (2,6%), IB; vinte e nove (38,2%), IIA; quatorze (18,4%), IIB; sete (9,2%), IIIA; nove (11,2%), IIIB; e duas (2,6%), IIIC (Tabela 8).

Referente às características patológicas dos tumores cujas peças foram incluídas no TMA, 71 (93,4%) eram de histologia ductal; 1 (1,3%), lobular; e 4 (5,3%), metaplásico. Cinquenta e um (67,1%) eram tumores multicêntricos e 31 (40,8%) não apresentavam carcinoma ductal *in situ* (CDIS) associado. Em relação ao grau histológico, 46 (60,5%) eram de grau 3, assim como em 53 (69,7%) o grau nuclear também era 3. Necrose estava presente em 30 (39,5%) amostras, inflamação estromal em 15 (19,7%), invasão vascular em 15 (19,7%), invasão linfática em 23 (30,3%) e invasão perineural em 18 (23,7%) (Tabela 9).

Tabela 8 - Distribuição de acordo com o estadiamento clínico dos tumores incluídos no TMA.

Variáveis	Descritor	Frequência N (%)
Estadiamento clínico	IA	13 (17,1)
	IB	2 (2,6)
	IIA	29 (38,2)
	IIB	14 (18,4)
	IIIA	7 (9,2)
	IIIB	9 (11,8)
	IIIC	2 (2,7)
cT	T0	1 (1,4)
	Tis	0 (0)
	T1	20 (26,3)
	T2	45 (59,2)
	T3	2 (2,6)
	T4	8 (10,5)
cN	N0	37 (48,7)
	NX	2 (2,6)
	N1	26 (34,3)
	N2	8 (10,5)
	N3	3 (3,9)
cM	M0	76 (100)
	M1	0 (0)

Tabela 9 - Características patológicas dos tumores incluídos no TMA. As informações foram aquelas obtidas a partir da biópsia realizada antes de qualquer tratamento.

Variáveis	Descritor	Frequência N (%)
Histologia	CDI [#]	71 (93,4)
	CLI*	1 (1,3)
	Metaplásico	4 (5,3)
Multicentricidade	Presente	25 (32,9)
	Ausente	51 (67,1)
CDIS**	Presente	31 (40,8)
	Ausente	45 (59,2)
Grau Histológico	G1	3 (3,9)
	G2	27 (35,6)
	G3	46 (60,5)
Grau nuclear	G1	1 (1,4)
	G2	22 (28,9)
	G3	53 (69,7)
Necrose	Presente	30 (39,5)
	Ausente	45 (59,2)
	Sem informação	1 (1,3)
Inflamação	Presente	51 (67,1)
	Ausente	25 (32,9)
Invasão vascular	Presente	15 (19,7)
	Ausente	61 (80,3)
Invasão Linfática	Presente	23 (30,3)
	Ausente	52 (68,4)
	Sem informação	1 (1,3)
Invasão perineural	Presente	18 (23,7)
	Ausente	58 (76,3)

[#]CDI – carcinoma ductal invasivo

*CLI – carcinoma lobular invasivo

**CDIS – Carcinoma ductal in situ

Em relação ao tipo de cirurgia realizada, 41 pacientes (53,9%) foram submetidas à mastectomia total e 35 (46,1%) à ressecção segmentar, sendo que 50% tinham tumores do lado direito e a grande maioria 38 (50%) realizou esvaziamento axilar. Das 76 pacientes incluídas, 81,6% fizeram tratamento adjuvante e 18,4% receberam quimioterapia neoadjuvante. Das 14 pacientes que receberam tratamento neoadjuvante, duas (14,2%) obtiveram resposta patológica completa, seis (42,8%) resposta parcial e três (21,4%) ausência de resposta (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados referentes ao tratamento das pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA.

Variáveis	Descritor	Frequência N (%)
Tipo de tratamento	Adjuvante	62 (81,6)
	Neoadjuvante	14 (18,4)
Tipo de cirurgia	Mastectomia total	41 (53,9)
	Ressecção segmentar	35 (46,1)
Lado operado	Direito	38 (50,0)
	Esquerdo	38 (50,0)
Esvaziamento axilar	Sim	38 (50,0)
	Não	32 (42,1)
	Sem informação	6 (7,9)
Radioterapia	Sim	58 (76,3)
	Não	18 (23,7)
Resposta à quimioterapia neoadjuvante	Resposta completa	2 (14,2)
	Resposta parcial	6 (42,8)
	Sem resposta	3 (21,4)
	Sem informação	3 (21,6)

Em relação aos desfechos clínicos, das 76 pacientes analisadas, dezoito (23,7%) recidivaram, 11 (14,5%) faleceram, 59 (77,6%) estavam sem evidência de doença à data do último seguimento, 10 (13,2%) apresentaram progressão de doença e 7 (9,2%) apresentaram perda de seguimento (Tabela 11).

Tabela 11 - Desfecho clínico das pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA.

Variáveis	Descritor	Frequência N (%)
Recidiva	Sim	18 (23,7)
	Não	57 (75,0)
	Sem informação	1 (1,3)
Status da doença	Sem evidência de doença	59 (77,6)
	Progressão de doença	10 (13,2)
	Perda de seguimento	7 (9,2)
Óbito por câncer	Sim	11 (14,5)
	Não	65 (85,5)

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO DAS AMOTRAS INCLUÍDAS NO TMA

Caracterizamos o infiltrado inflamatório de acordo com o valor da média do número de células positivas para cada marcador avaliado (Tabela 12), e observamos que o infiltrado inflamatório é enriquecido em células com marcação para CD68, CD163, CD8 e CD4. Paralelamente, avaliamos o percentual de amostras que apresentavam contagens acima da média de células com marcação positiva, ou negativa no caso de PTEN, para os anticorpos avaliados (Tabela 13). Observamos que na maior parte dos casos de CMTN, macrófagos e linfócitos T são as células mais prevalentes no microambiente tumoral.

Tabela 12 – Média da frequência de TILs, do número de células positivas para cada marcador avaliado no estroma ou negativas para PTEN no tumor por mm², e do percentual de células positivas para PD-L1 no estroma e no tumor das amostras incluídas no TMA.

Variável	N*	Média n	Média %	Desvio padrão
CD8	76	1513,53		1353,50
FOXP3	76	26,37		42,87
CD20	76	530,54		1093,47
CD4	76	1288,91		1354,23
CD163	76	2001,41		1630,75
CD68	76	2853,62		2247,43
PTEN	76	119,58		48,47
pSTAT1	76	119,76		197,67
PD1	73	252,59		365,51
PDL1 Tumor	62		4,53	14,48
PDL1 Estroma	48		12,17	20,85
Percentagem de TILs	71		28,34	25,78

*N- número de casos avaliados (algumas amostras não eram avaliáveis no TMA).

Tabela 13 – Distribuição das amostras de acordo com a média da frequência de TILs e do número de células positivas ou negativas (PTEN) para cada marcador avaliado no TMA.

MARCADOR	MÉDIAS	FREQUÊNCIA (%)
CD8	≤1513,52	44 (57,9)
	>1513,52	32 (42,1)
FOXP3	≤26,37	52 (68,4)
	>26,37	24 (31,6)
CD20	≤530,54	58 (76,3)
	>530,54	18 (23,7)
CD4	≤1288,91	48 (63,2)
	>1288,91	28 (36,8)
CD163	≤2001,41	43 (56,6)
	>2001,41	33 (43,4)
CD68	≤2853,62	44 (57,9)
	>2853,62	32 (42,1)
PTEN	≤119,58	28 (36,8)
	>119,58	48 (63,2)
pSTAT-1	≤119,76	52 (68,4)
	>119,76	24 (31,6)
PD-1	≤252,59	52 (68,4)
	>252,59	21 (27,6)
PD-L1 Tumor	≤4,53	51 (67,1)
	>4,53	11 (14,5)
PD-L1 Estroma	≤12,17	34 (44,7)
	>12,17	14 (18,4)
Percentagem de TILs	≤28,34	43 (56,6)
	>28,34	28 (39,4)

5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E DEMOGRÁFICAS, INFILTRADO INFLAMATÓRIO E COMPOSIÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Testamos a associação dos grupos definidos por apresentarem número de células com os marcadores de interesse abaixo ou acima da média com as variáveis clínicas-patológicas: estadiamento clínico (EC), tamanho do tumor (T), acometimento linfonodal (N), intensidade do infiltrado inflamatório (percentagem de LITs no estroma), grau histológico (GH), grau nuclear (GN), tipo histológico, invasão vascular sanguínea (IVS), invasão vascular linfática (IVL) invasão perineural (IPN) e necrose.

Encontramos associação entre expressão de PD-L1 no estroma e percentagem de TILs no estroma ($p=0,018$) (Tabela 14), entre expressão de PD-L1 no tumor e percentagem de TILs no estroma ($p=0,049$) e estadiamento N do TNM ($p=0,046$) (Tabela 15), e entre expressão de PD-1 com tipo histológico ($p=0,022$) (Tabela 16). Os demais marcadores não mostraram associação com características clínico-patológicas (Anexo 4).

Tabela 14 - Associação da marcação para PD-L1 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	PD-L1 ESTROMA*		p
		≤12,17 N (%)	>12,17 N (%)	
EC	IA ou IB	5 (14,7%)	5 (35,7%)	0,195
	IIA ou IIB	18 (52,9%)	7 (50,0%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	11 (32,4%)	2 (14,3%)	
T	T0, T1 ou T2	29 (85,3%)	13 (92,9%)	0,656
	T3 ou T4	5 (14,7%)	1 (7,1%)	
N	N0 ou N1	26 (76,5%)	13 (92,9%)	0,576
	N2	5 (14,7%)	1 (7,1%)	
	N3	3 (8,8%)	0 (0,0%)	
Perecentagem de TILs	≤30%	23 (74,2%)	4 (30,8%)	0,018
	>30%	8 (25,8%)	9 (69,2%)	
GH	I ou II	16 (47,1%)	3 (21,4%)	0,185
	III	18 (52,9%)	11 (78,6%)	
GN	I ou II	14 (41,2%)	2 (14,3%)	0,098
	III	20 (58,8%)	12 (85,7%)	
Tipo histológico	Ductal	33 (97,1%)	13 (92,9%)	0,503
	Outros	1 (2,9%)	1 (7,1%)	
IVS	Presente	8 (23,5%)	2 (14,3%)	0,701
	Ausente	26 (76,5%)	12 (85,7%)	
IVL	Presente	11 (32,4%)	4 (28,6%)	1
	Ausente	23 (67,6%)	10 (71,4%)	
IPN	Presente	9 (26,5%)	2 (14,3%)	0,469
	Ausente	25 (73,5%)	12 (85,7%)	
Necrose	Presente	11 (33,3%)	4 (28,6%)	1
	Ausente	22 (66,7%)	10 (71,4%)	

*A média do percentual de células positivas foi empregada para categorizar os grupos.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela 15 - Associação da marcação para PD-L1 nas células do tumor com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	PD-L1 TUMOR*		p
		≤4,53 N (%)	>4,53 N (%)	
EC	IA ou IB	11 (21,6%)	2 (18,2%)	0,677
	IIA ou IIB	28 (54,9%)	5 (45,5%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	12 (23,5%)	4 (36,4%)	
T	T0, T1 ou T2	43 (84,3%)	10 (90,9%)	1
	T3 ou T4	8 (15,7%)	1 (9,1%)	
N	N0 ou N1	46 (90,2%)	7 (63,6%)	0,046
	N2	3 (5,9%)	3 (27,3%)	
	N3	2 (3,9%)	1 (9,1%)	
Percentagem de TILs	≤30%	37 (77,1%)	4 (40,0%)	0,049
	>30%	11 (22,9%)	6 (60,0%)	
GH	I ou II	23 (45,1%)	2 (18,2%)	0,174
	III	28 (54,9%)	9 (81,8%)	
GN	I ou II	18 (35,3%)	2 (18,2%)	0,478
	III	33 (64,7%)	9 (81,8%)	
Tipo histológico	Ductal	49 (96,1%)	10 (90,9%)	0,449
	Outros	2 (3,9%)	1 (9,1%)	
IVS	Presente	12 (23,5%)	1 (9,1%)	0,431
	Ausente	39 (76,5%)	10 (90,9%)	
IVL	Presente	19 (37,3%)	2 (18,2%)	0,305
	Ausente	32 (62,7%)	9 (81,8%)	
IPN	Presente	12 (23,5%)	3 (27,3%)	1
	Ausente	39 (76,5%)	8 (72,7%)	
Necrose	Presente	17 (34,0%)	5 (45,5%)	0,504
	Ausente	33 (66,0%)	6 (54,5%)	

*A média do percentual de células positivas foi empregada para categorizar os grupos.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela 16 - Associação marcação para PD-1 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	PD-1*		p
		≤252,59 N (%)	>252,59 N (%)	
EC	IA ou IB	9 (17,3%)	6 (28,6%)	0,514
	IIA ou IIB	29 (55,8%)	11 (52,4%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	14 (26,9%)	4 (19,0%)	
T	T0, T1 ou T2	44 (84,6%)	19 (90,5%)	0,714
	T3 ou T4	8 (15,4%)	2 (9,5%)	
N	N0 ou N1	44 (84,6%)	18 (85,7%)	0,632
	N2	5 (9,6%)	3 (14,3%)	
	N3	3 (5,8%)	0 (0,0%)	
Percentagem de TILs	≤30%	35 (71,4%)	13 (68,4%)	1
	>30%	14 (28,6%)	6 (31,6%)	
GH	I ou II	19 (36,5%)	11 (52,4%)	0,326
	III	33 (63,5%)	10 (47,6%)	
GN	I ou II	17 (32,7%)	6 (28,6%)	0,948
	III	35 (67,3%)	15 (71,4%)	
Tipo histológico	Ductal	51 (98,1%)	17 (81,0%)	0,022
	Outros	1 (1,9%)	4 (19,0%)	
IVS	Presente	13 (25,0%)	2 (9,5%)	0,204
	Ausente	39 (75,0%)	19 (90,5%)	
IVL	Presente	19 (37,3%)	4 (19,0%)	0,219
	Ausente	32 (62,7%)	17 (81,0%)	
IPN	Presente	15 (28,8%)	3 (14,3%)	0,314
	Ausente	37 (71,2%)	18 (85,7%)	
Necrose	Presente	19 (36,5%)	8 (40,0%)	1
	Ausente	33 (63,5%)	12 (60,0%)	

*A média do número de células positivas por mm² foi empregada para categorizar os grupos. Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Também testamos a associação dos pontos de corte ótimos estabelecidos para a análise de SG de cada marcador com as variáveis clínico-patológicas: estadiamento clínico (EC), tamanho do tumor (T), acometimento linfonodal (N), intensidade do infiltrado inflamatório, grau histológico (GH), grau nuclear (GN), tipo histológico, invasão vascular sanguínea (IVS), invasão vascular linfática (IVL), invasão peri-

neural (IPN) e necrose (Anexo 7). Encontramos associação entre frequência de células positivas para PD-L1 no estroma com infiltrado inflamatório ($p=0,001$) e GN ($p=0,043$) (Tabela I), entre frequência de células positivas para PD-L1 no tumor e N ($p=0,046$) e infiltrado inflamatório ($p=0,049$) (Tabela J) e entre frequência de células PD-1 positivas e GN ($p=0,032$). Todos estes dados estão disponíveis no Anexo 5.

5.7 CORRELAÇÃO DOS MARCADORES AVALIADOS ENTRE SI E COM A INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Correlacionamos a intensidade do infiltrado inflamatório, avaliada como a percentagem de TILs no estroma, avaliado nas lâminas coradas com HE com o número de células expressando ou não (no caso do PTEN) os seguintes marcadores: CD20, CD4, CD8, CD163, CD68, FOXP3, pSTAT1, PD-1 no estroma, PTEN no tumor e PD-L1 no tumor e estroma. Também avaliamos a correlação destes marcadores entre si (Tabela 17).

Encontramos uma correlação positiva e estatisticamente significativa, porém fraca, da percentagem de TILs no estroma com marcação para PD-L1 no estroma ($p=0,02$) e com PD-L1 no tumor ($p=0,027$).

Os seguintes marcadores também apresentaram correlação entre si: CD4 com CD163, CD8, CD68 e FOXP3; CD163 com CD8, CD68, FOXP3, PD-L1 no estroma e ausência de marcação para PTEN; CD8 com CD68 e FOXP3; FOXP3 com ausência de marcação para PTEN; CD68 com FOXP3 e ausência de marcação para PTEN; e PDL-1 estromal com PD-L1 no tumor e ausência de marcação para PTEN.

A marcação para FOXP3 também esteve inversamente correlacionada com a marcação para PD-L1 no tumor (Tabela 17).

Tabela 17 - Correlação da percentagem de LITs no estroma e da expressão dos marcadores avaliados por imuno-histoquímica entre si.

Marcadores	CD20	CD4	CD163	CD8	CD68	FOXP3	PD-L1 Estroma	PD-L1 Tumor	PD1	PTEN Ausência	pSTAT-1
Percentagem LITs											
ρ	0,227	0,143	0,214	0,209	0,163	-0,027	0,350	0,290	0,139	0,072	0,142
p-valor	0,057	0,234	0,073	0,080	0,176	0,825	0,020	0,027	0,259	0,550	0,236
CD20											
ρ		0,049	0,010	-0,001	-0,141	-0,021	0,210	0,213	-0,105	0,010	-0,140
p-valor		0,677	0,933	0,990	0,226	0,858	0,153	0,097	0,378	0,930	0,227
CD4											
ρ			0,419	0,658	0,791	0,52	0,130	0,0003	0,046	0,207	0,062
p-valor			0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,380	0,998	0,699	0,073	0,595
CD163											
ρ				0,263	0,544	0,310	0,459	0,234	0,169	0,410	0,070
p-valor				0,022	<0,0001	0,006	0,001	0,067	0,152	<0,0001	0,551
CD8											
ρ					0,604	0,374	0,084	-0,041	-0,031	0,056	0,096
p-valor					0,001	0,001	0,569	0,753	0,794	0,633	0,410
CD68											
ρ						0,517	0,087	-0,061	0,087	0,249	0,029
p-valor						<0,0001	0,555	0,638	0,465	0,030	0,802
FOXP3											
ρ							0,181	-0,278	0,033	0,281	0,174
p-valor							0,218	0,029	0,780	0,014	0,133
PD-L1 Estroma											
ρ								0,519	0,188	0,451	-0,087
p-valor								<0,0001	0,206	0,001	0,557
PD-L1 Tumor											
ρ									0,110	0,187	-0,031
p-valor									0,399	0,145	0,811
PD-1											
ρ										0,042	-0,153
p-valor										0,726	0,198
PTEN											
ρ											0,004
p-valor											0,972

As correlações foram calculadas pelo teste de Spearman. Associações estatisticamente significativas estão destacadas em vermelho. O ρ (rho) indica a força da correlação e foi classificado da maneira que se segue: $\rho = 0,00$ a $0,019$ (correlação muito fraca), $\rho = 0,20$ a $0,39$ (correlação fraca), $\rho = 0,40$ a $0,69$ (correlação moderada), $\rho = 0,70$ a $0,89$ (correlação forte), $\rho = 0,90$ a $1,00$ (correlação muito forte).

5.8 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL E CÂNCER-ESPECÍFICA E DO IMPACTO DA COMPOSIÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

A sobrevida global mediana da população de pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA foi de 117,4 meses.

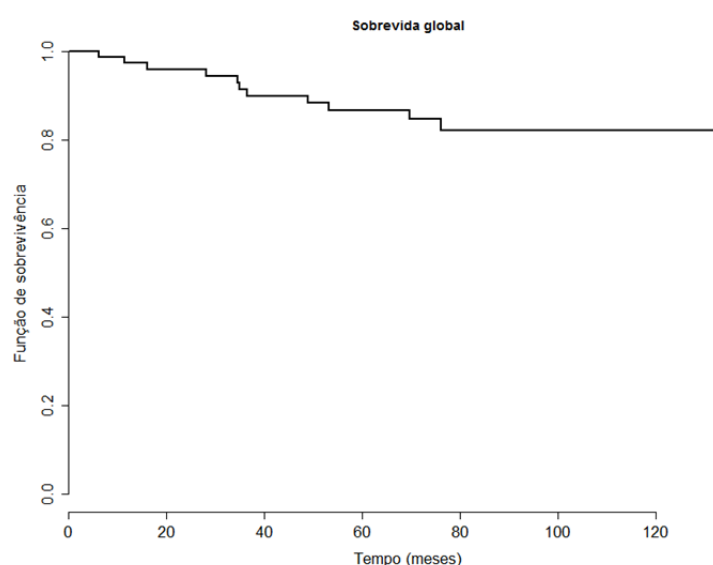


Figura 8 – Curva de sobrevida global de toda a população incluída na análise do TMA.

Quando analisamos a SG de acordo com o tipo de tratamento recebido, foi de 97,0 meses para as pacientes que fizeram tratamento adjuvante e 95,0 meses para as que receberam tratamento neoadjuvante, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,024$). Não realizamos análise em relação ao tipo de quimioterapia recebida, devido ao fato de a grande maioria das pacientes terem recebido quimioterapia base de antraciclina e taxano.

As sobrevidas medianas de acordo com o estadiamento clínico agrupado foi de 98,5 meses para os estádios IA e IB; 123 meses para os estádios IIA e IIB, e 77 meses para os estádios IIIA, IIIB e IIIC ($p=0,019$). Idade ($p=0,233$), número de linfonodos ressecados ($p=0,089$), Ki-67 ($p=0,175$) e presença ou ausência de inflamação na biópsia ($p=0,47$) não estiveram associados com sobrevida global (Anexo 6).

Agrupamos o estágio T em T0, T1 e T2 versus T3 e T4, cujas frequências foram 66 pacientes para o primeiro grupo e 10 para o segundo grupo. A SG mediana foi de 121 meses versus 72 meses em cada grupo, respectivamente ($p=0,001$) (Figura 9).

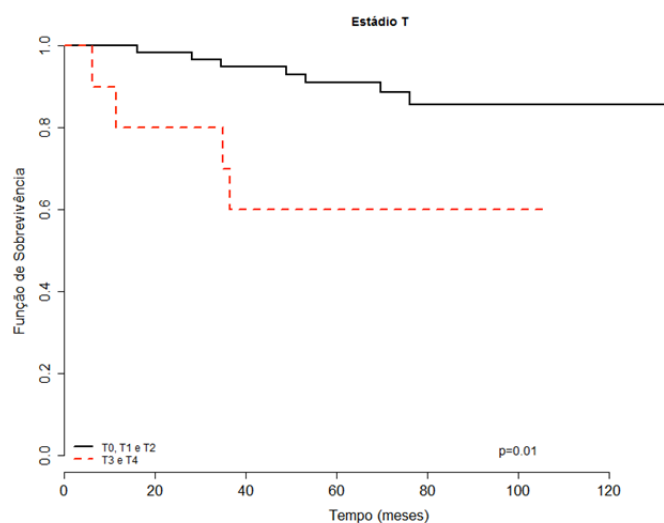


Figura 9 - Curva de sobrevida global de acordo com estágio T categorizado. As pacientes foram categorizadas em três categorias: T0, T1 e T2 versus T3 e T4. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Em relação ao N, separamos as pacientes em três grupos Nx e N0 versus N1 versus N2 e N3, cujas frequências foram sucessivamente 39, 26 e 11 pacientes, e que

apresentaram SG mediana de 102 meses, 111 meses e 63 meses, respectivamente ($p=0,009$) (Figura 10).

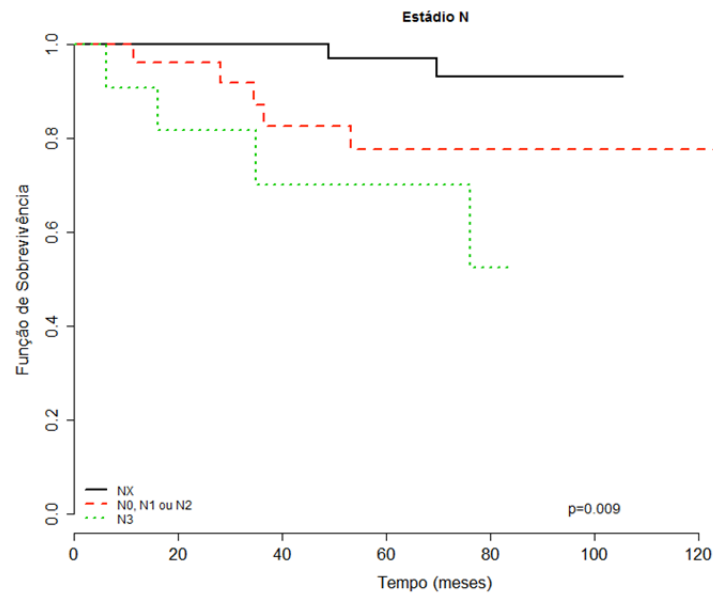


Figura 10 – Curvas de sobrevida global de acordo com estágio N categorizado. As pacientes foram agrupadas em três categorias: NX e N0, N1, ou N2 e N3. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Agrupamos as amostras quanto ao grau histológico (GH) da biópsia em dois grupos, sendo estes GH1/2 versus GH3. As frequências observadas foram 30 para o primeiro grupo e 46 para o segundo, e as sobrevidas globais medianas foram de 87 meses versus 118 meses ($p=0,740$) (Figura 11).

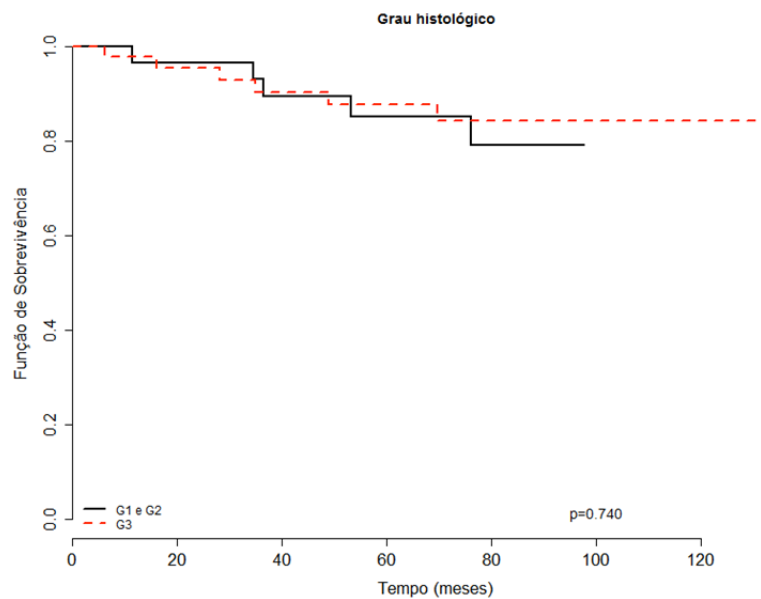


Figura 11 – Curvas de sobrevida global de acordo com grau histológico agrupado. As pacientes foram agrupadas em duas categorias: G1 e G2 versus G3. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank.

Encontramos um ponto de corte ótimo de 30% para avaliação da percentagem de TILs no estroma como fator prognóstico no grupo de pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA, sendo que, num grupo de 71 pacientes analisadas, 22 (28,9%) apresentavam percentagem de TILs maior do que 30% e 49 (64,5%), menor ou igual a 30%. A mediana de sobrevida global dessas pacientes foi de 113 e 101 meses, respectivamente ($p=0,139$) (Figura 12).

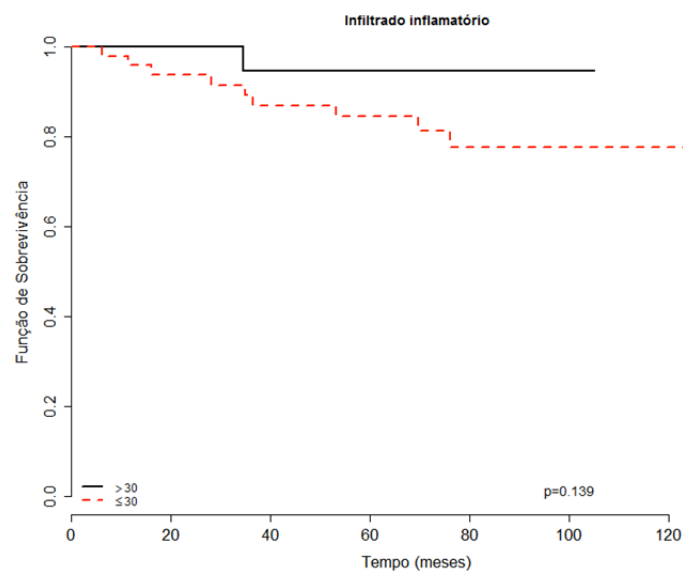


Figura 12 - Curvas de sobrevida global de acordo com a percentagem de TILs ($>30\%$ ou $\leq 30\%$) no estroma. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Quando utilizamos o ponto de corte de 5% para percentagem de TILs no estroma (mesmo ponto de corte empregado na população inicial de 116 pacientes), encontramos que dos 71 pacientes analisados, 15 (21,1%) apresentaram $\leq 5\%$ de TILs e a grande maioria 56 (78,87%) apresentaram $>5\%$ de TILs. Houve um aumento de sobrevida global para os pacientes com $>5\%$ de TILs no estroma, porém sem significância estatística ($p=0,178$) (Figura 13).

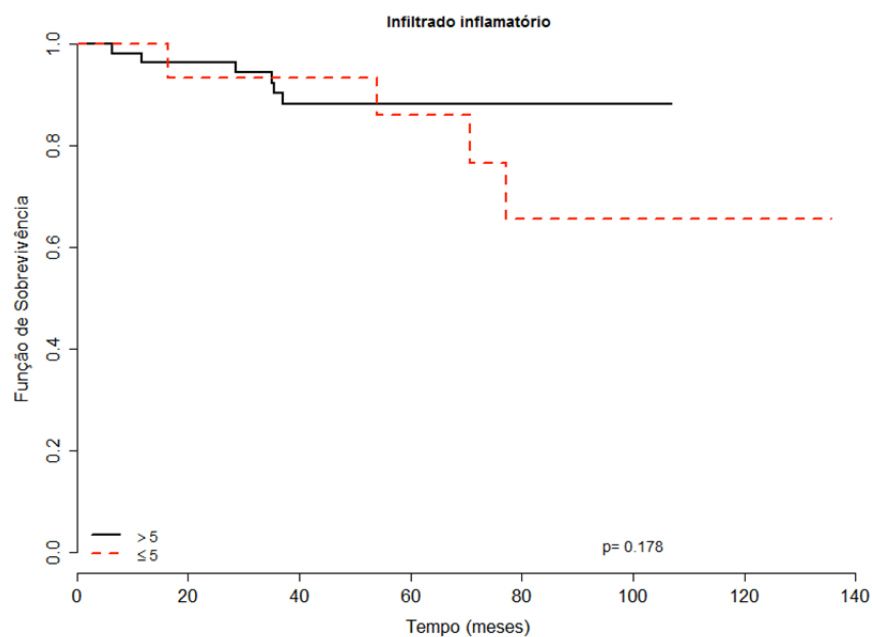


Figura 13 - Curvas de sobrevida global de acordo com a a percentagem de LITs ($>5\%$ ou $\leq 5\%$) no estroma. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Antes de avaliarmos o impacto da presença de células expressando os marcadores de interesse, determinamos os pontos de corte ótimos dos números de células positivas (ou negativas no caso de PTEN) por mm^2 ou % (PD-L1 e PD-1) para cada um dos marcadores para avaliação de sobrevida global pela técnica da maximização da estatística log-rank (Tabela 18).

Tabela 18 – Estimativa do ponto de corte ideal do número de células positivas para cada marcador avaliado para determinação da sobrevida global.

MARCADOR	Ponto de corte ótimo
CD4 (/mm ²)	2573
CD8 (/mm ²)	203
CD163 (/mm ²)	2338
CD20 (/mm ²)	471
CD68 (/mm ²)	4457
FOXP3 (/mm ²)	6
PTEN (/mm ²)	0
PDL-1 estroma (%)	5
PD-L1 tumor (%)	1
PD-1 (%)	5
pSTAT-1 (/mm ²)	367

Os pontos de corte ótimos para avaliação de sobrevida global foram determinados pelo método de maximização do log-rank

Para marcação de PD-L1 no estroma, o ponto de corte ótimo foi de 5%, sendo que 17 (22,4%) tumores apresentaram expressão de PD-L1 no estroma maior que 5% e 31 (40,8%), menor e igual a 5%. A mediana de sobrevida para os dois grupos foi de 95 e 92 meses, respectivamente ($p=0,122$) (Figura 14).

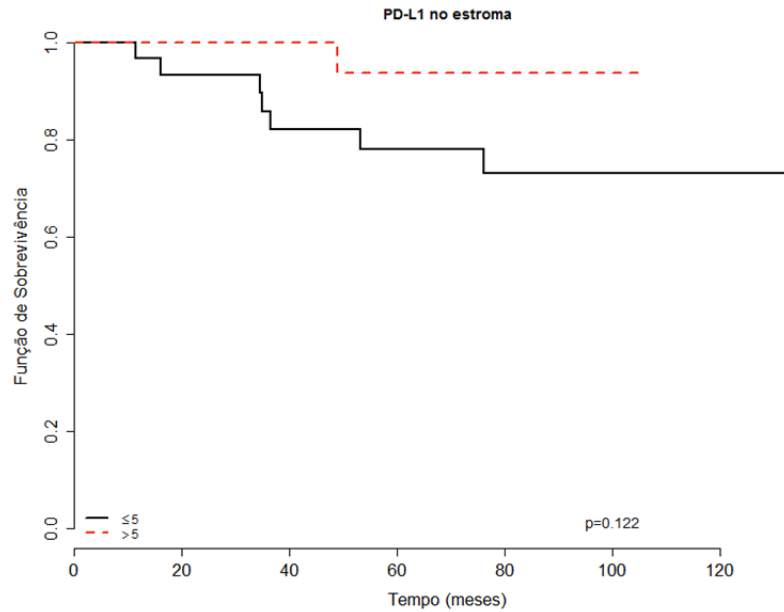


Figura 14 – Curvas de sobrevida global de acordo com marcação para PD-L1 no estroma ($>5\%$ ou $\leq 5\%$). As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Já o ponto de corte utilizado para a expressão de PD-L1 no tumor foi de 1%, sendo que 11 (14,5%) tumores apresentavam expressão de PD-L1 no tumor maior que 1% e 51 (67%), menor ou igual a 1%. As sobrevidas medianas observadas foram de 77 e 120 meses, respectivamente ($p=0,224$) (Figura 15).

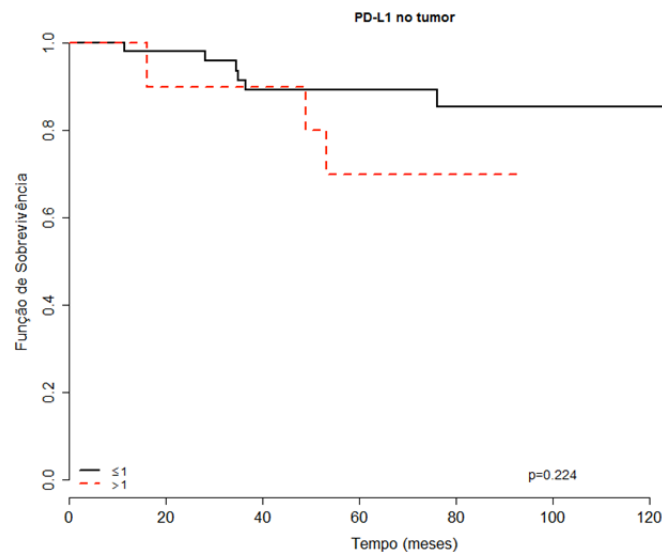


Figura 15 – Curvas de sobrevida global de acordo com marcação para PD-L1 no tumor ($>1\%$ ou $\leq 1\%$). As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

As únicas variáveis relacionadas a avaliação do infiltrado inflamatório que estiveram associadas com sobrevida global foram ausência de marcação de PTEN nas células tumorais (Figura 16) e número de células com marcação positiva para FOXP3 (Figura 17). O número células positivas para CD8, CD4, CD20, pSTAT-1, CD68, CD163 ou PD-1 não esteve associado com sobrevida global (Figuras 18 a 24).

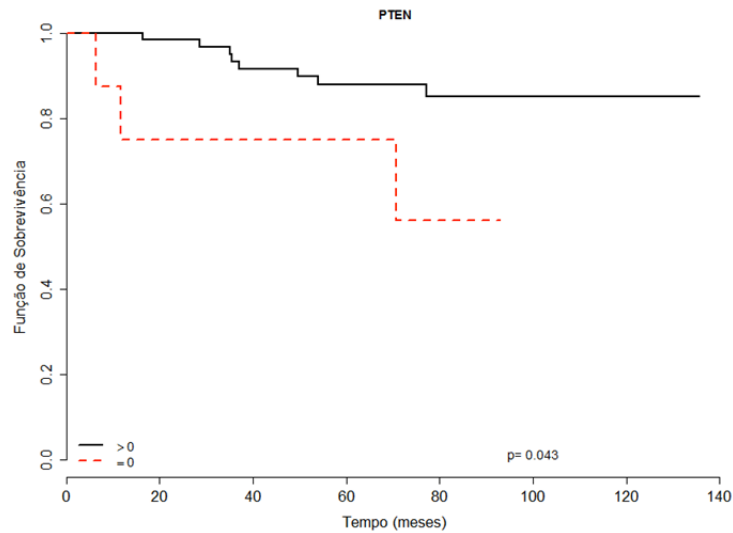


Figura 16 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células do tumor com ausência de marcação para PTEN. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

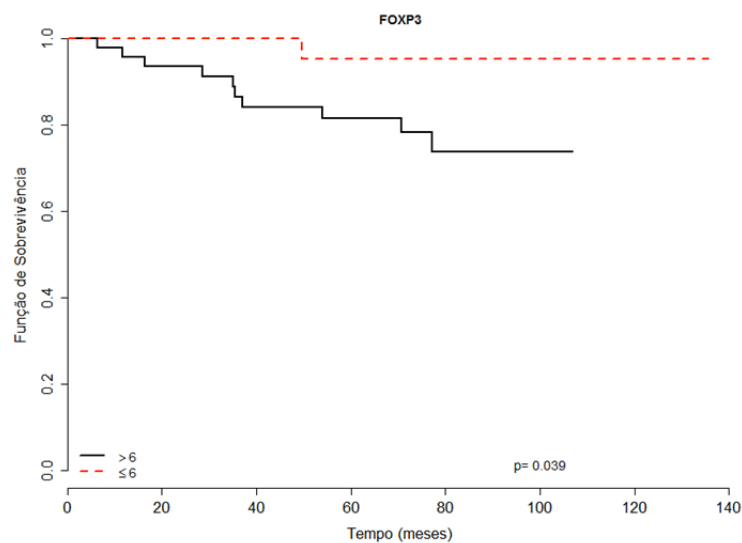


Figura 17 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células FOXP3 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

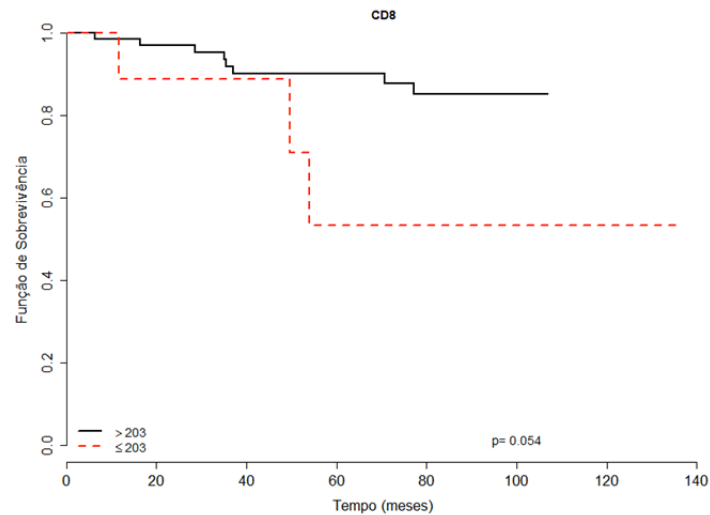


Figura 18 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD8 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

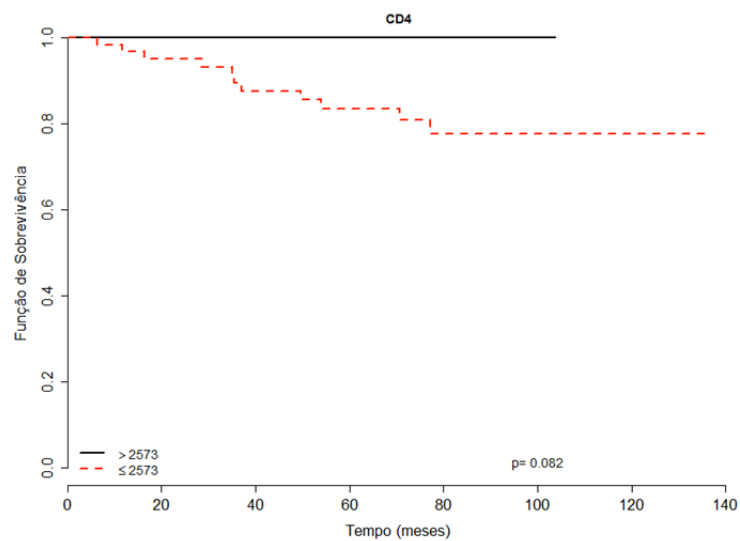


Figura 19 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD4 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

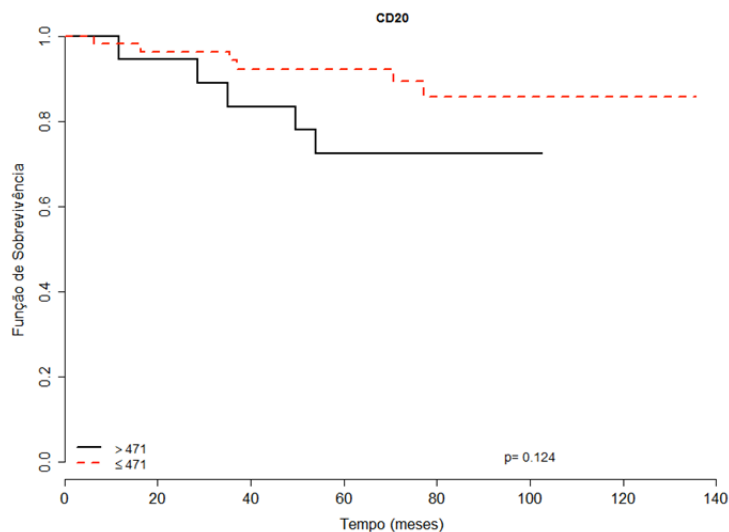


Figura 20 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD20 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

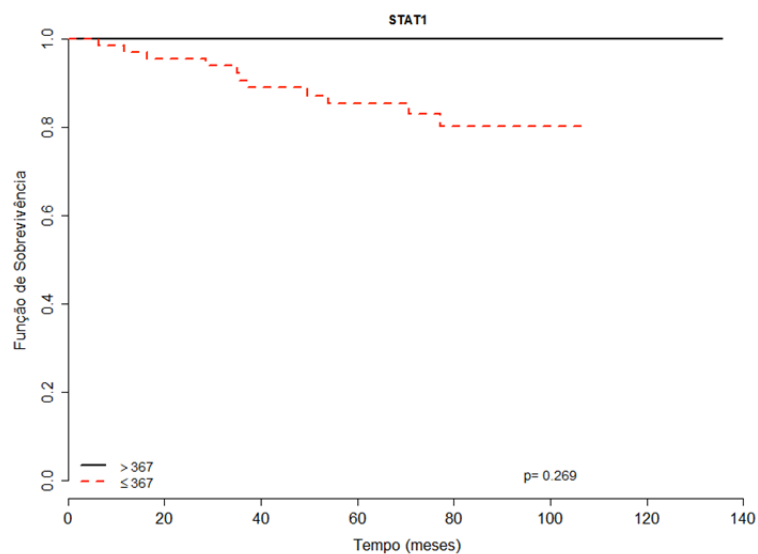


Figura 21 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células pSTAT1 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

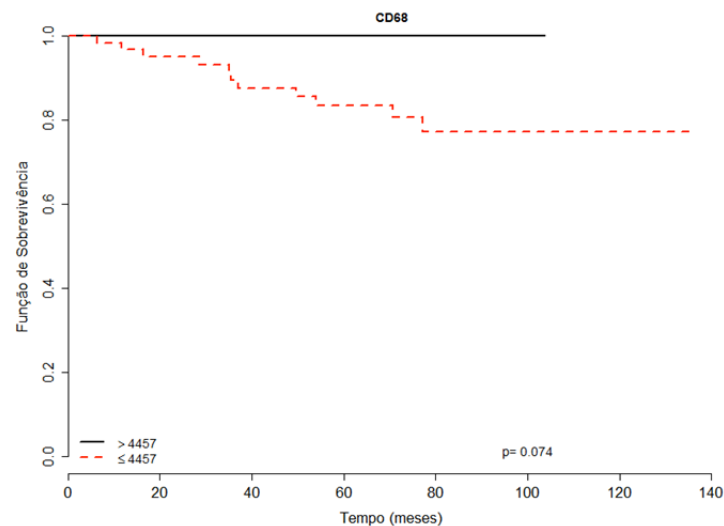


Figura 22 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD68 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

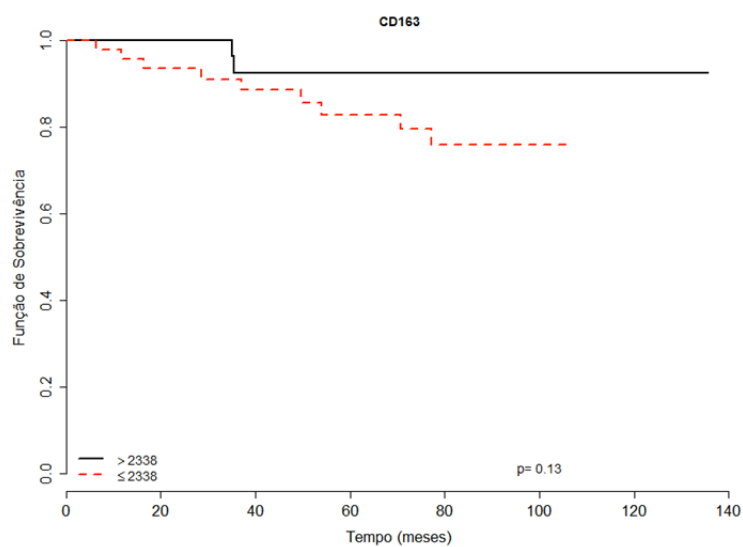


Figura 23 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células CD163 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

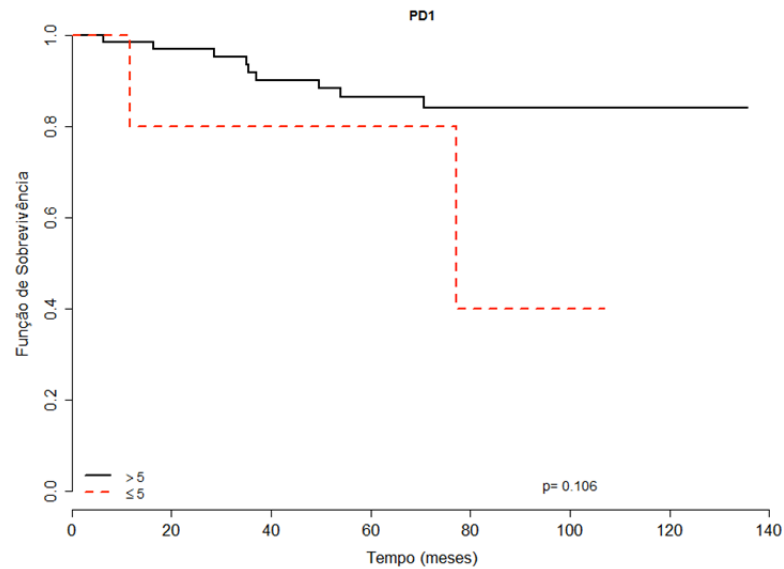


Figura 24 - Curva de sobrevida global de acordo com o número de células PD-1 positivas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Avaliamos também o impacto das razões CD8/FOXP3, CD4/FOXP3 e CD20/CD4 na SG (Figuras 25 a 27), e observamos que indivíduos com uma razão CD8/FOXP3 e CD4/FOXP3 acima do ponto de corte ótimo para estas variáveis apresentaram SG superior.

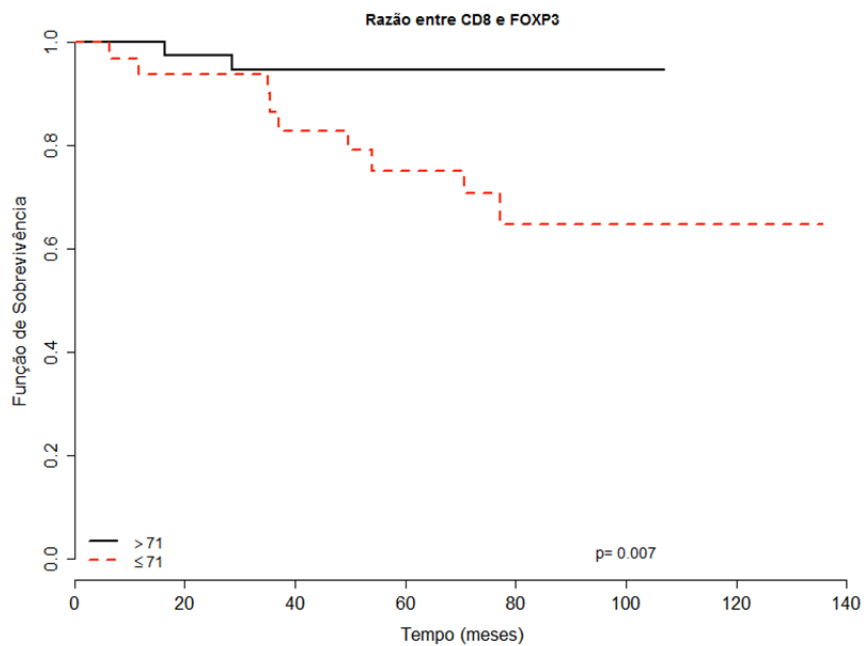


Figura 25 - Curva de sobrevida global de acordo com a razão entre o número de células CD8 e FOXP3 positivas. As pacientes foram categorizadas de acordo com o ponto de corte ótimo determinado pelo método de maximização do log-rank. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

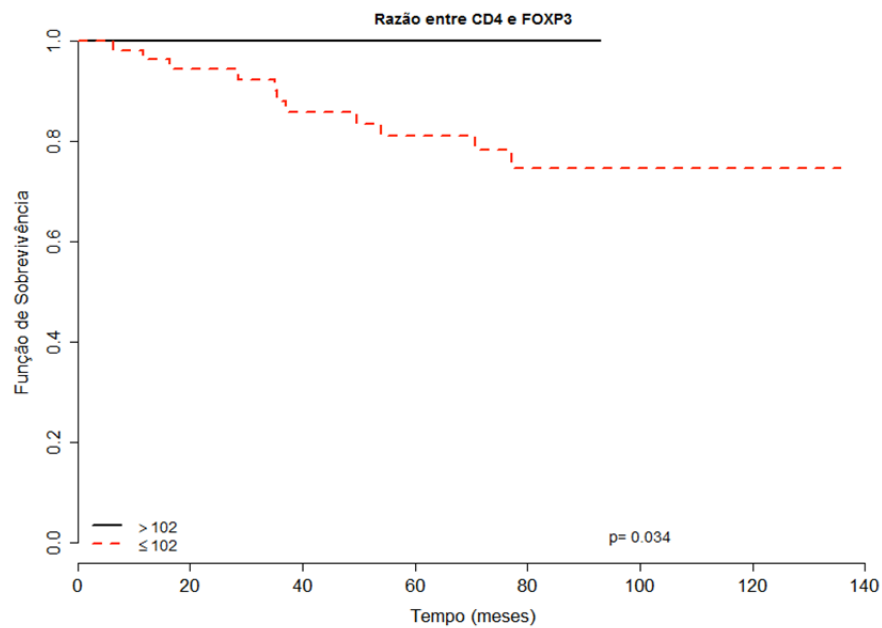


Figura 26 - Curva de sobrevida global de acordo com a razão entre o número de células CD4 e FOXP3 positivas. As pacientes foram categorizadas de acordo com o ponto de corte ótimo determinado pelo método de maximização do log-rank. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

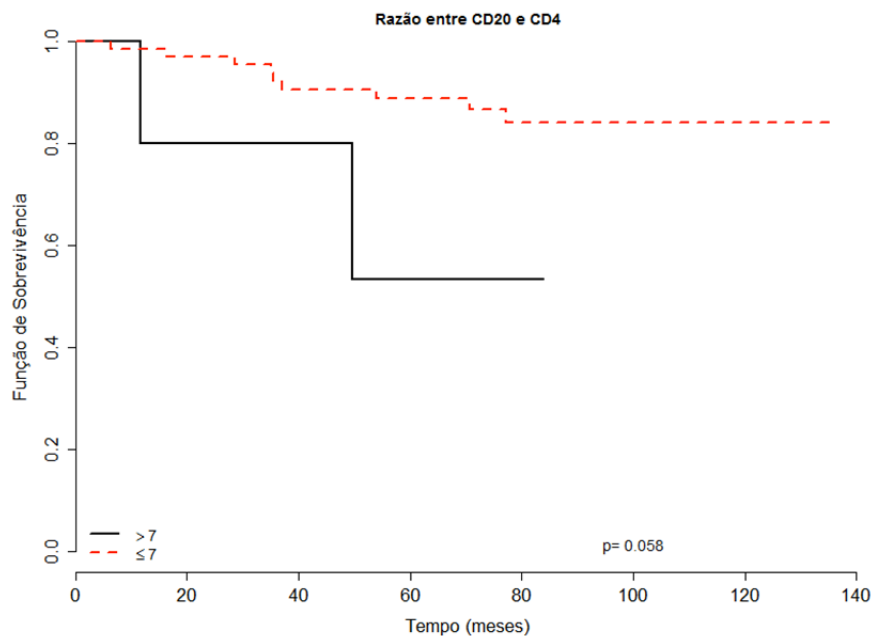


Figura 27 - Curva de sobrevida global de acordo com a razão entre o número de células CD8 e CD4 positivas. As pacientes foram categorizadas de acordo com o ponto de corte ótimo determinado pelo método de maximização do log-rank. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

6 DISCUSSÃO

Semelhantemente ao descrito na literatura (DENT et al. 2017), considerando pacientes com CMTN, nossa casuística foi composta de pacientes jovens, cujos tumores apresentavam alto grau histológico, necrose e inflamação.

As pacientes avaliadas neste estudo tiveram uma sobrevida mediana maior (122 meses) do que a descrita na literatura, que em geral gira em torno de 4,5 anos (50 meses) (DENKERT et al. 2016). Essa diferença talvez possa ser explicada, pelo fato das pacientes na nossa amostra terem sido diagnosticadas mais precocemente, sendo tratadas em um centro de referência especializado e de grande volume de câncer de mama (HILLNER et al. 2000). Além disso, as pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante contendo carboplatina apresentaram maior taxa de resposta patológica completa, o que pode ter se traduzido em um possível maior benefício em sobrevida global como demonstrado na meta-análise do trabalho de CORTAZAR et al. (2015). Previamente a este projeto, Cristina Anjos Sampaio, avaliou o infiltrado inflamatório das peças de biópsia de 98 pacientes com diagnóstico de CMTN que foram submetidas a tratamento neoadjuvante, sendo que 12 dessas pacientes receberam carboplatina neoadjuvante associada ao esquema de antraciclina e taxanos. Observou-se que a grande maioria, 8 de 12 pacientes (66,7%), que receberam carboplatina, obteve resposta patológica completa. Dos 98 paciente, 69 foram avaliados quanto ao TIL pelo HE e observou-se uma taxa de pRC de 33,3% para a população com TIL $\leq 10\%$ e de 44,4% para a população com TIL $> 10\%$ ($p=0,7$) (SAMPAIO et al. 2016).

Em nosso trabalho, avaliamos o impacto da intensidade do infiltrado inflamatório, avaliada como a percentagem de TILs no estroma tumoral, na sobrevida global especificamente de pacientes portadoras de CMTN. Na análise de todas as amostras com lâminas disponíveis para avaliação da intensidade do infiltrado (165 casos), a intensidade a média da percentagem de TILs no estroma foi de 26%, com 19% dos casos apresentando >50% de TILs no estroma (CMPL).

De acordo com a revisão sistemática de 15 trabalhos avaliando o infiltrado inflamatório em câncer de mama realizada por SASHA et al. (2016), a intensidade do infiltrado inflamatório foi maior no subtipo triplo-negativo, onde o valor médio descrito de TILs no estroma foi 20%. Outro estudo retrospectivo de 897 pacientes com CMTN encontrou uma porcentagem média de 20% de TILs, com 21,9% dos tumores sendo classificados como CMPL (PRUNERI et al. 2016).

A avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nos tumores da mama não é parte da rotina diagnóstica, apesar dos estudos publicados ressaltarem seu valor prognóstico e preditivo (RAVELLI et al. 2017).

A presença de um infiltrado linfomononuclear mais exuberante no estroma do tumor (avaliado pela percentagem de TILs no estroma) esteve associada a maior sobrevida global nesta população (SG mediana >5% TIL x \leq 5% TIL - 122 meses x 80 meses, $p=0,001$). Já na amostra de 76 pacientes cujas amostras foram incluídas no TMA não encontramos associação entre o aumento da percentagem de TILs e melhora da sobrevida, talvez em decorrência do menor número de pacientes avaliáveis associado a baixa taxa eventos do tipo óbito acumulada nesta coorte.

O primeiro estudo publicado demonstrando o papel dos TIL no prognóstico do câncer de mama foi publicado em 1992 (AALTOMAA et al. 1992). O valor

prognóstico dos TIL foi avaliado em 489 pacientes com câncer de mama, que foram acompanhados por mais de 10 anos, os valores de TIL estiveram associados com maior sobrevida livre de recorrência (SLR) em tumores com alta taxa de proliferação e alta contagem de células em mitoses.

Desde então, outros estudos vêm demonstrando uma clara relação entre TIL e prognóstico em câncer de mama. No estudo CLEOPATRA, foi realizada a análise dos linfócitos intra-tumorais estromais das pacientes com câncer de mama metastático HER2 positivo, e observou-se que o aumento de TILs esteve relacionado a melhor prognóstico independentemente do tratamento recebido por essas pacientes. Observaram que a cada aumento de 10% no número de TILs houve redução de cerca de 11% no risco de morte (HR 0,89; 95% CI:0,83-0,096; p=0,001) (LUEN et al. 2016). No cenário de câncer de mama inicial, foi observado por um grupo de estudo alemão que o aumento de TILs esteve claramente associado a aumento na taxa de resposta patológica completa (pRC) e melhora da sobrevida em pacientes com câncer de mama triplo-negativo e HER2 positivo. Os pesquisadores não conseguiram demonstrar os mesmos achados na coorte pacientes com tumores luminais, sugerindo que existem diferenças na função do infiltrado imunológico de acordo com o subgrupo molecular (WEST et al. 2011; DENKERT et al. 2016).

O estudo GeparSixto mostrou que os CMPL tiveram maior taxa de resposta patológica completa do que os demais. Esse estudo investigou a combinação de carboplatina à antraciclina e taxano, o aumento de TILs foi preditor de maior pRC (59,9% pRC em pacientes com CMPL *versus* 33,8% em pacientes sem CMPL p<0,0001). Notavelmente, os pacientes que foram randomizados para receber carboplatina e foram identificados como tendo o subtipo CMPL tiveram um aumento

de três vezes na probabilidade de obter pRC (pRC>75%). Este foi o primeiro estudo demonstrando uma interação entre a atividade de um quimioterápico e a resposta imune (DENKERT et al. 2015).

O aumento da SG de acordo com aumento da percentagem de TILs é amplamente descrito na literatura, identificando um subgrupo com melhor desfecho independente do tratamento realizado (DENKERT et al. 2010; MITTAL et al. 2014; GARCÍA et al. 2016). Há uma forte concordância entre os diferentes estudos que mostram que existe uma redução de 15 a 20% em recorrência de qualquer tipo e de mortalidade para cada incremento de 10% na percentagem de TILs, e que infiltrado inflamatório mononuclear mais denso tem maior correlação com melhora da sobrevida, porém numericamente os pontos de corte determinados são variáveis entre os diferentes estudos (DENKERT et al. 2010; LOI et al. 2013; MITTAL et al. 2014; ADAMS et al. 2014; PRUNERI et al. 2015; OGIYA et al. 2016; GARCÍA-TEIJIDO et al. 2016).

O infiltrado inflamatório observado nas nossas amostras mostrou-se enriquecido principalmente de macrófagos (principalmente com fenótipo M2), linfócitos CD8+, CD4+ e linfócitos B CD20+.

A não caracterização rotineira da composição do infiltrado no microambiente tumoral é decorrente da falta de estudos com replicabilidade na rotina dos laboratórios de patologia (SAVAS et al. 2017). Na literatura, encontram-se vários trabalhos utilizando diversas técnicas como HE, IHQ *single* e *multiplex*, imuno-fluorescência, citometria de fluxo e quantificação de RNAm, com resultados discordantes quanto a valor preditivo e prognóstico, dificultando assim uma comparação direta entre as metodologias e estabelecimento daquela com melhor

aplicabilidade prática, além disso os pontos de cortes usados na avaliação variam em praticamente todos os artigos (GWAK et al. 2015).

A infiltração do tumor por linfócitos está associada a melhor resposta à quimioterapia e ao trastuzumabe, e a infiltração por células expressando CD3, CD8 e CD20 foram todos discutidos como potenciais biomarcadores preditivos (DENKERT et al. 2010; ONO et al. 2012).

DENARDO et al. (2011) observaram que a infiltração por linfócitos T CD4 e CD8 e macrófagos CD68 se correlacionava com aspectos do sistema regulatório no câncer de mama. Para avaliar essa questão, analisaram a densidade de leucócitos CD4, CD8 e CD68 em amostras de tecido tumoral obtido no momento da cirurgia do tumor primário de 179 pacientes com câncer de mama virgens de tratamento. Observaram que a alta densidade de células T CD4 e baixa densidade de células T CD8 se correlacionaram com a redução da SG, enquanto a densidade celular de CD68 não. Além disso, a análise da infiltração de células CD68 e CD8 demonstrou uma associação inversa entre infiltração estromal por macrófagos CD68 e linfócitos T CD8 no câncer de mama (DENARDO et al. 2011).

GARCÍA-MARTINEZ et al. (2014) analisaram a infiltração tumoral de células imunes expressando CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 por imunohistoquímica pré- e pós-tratamento em uma série de 121 casos de câncer de mama invasivo, previamente tratados com quimioterapia neoadjuvante. O perfil de células imunes foi analisado e correlacionado com resposta e sobrevida. Os autores identificaram três perfis de infiltração tumoral por células imunes que foram capazes de prever resposta patológica completa (pRC) à quimioterapia neoadjuvante (*cluster* B: 58%, versus *cluster* A e C: 7%). Eles identificaram que a forte infiltração

por linfócitos CD4 foi o principal fator associado com pRC, e essa associação foi validada em seis conjunto de dados genômicos publicados. O maior efeito da quimioterapia na infiltração linfocitária incluiu uma inversão da relação CD4/CD8, e isto esteve associada a pRC e melhor prognóstico. A análise do infiltrado imunológico no tumor residual pós-quimioterapia identificou um perfil (cluster Y), caracterizado principalmente por infiltração alta de CD3 e CD68, com pior sobrevida livre de doença. Os autores concluíram que os perfis de subpopulações de TILs no câncer de mama podem identificar grupos de pacientes caracterizados por alta resposta (no cenário pré-tratamento) e mau prognóstico (no cenário pós-tratamento) (GARCÍA-MARTÍNEZ et al. 2014). Entretanto, os autores não avaliaram o papel destes marcadores especificamente no CMTN.

No nosso estudo, as únicas variáveis relacionadas à composição do infiltrado inflamatório que mostraram associação com características clínico-patológicas foram o número de células PD-L1+ no estroma com a percentagem de TILs no estroma ($p=0,018$), o número de células PD-L1+ no tumor com o N ($p=0,046$) e com a percentagem de TILs no estroma ($p=0,049$), e o número de células PD-1+ com o tipo histológico ($p=0,022$).

ZHANG et al. (2017) realizaram uma meta-análise de 5 estudos, incluindo um total de 2.546 pacientes com câncer de mama, e observaram que a expressão de PD-L1 esteve associada a características clínico-patológicas mais agressivas como acometimento linfonodal, grau histológico alto, ausência de expressão de receptor de estrogênio e subtipo TN. KITANO et al. (2017) também demonstraram que alto grau histológico se correlaciona com o aumento da expressão de PD-L1 no tumor. Ou

seja, a presença de células expressando PD-L1 parece estar associada com tumores de características mais agressivas.

Em nosso trabalho, a média de expressão de PD-L1 foi de 12% no estroma e de 4% no tumor. Esses valores encontram-se um pouco abaixo dos descritos na literatura. Por exemplo, MITTENDORF et al. (2014) observaram expressão de PD-L1 em torno de 19% dos casos de CMTN.

Encontramos ainda uma correlação positiva e estatisticamente significativa da intensidade do infiltrado inflamatório com marcação para PD-L1 no estroma ($p=0,02$) e de PD-L1 no tumor ($p=0,027$), corroborando dados da literatura que sugerem que quanto maior o infiltrado inflamatório tumoral maior os níveis de expressão do PD-L1 (AIERKEN et al. 2017). Semelhantemente, MUENST et al. (2014) observaram o PD-L1 expresso em aproximadamente 20% a 30% dos CMTN, além de verificarem uma associação com a percentagem de linfócitos infiltrantes tumorais e correlação com maior grau histológico.

Nessa coorte, a expressão de PD-L1, tanto no estroma quanto no tumor, não esteve associada a SG. MUENST et al. (2014) foram os primeiros a demonstrar que a expressão de PD-L1 é um fator prognóstico negativo para SG, independente do subtipo histológico do tumor (MUENST et al. 2014). Outros estudos mais recentes têm, contudo, identificado a expressão de PD-L1 com ambos significados prognósticos (BECKERS et al. 2016; ZHANG et al. 2017).

Encontramos uma associação entre a média do número de células PD-1 positivas e o tipo histológico ductal, entretanto não observamos associação com a sobrevida, diferentemente de MUENST et al. (2013) que avaliaram a expressão de PD-1 nos linfócitos do infiltrado inflamatório de 660 casos de câncer de mama,

empregando TMA. A presença de TILs expressando PD-1 esteve associada à pior sobrevida global (HR = 2,736; p=0001), notadamente nos subtipos luminal B (HER2+ e HER2-) e *basal-like*.

Apesar de termos observado um número elevado de células CD8+ e CD4+ no estroma de tumores de mama TN, estas células estiveram diretamente correlacionadas com o aumento do número de células CD68+ e CD163+, bem como de células FOXP3+. Além disso, a marcação para CD8+ também se correlacionou com maior número de células PD-L1+ no estroma. Esses dados em conjunto sugerem, que apesar dos tumores de mama TN conseguirem atrair de forma eficaz linfócitos T em algum momento de progressão, estes provavelmente têm sua atividade efetora suprimida pelo recrutamento de células imunossupressoras (macrófagos M2 e linfócitos regulatórios) e pela aquisição de um fenótipo exaurido (expressão de PD-L1) (Figura 28). Neste sentido, seria bastante interessante a avaliação do perfil de citocinas intratumoral e a avaliação mais detalhada do imunofenótipo das células que compõem o infiltrado inflamatório destes tumores a partir de amostras frescas por citometria de fluxo ou de massa.

Os únicos marcadores que estiveram associados com pior sobrevida global foram PTEN (ausência de marcação) nas células tumorais e número de células FOXP3+ (Figura 28). Como os pontos de corte ótimos para avaliação de SG destas variáveis não estiveram associados com nenhuma variável clínica, acreditamos que estes podem ser marcadores independentes de SG, entretanto, em vista do pequeno tamanho da amostra, não conseguimos realizar análise multivariada para comprovar esta ideia.

Os linfócitos FOXP3+ estão associados com promoção de imunossupressão e possuem a função de promover auto-tolerância, o que pode contribuir para um microambiente que favorece o escape da resposta imune, facilitando o crescimento tumoral e piorando a sobrevida (BATES et al. 2006). SASHA et al. (2016) verificaram que a presença de células FOXP3+ no tumor esteve associada com pior prognóstico. Em uma avaliação de mais de 200 pacientes com diagnóstico de câncer de mama, um número maior que 15 células FOXP3+ esteve associado com redução de SLR (HR 1,58; IC95% 1,01-2,47; p= 0,04) e SG (HR 1,62; 95%CI 0,96-2,74; p=0,07) (SASHA et al. 2016).

Encontramos que a ausência de marcação para PTEN nas células tumorais reflete uma pior sobrevida no CMTN (p=0,043). Da mesma forma, LI et al. (2017), numa meta-análise de cinco estudos, demonstraram que a perda de expressão de PTEN está correlacionado a um pior desfecho clínico e sobrevida em câncer de mama (LI et al. 2017).

As mutações ou deleções de *PTEN* no câncer de mama são bem descritas na literatura. O PTEN desfosforila o PIP3, um produto da via PI3K, inativando desse modo a via de sinalização de AKT, inibindo o crescimento celular e promovendo a apoptose (CARNERO et al. 2008). Mais recentemente, foi postulado que o PTEN tem um papel importante no reparo do DNA porque a mutação ou perda de PTEN resulta em uma deficiência para reparar quebras das duplas fitas do DNA (SHEN et al. 2007). O PTEN é reconhecido como o gene supressor de tumor frequentemente perdido no cromossomo humano 10q23, um locus altamente suscetível a mutações em tumores primários da mama (LI et al.1997), podendo ocorrer em 30-50% dos casos de câncer de mama esporádicos, sendo um evento comum principalmente no

câncer de mama com mutação do gene *BRCA1* (SAAL et al. 2008). A perda de PTEN correlaciona-se, especificamente, com o desenvolvimento de câncer de mama receptor hormonal negativo, além de induzir a expressão de PD-L1, suprimindo a proliferação e a sobrevivência de linfócitos T (MUENST et al. 2013).

DEAN et al. (2014) observaram que a perda de PTEN ocorreu em cerca de 48,3% das pacientes com câncer de mama e foi significativamente associado com idade mais jovem no momento do diagnóstico (47 anos em comparação com 57 anos naqueles sem perda de PTEN; $p = 0,005$). Preditores independentes de perda de PTEN foram estágio tardio na apresentação ($p=0,026$), positividade para citoqueratina 5/6 ($P = 0,028$) e expressão de IGFBP2 ($p = 0,042$) (DEAN et al. 2014).

Observamos, em nossa amostra, uma melhor sobrevida associada a maior contagem de células CD8+ ($p=0,054$) e CD4+ ($p=0,082$), porém sem significância estatística em ambas as situações. Na tese de mestrado de BOTELHO et al. (2017), onde se avaliou uma coorte de pacientes desta mesma instituição, também se observou melhor sobrevida associada com aumento do número de células CD8+. De acordo com SASHA et al. (2016), o número de células T CD8+ tem-se mostrado um preditor de melhores resultados clínicos. Alta infiltração intratumoral por células T CD8+ esteve associada a maior sobrevida câncer-específica (HR 0,55; 95%CI, 0,39-0,78; $p=0,001$) em um estudo envolvendo cerca de 1.334 pacientes (SASHA et al. 2016).

No entanto, ao analisarmos a associação da SG com a razão entre o número de células de CD8+ e FOXP3+ ($p=0,007$) e de células CD4+ e FOXP3+ ($p=0,034$) e CD4 ($p=0,058$) verificamos que uma maior proporção relativa de linfócitos CD8+ ou

CD4+ em relação a a linfócitos FOXP3+ esteve associada com aumento de SG. Em conjunto, esses dados sugerem que a infiltração por linfócitos T no microambiente tumoral deve apresentar atividade antitumoral e promover controle do crescimento e progressão tumoral, desde que não oposto por eventos que favorecem imunossupressão (infiltração por linfócitos regulatórios) (Figura 28).

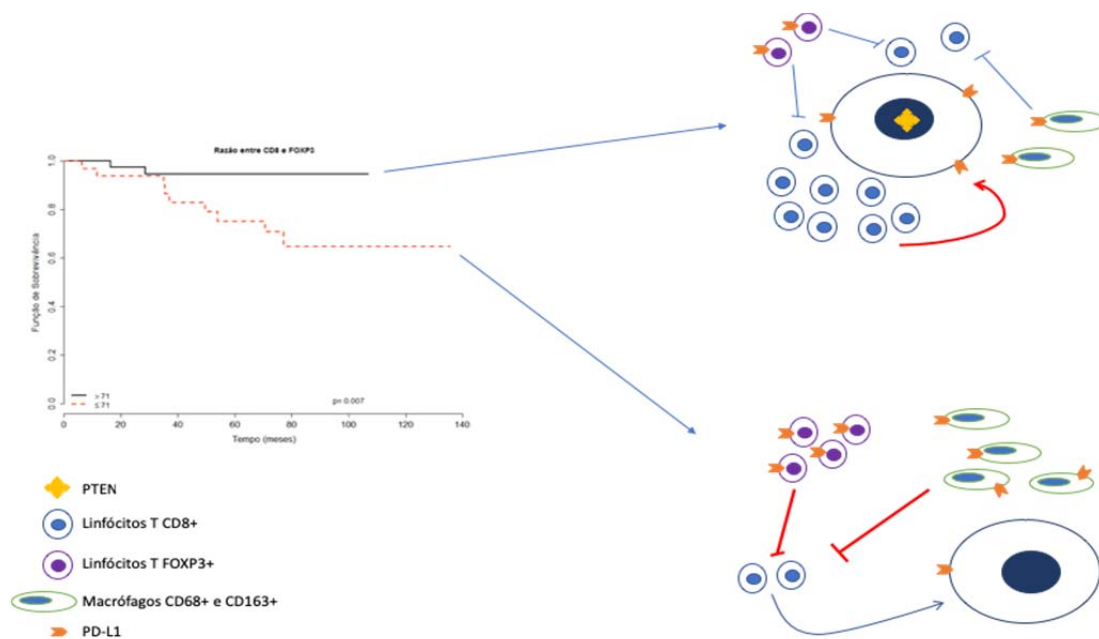


Figura 28 – O microambiente imune no CMTN está associado com sobrevida global. Um infiltrado mononuclear mais exuberante está associado com aumento de sobrevida global, bem como com maior expressão de PD-L1 tanto no estroma quanto nas células tumorais. Como esta característica (expressão de PD-L1) também esteve associada com infiltração por células expressando CD8, acreditamos que estes tumores (grupo superior na figura) representam um subgrupo mais imunogênico que recruta de forma ativa o sistema imune adaptativo, mas ao mesmo tempo, como um mecanismo de resistência adaptativa, desencadeia a expressão de PD-L1 (exaustão). A atividade anti-tumoral eficaz depende da proporção entre células expressando CD8 (linfócitos T citotóxicos) e FOXP3 (linfócitos regulatórios). Além disso, a perda da expressão de PTEN também esteve associada a pior sobrevida e à infiltração por macrófagos (células expressando CD68 e CD163) e linfócitos regulatórios. As setas mais cheias e em vermelho representam o provável efeito final sobre o tumor. As setas barradas indicam efeito inibitório. As setas com ponta indicam atividade anti-tumoral.

ADAMS et al. (2014) analisaram a composição do infiltrado imune de amostras de CMTN e o impacto deste no prognóstico. Os autores observaram que número aumentado de células expressando PD-L1, CD163 e FOXP3 estiveram associados a uma diminuição significativa de sobrevida global, em contraste, número elevado de TILs foram associados a aumento de sobrevida (ADAMS et al. 2014).

USHI et al. (2017) avaliaram o papel dos TILs e da expressão de PD-1, PD-L1, CD3, PTEN, CD8 e CD163 no prognóstico do carcinoma mamário, em 97 pacientes operadas. A expressão de CD3, CD8, CD163 e a perda de expressão de PTEN foram significativamente mais altas no CMTN. A razão entre o número de células PD-L1+/CD8+ foi um fator associado com SLP e SG. Pacientes portadoras de tumores HER2+ com expressão de PTEN ou tumores luminais/HER2- sem expressão de PD-L1 apresentaram sobrevida longa, quando comparada aos pacientes com tumores com perda de PTEN e com expressão de PD-L1. Entretanto, pacientes com tumores com razão PDL1+/CD8+ alta tiveram pior SLP e SG (USHI et al. 2017).

Embora tenhamos observado também um número aumentado de linfócitos B (CD20+) no estroma tumoral de CMTN, estas células não estiveram associadas com nenhuma característica clínico-patológica, nem correlacionadas com outros componentes avaliados no infiltrado inflamatório ou com sobrevida, mesmo quando consideramos a proporção em relação a células CD4+ (importantes reguladores da função de linfócitos B). Até hoje, a maior parte das pesquisas que avaliam o papel de linfócitos na determinação da sobrevida de câncer de mama têm se limitado às respostas dependentes de células T, raramente mencionam células B ou células plasmáticas (FRIDMAN et al. 2011). No entanto existem provas consideráveis do

papel destas células em tumores, especialmente no câncer de 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. (2012) e YUEN et al. (2016) relataram dados convincentes que validam a assinatura de células B como o fator prognóstico mais robusto no câncer de mama e em outros tumores. Como demonstrado por Yuen e colaboradores as células B são responsáveis por até 25% de todas as células em alguns tumores. Além disso, cerca de 40% dos TILs em câncer de mama são células B, sugerindo que essas células podem ter um papel crítico na modulação das respostas tumorais. Além disso, o bloqueio dos imunológicos checkpoints, também podem ter como alvo os linfócitos B ativados, que podem ativar os linfócitos T, uma vez que as moléculas PD-1, PD-L1, CTLA-4 e B7, são expressas também pelos linfócitos B. Além disso, CTLA-4 e PD-1 inibem a atividade das células B, e o bloqueio de qualquer uma das moléculas aumenta a proliferação de células B de memória e a produção de anticorpos, atuando direta ou indiretamente nas células B, YUEN et al. (2016).

Dados na literatura, apesar de controversos, também sugerem que quanto maior a frequência de células pSTAT-1 positivas melhor a sobrevida em câncer de mama (WIDSCHWENDTER et al. 2002; GUJAM et al. 2016), contudo não observamos tal associação em nossa casuística. No entanto, a avaliação de p-STAT-1 pode ter sido prejudicada por se tratar de uma fosfo-proteína cuja estabilidade normalmente é perdida em amostras fixadas em formalina e emblocadas em parafina (BURNS et al. 2009).

Os nossos dados sugerem que a intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear é um fator prognóstico independente de melhor sobrevida em CMTN.

Além disso, a presença de infiltrado inflamatório exuberante nestes tumores está associado com marcação para PD-L1 tanto no próprio tumor quanto no estroma tumoral, bem como se observa um enriquecimento para linfócitos T (CD8+ e CD4+), o que pode tornar estes tumores alvos importantes para o tratamento com inibidores de PD-1 ou PD-L1. Além disso, macrófagos e linfócitos T regulatórios representam provavelmente mecanismos contra-regulatórios importantes que o tumor recruta no intuito de permitir um escape da resposta imune adaptativa. Seria interessante, avaliar qual o papel de estratégias que depletam estas células no microambiente tumoral teriam sobre o comportamento do mesmo.

O nosso estudo apresenta viéses relacionados ao tamanho da amostra analisada e ao caráter retrospectivo da coleta de dados, além disso o uso de material parafinado e análise imuno-histoquímica limitar a caracterização imunofenotípica das populações celulares estudadas. Apesar disso, acreditamos que oferece dados importantes que podem vir a possibilitar o emprego de informações sobre as características do infiltrado inflamatório estromal como biomarcador prognóstico, e eventual seleção de pacientes para tratamentos baseados em modulação da resposta imune antitumoral no CMTN.

7 CONCLUSÕES

Infiltrado inflamatório mais intenso (avaliado pelo número de TILs estromais) é um fator independente associado com aumento de sobrevida global.

CMTN tem o estroma enriquecido em linfócitos T (CD4+ e CD8+) e macrófagos de fenótipo M2.

Maior número de TILs no estroma de CMTN correlaciona-se com maior número de células expressando PD-L1 quer seja no tumor ou no estroma. Entretanto, a expressão de PD-L1 ou PD-1 não tem impacto em SG.

Existe correlação entre número de linfócitos CD4+, CD8+ e FOXP3+, macrófagos CD68+ e CD163+, número de células PD-L1+ tanto no estroma quanto no tumor e perda de expressão de PTEN na célula tumoral.

Alto número de células FOXP3+ no estroma ou de células com ausência de marcação para PTEN no tumor está associado com pior SG. Além disso, a SG é influenciada pela abundância relativa de células CD8+ ou CD4+ no estroma em relação às células FOXP3+.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams A, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A. Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A [abstract]. **J Clin Oncol** 2017; 35(15 suppl):1008. [Presented at 2017 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, 2017 June 2-6; Chicago(IL). USA]

Aerts JG, Hegmans JP. Tumor-specific cytotoxic t cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. **Cancer Res** 2013; 73:2381-8.

AiErken N, Shi HJ, Zhou Y, Shao N, et al. High PD-L1 Expression is closely associated with tumor-infiltrating lymphocytes and leads to good clinical outcomes in chinese triple negative breast cancer patients. **Int J Biol Sci** 2017; 13:1172-9.

Aleskandarany MA, Agarwal D, Negm OH, Ball G The prognostic significance of STAT3 in invasive breast cancer: analysis of protein and mRNA expressions in large cohorts. **Breast Cancer Res Treat** 2016; 156:9-20.

Amara D, Wolf DM, van't Veer L, Esserman L, Campbell M, Yau C. Co-expression modules identified from published immune signatures reveal five distinct immune subtypes in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2016; 161:41-50.

Amarnath S, Mangus CW, Wang JC, et al. The PDL1-PD1 axis converts human th1 cells into regulatory T cells. **Sci Transl Med** 2011; 3:1-26.

Avalle L, Pensa S, Regis G, Novelli F, Poli V. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: a matter of balance. **JAKSTAT** 2012; 1:65-72.

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.

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.

Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, et al. PDL1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. **Histopathology** 2016; 69:25-34.

Bense RD, Sotiriou C, Piccart-Gebhart MJ, et al. Relevance of tumor-infiltrating immune cell composition and functionality for disease outcome in breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2017; 109:djw192.

Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: Implications for tumor immunotherapy. **Cancer Immunol Immunother** 2005; 54:307-14.

Bodhankar S, Chen Y, Lapato A, Vandenbark AA, Murphy SJ, Offner H. Targeting immune co-stimulatory effects of PD-L1 and PD-L2 might represent an effective therapeutic strategy in stroke. **Front Cell Neurosci** 2014; 8:228.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2015; 373:1627-39.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:2455-65.

Burns JA, Li Y, Cheney CA, et al. Choice of fixative is crucial to successful immunohistochemical detection of phosphoproteins in paraffin-embedded tumor tissues. **J Histochem Cytochem** 2009; 57:257-64.

Buisseret L, Desmedt C, Garaud S, et al. Reliability of tumor-infiltrating lymphocyte and tertiary lymphoid structure assessment in human breast cancer. **Mod Pathol** 2017; 30:1204-12.

Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L1 interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation. **Immunity** 2007; 27:111-22.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2329-34.

Carey LA. Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. **Oncologist** 2010; 15 Suppl 5:49-56.

Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. **Curr Cancer Drug Targets** 2008; 8:87-98.

Chapman RS, Lourenco P, Tonner E, et al. The role of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of Stat3. **Adv Exp Med Biol** 2000; 480:129-38.

Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: Next-generation immunotherapy-inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. **Clin Cancer Res** 2012; 18:6580-7.

Chen S, Wang RX, Liu Y, Yang WT, Shao ZM. PD-L1 expression of the residual tumor serves as a prognostic marker in local advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. **Int J Cancer** 2017; 140:1384-95.

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Ann Oncol** 2015; 26:1533-46.

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

Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet** 2014; 384:164-72.

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

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature** 2006; 443:350-54.

Dean SJ, Perks CM, Holly JM, et al. Loss of PTEN expression is associated with IGFBP2 expression, younger age, and late stage in triple-negative breast cancer. **Am J Clin Pathol** 2014; 141:323-33.

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, von Minckwitz G, Brase JC, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. **J Clin Oncol** 2015; 33:983-9.

Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, et al. Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as predictive and prognostic biomarker in different subtypes of breast cancer treated with neoadjuvant therapy: a meta-analysis of 3771 patients. **Cancer Res** 2016; 77(4 suppl): S1-09. [Presented at 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 6-10, 2016; San Antonio, Texas]

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res** 2017; 13:4429-34.

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

Ehinger A, Per Malmström, Pär-Ola Bendahl, et al. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013. **Acta Oncol** 2017; 56:68-74.

Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. **Immunol Rev** 2008; 224:166-82.

Fridman WH, Galon J, Pages F, et al. Prognostic and predictive impact of intra-and peritumoral immune infiltrates. **Cancer Res** 2011; 71:5601-5

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. **J Exp Med** 2009; 206:3015-29.

García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2014; 16:488.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. **N Engl J Med** 2015; 372:2018-28.

Gibson J. Anti-PD-L1 for metastatic triple-negative breast cancer. **Lancet Oncol** 2015; 16:e264.

Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer **Clin Cancer Res** 2012; 17:1082-9

Gujam FJA, McMillan DC, Edwards J, et al. The relationship between total and phosphorylated STAT1 and STAT3 tumour cell expression, components of tumour microenvironment and survival in patients with invasive ductal breast cancer. **Oncotarget** 2016; 7:77607-21.

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; 10:e0125728.

Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. 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; 2:646-74.

Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. **Breast Care (Basel)** 2013; 8:102-9.

Hillner BE, Smith TJ, Desch CE. Hospital and physician volume or specialization and outcomes in cancer treatment: importance in quality of cancer care. **J Clin Oncol** 2000; 18:2327-40.

Honda T, Egen JG, Lämmermann T, Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Germain RN. Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues. **Immunity** 2014; 40:235-47.

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO J** 1992; 11:3887-95.

Jung K, Choi I. Emerging co-signaling networks in T cell immune regulation. **Immune Netw** 2013; 13:184-93.

Kitano A, Ono M, Yoshida M, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes are correlated with higher expression levels of PD-1 and PD-L1 in early breast cancer. **ESMO Open** 2017; 2:e000150.

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

Kuznar W. Assessing TILs as prognostic markers in breast cancer: evidence growing of link between tumor-infiltrating lymphocytes and clinical outcomes in multiple breast cancer settings. **ASCO Reading Room** 2017. Available from: <URL:<https://www.medpagetoday.com/reading-room/asco/breast-cancer/66291>> [2018 jan 12]

Lausen B, Schumacher M. Maximally Selected Rank Statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.

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

Li J, Yen C, Lia D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science** 1997; 275:1943-7.

Li S, Shen Y, Wang M, et al. Loss of PTEN expression in breast cancer: association with clinicopathological characteristics and prognosis. **Oncotarget** 2017; 8:32043-54.

Liu Z, Ren L, Liu C, Xia T, Zha X, Wang S. Phenformin induces cell cycle change, apoptosis, and mesenchymal-epithelial transition and regulates the AMPK/mTOR/p70s6k and MAPK/ERK pathways in breast cancer cells. **PLoS One** 2015; 10:e0131207.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol** 2006; 19:264-71.

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.

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

Luen S SR, Stephen F, Peter S, Jennifer E-W, Emma C, Astrid K, Sandra SM, Jose B, Stefan M, Sherene L. Prognostic associations of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in metastatic HER2-positive breast cancer (BC) treated with trastuzumab and pertuzumab: A secondary analysis of the CLEOPATRA study. **Cancer Res** 2017; 77(4 suppl):S1-08. [Presented at 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 6-10, 2017; San Antonio, TX].

Loi S, Giobbie-Hurder A, Gombos A, et al. Phase Ib/II study evaluating safety and efficacy of pembrolizumab and trastuzumab in patients with trastuzumab-resistant HER2-positive advanced breast cancer: results from the PANACEA study (IBCSG 45-13/BIG 4-13/KEYNOTE-014). **Cancer Res** 2017; 76(4 suppl):OT3-01-05. [Presented at 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 5-9, 2017; San Antonio, TX].

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.

Matsuzaki J, Gnjatic S, Mhawech-Fauceglia P, et al. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010; 107:7875-80.

Millikan RC, Newman B, Tse CK, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2008; 109:123-39.

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

Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. **Curr Opin Immunol** 2014; 27:16-25.

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. **Cancer Immunol Res** 2014; 2:361-70.

Mittendorf EA, Hunt KK. Breast cancer immunotherapy: Is it ready for prime time? **Am J Hematol Oncol** 2015; 11:6-9.

Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 148:525-34.

Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. **Med Oncol** 2011; 28:682-8.

Muenst S, Schaerli AR, Gao F, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2014; 146:15-24.

Muenst S, Soysal SD, Gao F, et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 139:667-76.

Mulligan AM, Pinnaduwa D, Tchatchou S, et al. Validation of intratumoral T-bet + lymphoid cells as predictors of disease-free survival in breast cancer. **Cancer Immunol Res** 2016; 4:41-8.

Nanda R, Chow LQ, Dees EC, et al. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: phase Ib KEYNOTE-012 study. **J Clin Oncol** 2016; 34:2460-7.

Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. **Immunity** 1999; 11:141151.

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.

Ogiya R, Niikura N, Kumaki N, et al. Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. **Cancer Sci** 2016; 107:1730-5.

Ono M, Tsuda H, Shimizu C, Yamamoto S, Shibata T, Yamamoto H, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 132:793-805.

Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene** 2010; 29:1093-102.

Pal SK, Childs BH, Pegram M. Triple negative breast cancer: unmet medical needs. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 125:627-36.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:252-64.

Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. **Breast J** 2009; 15:593-602.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. **Mol Cell Biol** 2005; 25:9543-53

Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, et al. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. **Cell** 1992; 70:93-104.

Paterson AM, Brown KE, Keir ME, et al. The PD-L1: B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells *in vivo*. **J Immunol** 2011; 187:1097-105.

Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. **Immunol Rev** 2009; 229:67-87.

Phipps AI, Buist DSM, Malone KE, et al. Family history of breast cancer in first-degree relatives and triple-negative breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 126:671-8.

Pierobon M, Frankenfeld CL. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 137:307-14.

Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2010; 12:R68.

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol** 2011; 5:5-23.

Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. **Oncologist** 2013; 18:123-33.

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

Rakha E, Reis-Filho JS. Basal-like breast carcinoma: from expression profiling to routine practice. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:860-8.

Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR. Complex Roles of Stat1 in regulation gene expression. **Oncogene** 2000; 19: 2619-27.

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

Regis G, Pensa S, Boselli D, Novelli F, Poli V. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. **Semin Cell Dev Biol** 2008; 19:351-9.

Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. **N Engl J Med** 2015; 372:320-30.

Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, et al. Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair. **Nat Genet** 2008; 40:102-7.

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

Sampaio C, Lima V et al . Valor prognóstico do Infiltrado Inflamatório Tumoral em pacientes com Câncer de Mama Triplo-Negativo submetidas a Tratamento Neoadjuvante. Abstrat. SABC 2016;

Sasha E, Stanton SE, Adams S, Disis ML. Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review. **JAMA Oncol** 2016; 2:1354-60.

Sato T, Neilson LM, Peck AR, et al. Signal transducer and activator of transcription-3 and breast cancer prognosis. **Am J Cancer Res** 2011; 1:347-55.

Savas P, Teo ZL, Lefevre C, Correction: the subclonal architecture of metastatic breast cancer: results from a prospective community-based rapid autopsy program "CASCADE". **PLoS Med** 2017; 14:e1002302.

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

Shuting Li, Yanwei Shen, Mengying Wang, et al. Loss of PTEN expression in breast cancer: association with clinicopathological characteristics and prognosis. **Oncotarget** 2017; 8:32043-54.

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

Serrels A, Lund T, Serrels B, et al. Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity. **Cell** 2015; 163:160-73.

Shen WH, Balajee AS, Wang J, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. **Cell** 2007; 128:157-70.

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

Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2- Positive Breast Cancer **N Engl J Med** 2011; 365:1273-83.

Śledzińska A, Menger L, Bergerhoff K, Peggs KS, Quezada SA. Negative immune checkpoints on T lymphocytes and their relevance to cancer immunotherapy. **Mol Oncol** 2015; 9:1936-65.

Soliman H, Khalil F, Antonia S. PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. **PLoS One** 2014; 9:e88557.

Sonnenblick A, Brohée S, Fumagalli D, Vincent D. Constitutive phosphorylated STAT3-associated gene signature is predictive for trastuzumab resistance in primary HER2-positive breast cancer. **BMC Med** 2015; 13:177.

Staa J, Jönsson G, Ringnér M, et al. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in HER2-amplified breast cancer. **Breast Cancer Res** 2010; 12:R25.

Stanton SE, Disis M. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **J Immunother Cancer** 2016; 4:59.

Sutherland KD, Vaillant F, Alexander WS, et al. c-myc as a mediator of accelerated apoptosis and involution in mammary glands lacking Socs3. **EMBO J** 2006; 25:5805-15.

Székely B, Silber AL, Pusztai L. New Therapeutic Strategies for Triple-Negative Breast Cancer. **Oncology (Williston Park)** 2017; 31:130-7.

Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. **Clin Cancer Res** 2014; 20:5064-74

Tian T, Ruan M, Yang W, Shui R. Evaluation of the prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers. **Oncotarget** 2016; 7:44395-405.

Titanji K, Velu V, Chennareddi L, et al. Acute depletion of activated memory B cells involves the PD-1 pathway in rapidly progressing SIV-infected macaques. **J Clin Invest** 2010; 120:3878-90.

Tomioka N, Azuma M, Ikarashi M, et al. The therapeutic candidate for immune checkpoint inhibitors elucidated by the status of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple negative breast cancer (TNBC). **Breast Cancer** 2017; 25:34-42.

Topalian S, Drake C, Pardoll D. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. **Curr Opin Immunol** 2012; 24:207-12.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. **Cancer Cell** 2015; 27:450-61.

Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. **Cancer Causes Control** 2009; 20:1071-82.

Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. **Oncogene** 2000; 19:6613-26.

Ushi T, Mina O, Nobutaka I, et al. Association of PD-L1/CD8+TIL and expression of PDL-1, PTEN as predictive biomarkers for long-term follow-up in early breast cancer. **J Clin Oncol** 2017; 35:e12072.

Ursini-Siegel J, Hardy WR, Zuo D, Lam SH, et al. ShcA signalling is essential for tumour progression in mouse models of human breast cancer. **EMBO J** 2008; 27:910-20.

Vibhakar R, Juan G, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Finger LR. Activation- induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes. **Exp Cell Res** 1997; 232:25-28

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.

Widschwendter A, Tonko-Geymayer S, Welte T, Daxenbichler G, Marth C, Doppler W. Prognostic significance of signal transducer and activator of transcription 1 activation in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3065-74.

Wimberly H, Brown JR, Schalper K, et al. PD-L1 Expression correlates with tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Cancer Immunol Res** 2015; 3:326-32.

Wein L, Savas P, Luen SJ, Virassamy B, Salgado R, Loi S. Clinical validity and utility of tumor-infiltrating lymphocytes in routine clinical practice for breast cancer patients: current and future directions. **Front Oncol** 2017; 7:156.

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; 43:1688-169.

Yamashita S, Miyagi C, Carmany-Rampey A, et al. Stat3 controls cell movements during Zebrafish Gastrulation. **Dev Cell** 2002; 2:363-75.

Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. **Trends Cancer** 2016; 2:747-57.

Zhang M, Sun H, Zhao S, Wang Y, Pu H, Wang Y, Zhang Q. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. **Oncotarget** 2017; 8:31347-31354.

Zielinski C, Knapp S, Mascaux C, Hirsch F. Rationale for targeting the immune system through checkpoint molecule blockade in the treatment of non-small-cell lung cancer. **Ann Oncol** 2013; 24:1170-9.

Zinselmeyer BH, Heydari S, Sacristán C, et al. PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. **J Exp Med** 2013; 210:757-74.

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, 24 de Agosto de 2015.

Ao
Dr. Vladimir Claudio Cordeiro de Lima
Aluna: **Monique Celeste Tavares (Mestrado)**

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1914/14B
“Caracterização do infiltrado inflamatório e associação com expressão de PD-1, PDL1 e PDL2 e sobrevida em carcinoma mamário triplo-negativo”.

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 18/08/2015, tomaram conhecimento e aprovaram os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Avaliação do infiltrado inflamatório em carcinoma ductal de mama triplo-negativo e sua correlação com a expressão de PD1, PDL-1 e PDL-2”, registrado neste CEP sob n° 1914/14. O projeto afiliado em referência será Dissertação de Mestrado da aluna: Monique Celeste Tavares.
- Projeto de Pesquisa

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

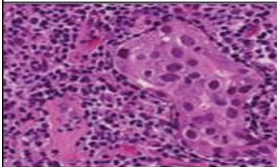
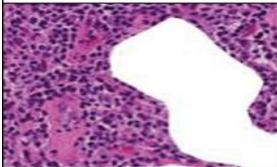

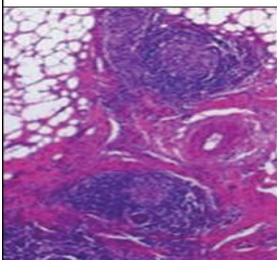
Anexo 2 - Protocolo de Quantificação Linfocitária nos Espécimes de Mama

PADRONIZAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE TILs A PARTIR DE LÂMINAS CORADAS COM HEMATOXILINA & EOSINA (Quadro 1, Figuras 1 e 2)

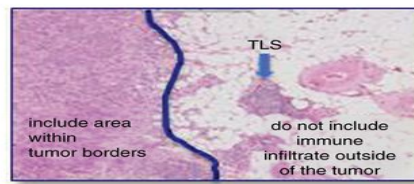
Referência: Salgado et al. Ann Oncol. 2015, 26: 259-271

1. Avaliar a densidade de linfócitos no estroma tumoral, nas áreas de invasão e não na região central. Um corte de 4 um em aumento 200x ou 400x é suficiente, preferencialmente corte completo. *Core-biopsy* pode ser usado.
2. A avaliação deve ser global e não em *hot spot*.
3. Incluir na contagem todas as células mononucleadas (linfócitos e plasmócitos) e excluir os neutrófilos e eosinófilos.
4. Considerar a área do estroma ocupada por mononucleares em relação à área total e não a % de mononucleares em relação ao total de células inflamatórias
5. Considerar a variável contínua dentro do possível, um escore de 5-5% é factível. 100% significa infiltrado denso, aceitando-se algum espaçamento entre os linfócitos.
6. Excluir linfócitos ao redor de CDIS dentro e fora do tumor, áreas de necrose, biópsia prévia e com artefatos de esmagamento.
7. Não há um ponto do corte estabelecido como clinicamente relevante. Casos com mais linfócitos que células tumorais certamente são relevantes e o ponto de corte entre 50-60% tem sido usado

Quadro 1 - Morfologia, definição e relevância diagnóstica do infiltrado linfocitário em câncer de mama.

Morphology	Definition and biological relevance	Diagnostic relevance
Lymphocyte-predominant breast cancer (LPBC)		
	Working category to describe tumors with "more lymphocytes than tumor cells".	Definitions vary across studies with stromal TILs of 50–60% used as a threshold. LPBC can be used for predefined subgroup analyses and for description of tumors with a particularly high immune infiltrate, however, keep in mind that TILs are a continuous parameter and the threshold for LPBC is still arbitrary.
Stromal TILs		
	Indicator of increased accumulation of immune-cells in tumor tissue	Stromal TILs have been shown to be predictive for increased response to neoadjuvant chemotherapy as well as improved outcome after adjuvant chemotherapy. Based on current data, this parameter is the best parameter for characterization of TILs.
Intratumoral TILs		
	TILs with direct cell-cell contact with carcinoma cells, might be an indicator of direct cell-based anti-tumor effects.	Several studies have shown that intratumoral TILs are more difficult to evaluate and do not provide additional predictive/prognostic information compared to stromal TILs.
TILs at the invasive margin		
The localization of TILs at the invasive edge is included in the evaluation approach presented in this guideline.		For breast cancer there are no studies with a separate evaluation of TILs at the invasive edge. For practical purposes, the reliable evaluation of the invasive edge might be difficult when using core biopsies in the neoadjuvant setting.
Tertiary lymphoid structures (TLS)		
	Typically localized in the surrounding area of the tumor, TLS might be localized in normal tissue directly adjacent to the tumor, consisting of a T cell zone next to a B cell follicle, often with germinal centers.	While these structures may be important for the biology of tumor-immune reactions, they are not yet optimized for non-research based assessments. The main problem is that TLS have a spatial heterogeneity and are principally localized in areas surrounding the tumor. They might not be in the plane of the tissue section that is being evaluated, in particular when using core biopsies. Furthermore, it might be difficult to distinguish lymphoid aggregates from true TLS, in particular when the germinal center is not in the plane of the section.

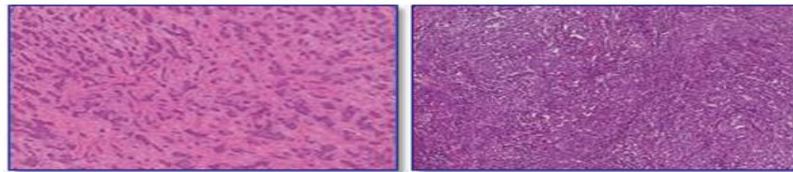
Step 1: Select tumor area



Step 2: Define stromal area



Step 3: Scan at low magnification



Step 4: Determine type of inflammatory infiltrate



Step 5: Assess the percentage of stromal TILs (examples of percentages shown in figure 4)

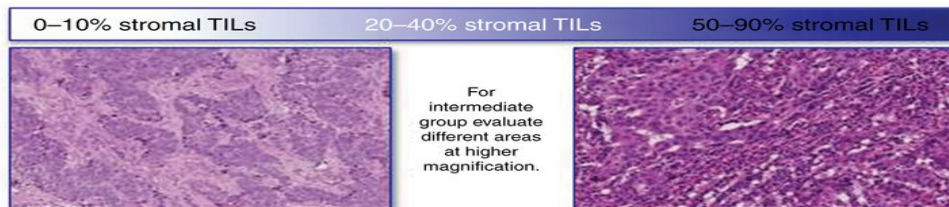


Figura 1 – Fluxograma demonstrando a padronização do método de avaliação do infiltrado inflamatório no estroma tumoral.

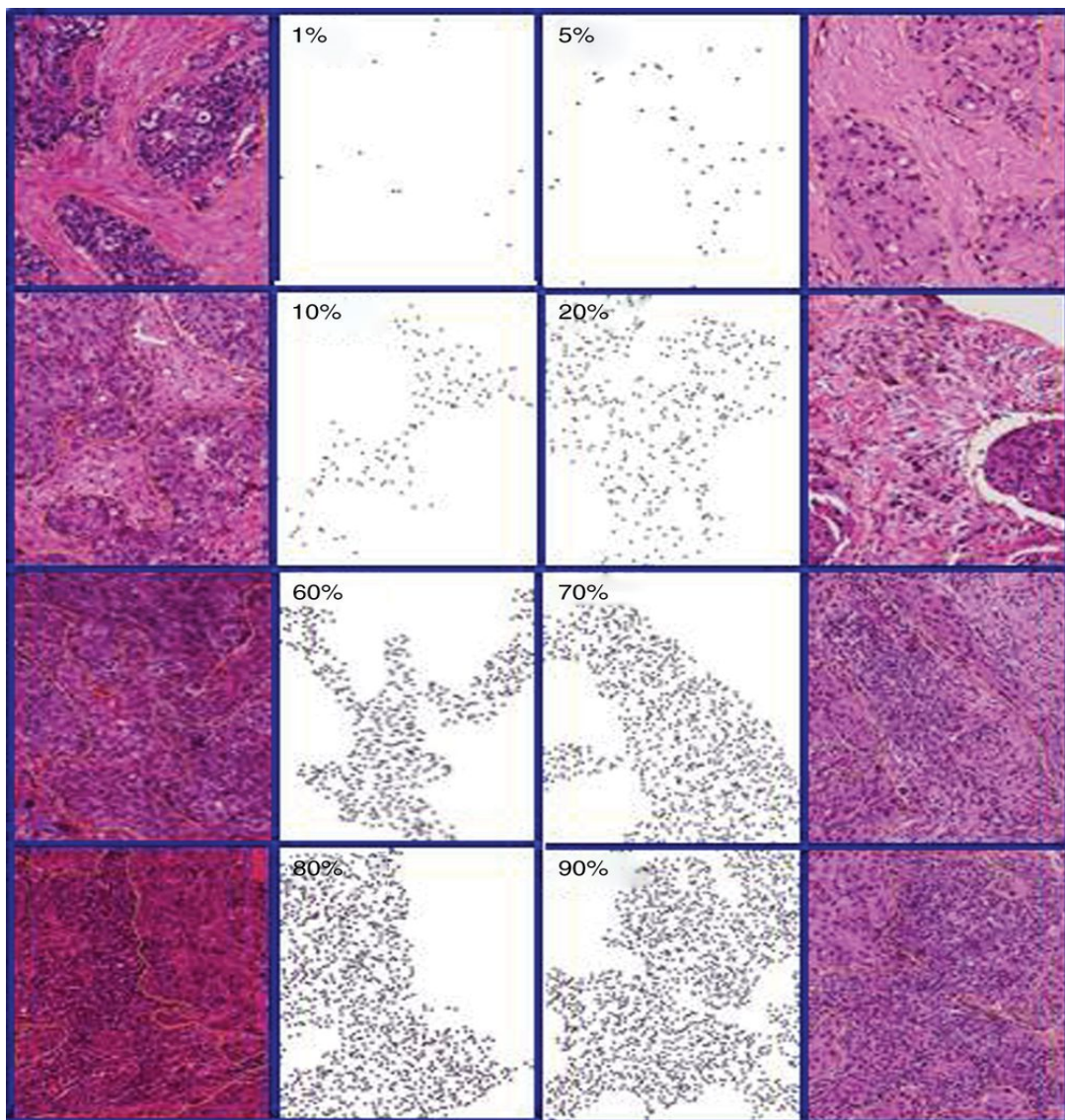


Figura 2 – Exemplos representativos de amostras com diversos padrões e intensidades de infiltrado inflamatório.

Anexo 3 – Ficha de Coleta de dados Utilizada nesse Projeto.

INDENTIFICAÇÃO:

1. NOME: _____
2. RGH: _____
3. DATA NASCIMENTO: ___/___/___
4. DATA DIAGNOSTICO: ___/___/___
5. IDADE AO DIAGNOSTICO: _____
6. RAÇA: (1)BRANCA (2) NEGRA (3) OUTRA: _____ (4) NA

HISTORIA:

1. PESO: _____ KG ALT: _____ CM IMC: _____
2. HF CANCER DE MAMA: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM INFORMAÇÃO
OUTROS TIPOS DE CANCER: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM
INFORMAÇÃO
Qual? _____
3. FUMO ATIVO/ EX-TABAGISTA: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM
INFORMAÇÃO
4. ALCOOL ATIVO/ EX-ETILISTA: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM
INFORMAÇÃO
5. COMORBIDADES: (1) SIM (2) NÃO
(1) HAS (2) DM (3) HIPOTIREOIDISMO (4) HIPERTIREOIDISMO (8
5) DISLIPIDEMIA (6) CARDIOPATIA (7) OBESIDADE (8
)OSTEOPOROSE (9) OUTRA: _____

GINECO/OBSTETRICA:

1. MENARCA: _____ ANOS
2. MENOPAUSA: (1) SIM (2) NÃO -> IDADE _____ ANOS
TRH: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM INFORMAÇÃO
3. GESTAÇÕES: (1) SIM : N°: _____ (2) NÃO (3) SEM INFORMAÇÃO
AMAMENTAÇÃO: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM
INFORMAÇÃO
4. ABORTO: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM INFORMAÇÃO
5. FERTILIZAÇÃO: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM INFORMAÇÃO
6. ACO: (1) SIM (2) NÃO (3) SEM INFORMAÇÃO

ESTADIAMENTO AO DIAGNOSTICO:

1. CLINICO: EC: (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA (6) IIIB (7)
IIIC (8) IV
2. T (1) 0 (2) X (3) 1 (4) 2 (5) 3 (6) 4
3. N (1) 0 (2) X (3) 1 (4) 2 (5) 3
4. M (1) 0 (2) X (3) 1
5. METASTATICO AO DIAGNOSTICO:
6. (1) SIM (2) NÃO (99) SÍTIO: (1) SNC (2) OSSO (3) LOCAL (4)
FIGADO (5) PULMÃO (6) LFN (7) OUTRO: _____

CORE-BIOPSY:

1. DATA: ___/___/_____
2. REGISTRO: _____
3. HISTOLOGIA: (1)CDI (2)CLI (3)OUTRO:

4. TAMANHO:
5. Multicentricidade: (1) sim (2) não
6. TUMOR IN situ ASSOCIADO: (1) SIM (2) NÃO
7. GRAU HISTOLOGICO: (1) 1 (2) 2 (3) 3
8. GRAU NUCLEAR: (1) 1 (2) 2 (3) 3
9. MITOSES: ___/10CAMPO
10. NECROSE: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
11. INFLAMAÇÃO: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
12. INVASÃO VASCULAR: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
13. INVASÃO LINFÁTICA: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
14. INVASÃO PERINEURAL: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
15. Ki67: ___%
16. E-CADERINA: (1) Pos (2) neg _____// P63: _____//
P53: _____// DDX1: _____// CLAUDINA: _____
17. EGFR: _____// CK5: _____// CK14: _____//
METALOPROTEINASE: _____
18. FISH: (1) SIM (2) NÃO Resultado: (1) POSITIVO (2) NEGATIVO (3)NA
19. HER: (1) 0 (2) 1+ (3) 2+ (4) 3+

QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE:

20. (1) SIM (2) NÃO
21. DATA INICIO: ___/___/_____
22. DATA TERMINO: ___/___/_____
23. ESQUEMA: (1) AC -T (TAXOL SEMANAL) (2) AC -T (DOCETAXEL)
(3) AC-T (TAXOL)(DOSE DENSA) (4) AC-T (DOCE)(DOSE DENSA)
(5)AC (6)AC-TAXOL (21DIAS) (7) OUTRA: _____
24. CICLOS: Nº: (1)(4X-4X) (2)(4X-12S) (3)(4X) (4)(4X-2X) (5)(2X-1X)
(6) OUTRA: _____

CIRURGIA:

1. TIPO CIRURGIA: (1)MASTECTOMIA RADICAL (2) SETOR (3) NÃO
REALIZOU CIRURGIA
2. MAMA COMPROMETIDA: (1) DIREITA (2) ESQUERDA (3)
BILATERAL
3. ESVAZIAMENTO AXILAR: (1)SIM (2) NÃO
4. LINFONODO SENTINELA (1) SIM (2) NÃO
5. DATA DA CIRURGIA: ___/___/_____

6. HISTOLOGIA: (1) CDI (2) CLI (3) OUTRO:
7. TAMANHO: 1° FOCO: _____ / 2° FOCO: _____
 _____ / 3° FOCO: _____
8. TUMOR in situ ASSOCIADO: (1) SIM (2) NÃO
9. GRAU HISTOLOGICO: (1) 1 (2) 2 (3) 3
10. GRAU NUCLEAR: (1) 1 (2) 2 (3) 3
11. MITOSES: ___/10CAMPO
12. NECROSE: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
13. INFLAMAÇÃO: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
14. INVASÃO VASCULAR: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
15. INVASÃO LINFÁTICA: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
16. INVASÃO PERINEURAL: (1) PRESENTE (2) AUSENTE
17. Ki67: ___%
18. E-CADERINA: _____ // P63: _____ // P53: _____ //
 DDX1: _____ // CLAUDINA: _____
19. EGFR: _____ // CK5: _____ // CK14: _____ //
 METALOPROTEINASE: _____
20. ESTADIAMENTO PATOLOGICO: : T___N___M___ EC: (1) I (2) II (3) III (4) IV
21. T (1) 0 (2) X (3) 1 (4) 2 (5) 3 (6) 4
22. N (1) 0 (2) X (3) 1 (4) 2 (5) 3
23. M (1) 0 (2) X (3) 1
24. LFN RESSECADOS: N°: _____
25. LFN COMPROMETIDOS: N° _____
26. RESPOSTA PATOLOGICA SE TERAPIA NEOADJUVANTE: (1)
 RESPOSTA COMPLETA (2) DOENÇA RESIDUAL

RADIOTERAPIA ADJUVANTE:

1. (1) SIM (2) NÃO
2. DATA INICIO: ___/___/___
3. DATA TERMINO: ___/___/___
4. DOSE: _____ () NA

QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE:

1. (1) SIM (2) NÃO
2. DATA INICIO: ___/___/___
3. DATA TERMINO: ___/___/___
4. ESQUEMA: (1) AC -T (TAXOL SEMANAL) (2) AC -T (DOCETAXEL)
 (3) AC-T (TAXOL)(DOSE DENSA) (4) AC-T (DOCE)(DOSE DENSA)
 (5) AC (6) AC-TAXOL (21DIAS) (7) OUTRA: _____
 (8) CMF

5. CICLOS: Nº: (1)(4X-4X) (2)(4X-12 SEMANAS) (3)(4X AC) (4) (4X-2X) (5)(2X-1X)
(6) OUTRA: _____ (7) 6 X AC

QUIMIOTERAPIA INICIAL PARA DOENÇA METASTÁTICA AO DIAGNÓSTICO:

1. (1) SIM (2)NÃO
2. DATA INICIO: ___/___/___
3. DATA TERMINO: ___/___/___
4. ESQUEMA: (1) AC -T (TAXOL SEMANAL) (2) AC -T (DOCETAXEL) (3) AC-T (TAXOL)(DOSE DENSA) (4) AC-T (DOCE)(DOSE DENSA) (5)AC (6)AC-TAXOL (21DIAS) (7) OUTRA: _____
5. CICLOS: Nº: (1)(4X-4X) (2)(4X-12S) (3)(4X) (4)(4X-2X) (5)(2X-1X) (6) OUTRA: _____
6. **USO DE TAXANO:** (1) SIM (2) NÃO
7. **USO DE ANTRACICLICO:** (1)SIM (2) NÃO

RECIDIVA: (1) SIM (2) NÃO

1. DATA: ___/___/___
2. LOCAL: (1)SNC (2) OSSO (3) LOCAL (4)FIGADO (5) PULMÃO (6)LFN (7)OUTRO
3. Fez quimioterapia para recidiva: (1) sim (2) não
4. Quantas linhas? (1) 1 (2) 2

ÓBITO: (1)SIM (2) NAO

1. DATA: ___/___/___
2. CAUSA: (1) CANCER (2) OUTRA CAUSA: _____

ÚLTIMA CONSULTA NA ONCO/ ÚLTIMO FOLLOW-UP:

1. DATA: ___/___/___
2. (1) MORTO SEM DOENÇA (2) MORTO COM DOENÇA (3) VIVO COM DOENÇA (4) VIVO SEM DOENÇA (5) SED (6) PD (7) DE (8) PERDA DE SEGUIMENTO

Anexo 4 – Tabelas de Associação da Média do Número de Células Positivas (ou Negativas no caso do PTEN) para Marcador Avaliado com as Variáveis Clínico-Patológicas.

Tabela A - Associação da marcação para CD20 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD20 média*		p
		≤530,54 N (%)	>530,54 N (%)	
EC	IA ou IB	13 (22,4%)	2 (11,1%)	0,622
	IIA ou IIB	32 (55,2%)	11 (61,1%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	13 (22,4%)	5 (27,8%)	
T	T0, T1 ou T2	51 (87,9%)	15 (83,3%)	0,693
	T3 ou T4	7 (12,1%)	3 (16,7%)	
N	N0 ou N1	49 (84,5%)	16 (88,9%)	1
	N2	6 (10,3%)	2 (11,1%)	
	N3	3 (5,2%)	0 (0,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	41 (74,5%)	8 (50,0%)	0,074
	>30%	14 (25,5%)	8 (50,0%)	
GH	I ou II	22 (37,9%)	8 (44,4%)	0,828
	III	36 (62,1%)	10 (55,6%)	
GN	I ou II	18 (31,0%)	5 (27,8%)	1
	III	40 (69,0%)	13 (72,2%)	
Tipo histológico	Ductal	53 (91,4%)	18 (100,0%)	0,331
	Outros	5 (8,6%)	0 (0,0%)	
IVS	Presente	11 (19,0%)	4 (22,2%)	0,744
	Ausente	47 (81,0%)	14 (77,8%)	
IVL	Presente	15 (26,3%)	8 (44,4%)	0,246
	Ausente	42 (73,7%)	10 (55,6%)	
IPN	Presente	14 (24,1%)	4 (22,2%)	1
	Ausente	44 (75,9%)	14 (77,8%)	
Necrose	Presente	25 (43,9%)	5 (27,8%)	0,348
	Ausente	32 (56,1%)	13 (72,2%)	

* A média do número de células com marcação positiva para CD20 presentes no estroma foi empregada para dicotomizar a amostra.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela B - Associação da marcação para CD4 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD4 média		Valor p
		≤1288,91 N (%)	>1288,91 N (%)	
EC	IA ou IB	10 (20,8%)	5 (17,9%)	0,944
	IIA ou IIB	27 (56,3%)	16 (57,1%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	11 (22,9%)	7 (25%)	
T	T0, T1 ou T2	41 (85,4%)	25 (89,3%)	0,737
	T3 ou T4	7 (14,6%)	3 (10,7%)	
N	N0 ou N1	42 (87,5%)	23 (82,1%)	0,756
	N2	4 (8,3%)	4 (14,3%)	
	N3	2 (4,2%)	1 (3,6%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	33 (73,3%)	16 (61,5%)	0,442
	>30%	12 (26,7%)	10 (38,5%)	
GH	I ou II	22 (45,8)	8 (28,6%)	0,214
	III	26 (54,2%)	20 (71,4%)	
GN	I ou II	17 (35,4%)	6 (21,4%)	0,307
	III	31 (64,5%)	22 (78,6%)	
Tipo Histológico	Ductal	45 (93,75%)	26 (92,8)	1
	Outros	3 (6,3%)	2 (7,1%)	
IVS	Presente	9 (18,7%)	6 (21,4%)	1
	Ausente	39 (81,3%)	22 (78,6%)	
IVL	Presente	15 (31,9%)	8 (28,6%)	0,964
	Ausente	32 (68,1%)	20 (71,4%)	
IPN	Presente	9 (18,7%)	9 (32,1%)	0,296
	Ausente	39 (81,3%)	19 (67,9%)	
Necrose	Presente	19 (40,4%)	11 (39,3%)	1
	Ausente	28 (59,6%)	17 (60,7%)	

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela C - Associação da marcação para CD163 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD163 média		Valor p
		≤2001,41 N (%)	>2001,41 N (%)	
EC	IA ou IB	8 (18,6%)	7 (21,2%)	0,944
	IIA ou IIB	25 (58,1%)	18 (54,5%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	10 (23,3%)	8 (24,2%)	
T	T0, T1 ou T2	37 (86,0%)	29 (87,9%)	1
	T3 ou T4	6 (14,0%)	4 (12,1%)	
N	N0 ou N1	38 (88,4%)	27 (81,8%)	0,056
	N2	2 (4,7%)	6 (18,2%)	
	N3	3 (7,0%)	0 (0,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	31 (75,6%)	18 (60,0%)	0,252
	>30%	10 (24,4%)	12 (40,0%)	
GH	I ou II	17 (39,5%)	13 (39,4%)	1
	III	26 (60,5%)	20 (60,6%)	
GN	I ou II	15 (34,9%)	8 (24,2%)	0,454
	III	28 (65,1%)	25 (75,8%)	
Tipo Histológico	Ductal	42 (97,7%)	29 (87,9%)	0,160
	Outros	1 (2,3%)	4 (12,1%)	
IVS	Presente	7 (16,3%)	8 (24,2%)	0,566
	Ausente	36 (83,7%)	25 (75,8%)	
IVL	Presente	13 (31,0%)	10 (30,3%)	1
	Ausente	29 (69,0%)	23 (69,7%)	
IPN	Presente	9 (20,9%)	9 (27,3%)	0,710
	Ausente	34 (79,1%)	24 (72,7%)	
Necrose	Presente	21 (48,8%)	9 (28,1%)	0,116
	Ausente	22 (51,2%)	23 (71,9%)	

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela D - Associação da marcação para CD8 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD8 média		Valor p
		≤1513,52 N (%)	>1513,52 N (%)	
EC	IA ou IB	7 (15,9%)	8 (25,0%)	0,616
	IIA ou IIB	26 (59,1%)	17 (53,1%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	11 (25,0%)	7 (21,9%)	
T	T0, T1 ou T2	38 (86,4%)	28 (87,5%)	1
	T3 ou T4	6 (13,6%)	4 (12,5%)	
N	N0 ou N1	37 (84,1%)	28 (87,5%)	1
	N2	5 (11,4%)	3 (9,4%)	
	N3	2 (4,5%)	1 (3,1%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	27 (67,5%)	22 (71,0%)	0,754
	>30%	13 (32,5%)	9 (29,0%)	
GH	I ou II	20 (45,5%)	10 (31,3%)	0,311
	III	24 (54,5%)	22 (68,8%)	
GN	I ou II	16 (36,4%)	7 (21,9%)	0,269
	III	28 (63,6%)	25 (78,1%)	
Tipo histológico	Ductal	41 (93,2%)	30 (93,8%)	1
	Outros	3 (6,8%)	2 (6,3%)	
IVS	Presente	7 (15,9%)	8 (25,0%)	0,489
	Ausente	37 (84,1%)	24 (75,0%)	
IVL	Presente	12 (27,9%)	11 (34,4%)	0,728
	Ausente	31 (72,1%)	21 (65,6%)	
IPN	Presente	8 (18,2%)	10 (31,3%)	0,294
	Ausente	36 (81,8%)	22 (68,8%)	
Necrose	Presente	17 (39,3%)	13 (40,6%)	1
	Ausente	26 (60,5%)	19 (59,4%)	

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela E - Associação da marcação para CD68 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD68 média		Valor p
		≤2853,62 N (%)	>2853,62 N (%)	
EC	IA ou IB	9 (20,5%)	6 (18,8%)	0,966
	IIA ou IIB	25 (56,8%)	18 (56,3%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	10 (22,7%)	8 (25,0%)	
T	T0, T1 ou T2	38 (86,4%)	28 (87,5%)	1
	T3 ou T4	6 (13,6%)	4 (12,5%)	
N	N0 ou N1	38 (86,4%)	27 (84,4%)	0,878
	N2	4 (9,1%)	4 (12,5%)	
	N3	2 (4,5%)	1 (3,1%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	31 (75,6%)	18 (60,0%)	0,252
	>30%	10 (24,4%)	12 (40,0%)	
GH	I ou II	21 (47,7%)	9 (28,1%)	0,137
	III	23 (52,3%)	23 (71,9%)	
GN	I ou II	15 (34,1%)	8 (25,0%)	0,549
	III	29 (65,9%)	24 (75,0%)	
Tipo histológico	Ductal	41 (93,2%)	30 (93,8%)	1
	Outros	3 (6,8%)	2 (6,3%)	
IVS	Presente	8 (18,2%)	7 (21,9%)	0,914
	Ausente	36 (81,8%)	25 (78,1%)	
IVL	Presente	15 (34,9%)	8 (25,0%)	0,506
	Ausente	28 (65,1%)	24 (75,0%)	
IPN	Presente	10 (22,7%)	8 (25,0%)	1
	Ausente	34 (77,3%)	24 (75,0%)	
Necrose	Presente	16 (36,4%)	14 (45,2%)	0,599
	Ausente	28 (63,6%)	17 (54,8%)	

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela F- Associação da marcação de FOXP3 nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	FOXP3 média		Valor p
		≤26,37 N (%)	>26,37 N (%)	
EC	IA ou IB	9 (17,3%)	6 (25,0%)	0,723
	IIA ou IIB	30 (57,7%)	13 (54,2%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	13 (25,0%)	5 (20,8%)	
T	T0, T1 ou T2	45 (86,5%)	21 (87,5%)	1
	T3 ou T4	7 (13,5%)	3 (12,5%)	
N	N0 ou N1	44 (84,6%)	21 (87,5%)	1
	N2	6 (11,5%)	2 (8,3%)	
	N3	2 (3,8%)	1 (4,2%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	32 (68,1%)	17 (70,8%)	1
	>30%	15 (31,9%)	7 (29,2%)	
GH	I ou II	19 (36,5%)	11 (45,8%)	0,604
	III	33 (63,5%)	13 (54,2%)	
GN	I ou II	19 (36,5%)	4 (16,7%)	0,138
	III	33 (63,5%)	20 (83,3%)	
Tipo histológico	Ductal	48 (92,3%)	23 (95,8%)	1
	Outros	4 (7,7%)	1 (4,2%)	
IVS	Presente	10 (19,2%)	5 (20,8%)	1
	Ausente	42 (80,8%)	19 (79,2%)	
IVL	Presente	13 (25,5%)	10 (41,7%)	0,251
	Ausente	38 (74,5%)	14 (58,3%)	
IPN	Presente	14 (26,9%)	4 (16,7%)	0,492
	Ausente	38 (73,1%)	20 (83,3%)	
Necrose	Presente	21 (40,4%)	9 (39,1%)	1
	Ausente	31 (59,6%)	14 (60,9%)	

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela G- Associação da marcação para ausência de PTEN nas células do estroma tumoral com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	PTEN média		Valor p
		≤119,58 N (%)	>119,58 N (%)	
EC	IA ou IB	5 (17,9%)	10 (20,8%)	0,415
	IIA ou IIB	14 (50,0%)	29 (60,4%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	9 (32,1%)	9 (18,8%)	
T	T0, T1 ou T2	22 (78,6%)	44 (91,7%)	0,158
	T3 ou T4	6 (21,4%)	4 (8,3%)	
N	N0 ou N1	23 (82,1%)	42 (87,5%)	0,756
	N2	4 (14,3%)	4 (8,3%)	
	N3	1 (3,6%)	2 (4,2%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	19 (73,1%)	30 (66,7%)	0,767
	>30%	7 (26,9%)	15 (33,3%)	
GH	I ou II	12 (42,9%)	18 (37,5%)	0,828
	III	16 (57,1%)	30 (62,5%)	
GN	I ou II	9 (32,1%)	14 (29,2%)	0,989
	III	19 (67,9%)	34 (70,8%)	
Tipo histológico	Ductal	25 (89,3%)	46 (95,8%)	0,351
	Outros	3 (10,7%)	2 (4,2%)	
IVS	Presente	5 (17,9%)	10 (20,8%)	0,987
	Ausente	23 (82,1%)	38 (79,2%)	
IVL	Presente	9 (33,3%)	14 (29,2%)	0,909
	Ausente	18 (66,7%)	34 (70,8%)	
IPN	Presente	7 (25,0%)	11 (22,9%)	1
	Ausente	21 (75,0%)	37 (77,1%)	
Necrose	Presente	12 (44,4%)	18 (37,5%)	0,731
	Ausente	15 (55,6%)	30 (62,5%)	

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Anexo 5 – Associação do Ponto de Corte Ótimo para Análise de Sobrevida Global (SG) de cada Marcador com as Variáveis Clínico-Patológicas

Tabela A1 – Associação da expressão de CD20 categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD20 (células/mm ²)*		Valor p
		≤471 N (%)	>471 N (%)	
EC	IA ou IB	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0,937
	IIA ou IIB	32 (74,4%)	11 (25,6%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	13 (72,2%)	5 (27,8%)	
T	T0, T1 ou T2	50 (75,8%)	16 (24,2%)	0,704
	T3 ou T4	7 (70,0%)	3 (30,0%)	
N	N0 ou N1	48 (73,8%)	17 (26,2%)	0,858
	N2	6 (75,0%)	2 (25,0%)	
	N3	3 (100,0%)	0 (0,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	41 (83,7%)	8 (16,3%)	0,074
	>30%	14 (63,6%)	8 (36,4%)	
GH	I ou II	22 (38,6%)	8 (42,1%)	1
	III	35 (61,4%)	11 (57,9%)	
GN	I ou II	18 (31,6%)	5 (26,3%)	0,885
	III	39 (68,4%)	14 (73,7%)	
Tipo histológico	Ductal	52 (91,2%)	19 (100,0%)	0,323
	Outros	5 (8,8%)	0 (0,0%)	
IVS	Presente	11 (19,3%)	4 (21,1%)	1
	Ausente	46 (80,7%)	15 (78,9%)	
IVL	Presente	15 (26,8%)	8 (42,1%)	0,335
	Ausente	41 (73,2%)	11 (57,9%)	
IPN	Presente	14 (24,6%)	4 (21,1%)	1
	Ausente	43 (75,4%)	15 (78,9%)	
Necrose	Presente	25 (44,6%)	5 (26,3%)	0,255
	Ausente	31 (55,4%)	14 (73,7%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela B1 - Associação da expressão de CD4 categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD4 (células/mm ²)*		Valor p
		≤2573 N (%)	>2573 N (%)	
EC	IA ou IB	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,115
	IIA ou IIB	35 (81,4%)	8 (18,6%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	17 (94,4%)	1 (5,6%)	
T	T0, T1 ou T2	52 (78,8%)	14 (21,2%)	0,193
	T3 ou T4	10 (100,0%)	0 (0,0%)	
N	N0 ou N1	52 (80,0%)	13 (20,0%)	1
	N2	7 (87,5%)	1 (12,5%)	
	N3	3 (100,0%)	0 (0,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	41 (83,7%)	8 (16,3%)	0,339
	>30%	16 (72,7%)	6 (27,3%)	
GH	I ou II	27 (43,5%)	3 (21,4%)	0,220
	III	35 (56,5%)	11 (78,6%)	
GN	I ou II	20 (32,3%)	3 (21,4%)	0,532
	III	42 (67,7%)	11 (78,6%)	
Tipo Histológico	Ductal	59 (95,2%)	12 (85,7%)	0,227
	Outros	3 (4,8%)	2 (14,3%)	
IVS	Presente	13 (21,0%)	2 (14,3%)	0,723
	Ausente	49 (79%)	12 (85,7%)	
IVL	Presente	22 (36,1%)	1 (7,1%)	0,051
	Ausente	39 (63,9%)	13 (92,9%)	
IPN	Presente	14 (22,6%)	4 (28,6%)	0,730
	Ausente	48 (77,4%)	10 (71,4%)	
Necrose	Presente	24 (39,3%)	6 (42,9%)	1
	Ausente	37 (60,7%)	8 (57,1%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela C1 - Associação da expressão de CD163 categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD163 (células/mm ²)*		Valor p
		≤2338 N (%)	>2338 N (%)	
EC	IA ou IB	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,77
	IIA ou IIB	25 (58,1%)	18 (41,9%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	12 (66,7%)	6 (33,3%)	
T	T0, T1 ou T2	39 (59,1%)	27 (40,9%)	0,301
	T3 ou T4	8 (80,0%)	2 (20,0%)	
N	N0 ou N1	41 (63,1%)	24 (36,9%)	0,169
	N2	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
	N3	3 (100,0%)	0 (0,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	34 (69,4%)	15 (30,6%)	0,098
	>30%	10 (45,5%)	12 (54,5%)	
GH	I ou II	19 (40,4%)	11 (37,9%)	1
	III	28 (59,6%)	18 (62,1%)	
GN	I ou II	17 (36,2%)	6 (20,7%)	0,242
	III	30 (63,8%)	23 (79,3%)	
Tipo Histológico	Ductal	45 (95,7%)	26 (89,7%)	0,364
	Outros	2 (4,3%)	3 (10,3%)	
IVS	Presente	7 (14,9%)	8 (27,6%)	0,292
	Ausente	40 (85,1%)	21 (72,4%)	
IVL	Presente	14 (30,4%)	9 (31,0%)	1
	Ausente	32 (69,6%)	20 (69,0%)	
IPN	Presente	9 (19,1%)	9 (31,0%)	0,365
	Ausente	38 (80,9%)	20 (69,0%)	
Necrose	Presente	22 (46,8%)	8 (28,6%)	0,188
	Ausente	25 (53,2%)	20 (71,4%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela D1 - Associação da expressão de CD8 categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD8 (células/mm ²)*		Valor p
		≤203 N (%)	>203 N (%)	
EC	IA ou IB	2 (13,3%)	13 (86,7%)	0,711
	IIA ou IIB	6 (14,0%)	37 (86,0%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	1 (5,6%)	17 (94,4%)	
T	T0, T1 ou T2	8 (12,1%)	58 (87,9%)	1
	T3 ou T4	1 (10,0%)	9 (90,0%)	
N	N0 ou N1	9 (13,8%)	56 (86,2%)	0,717
	N2	0 (0,0%)	8 (100,0%)	
	N3	0 (0,0%)	3 (100,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	7 (14,3%)	42 (85,7%)	0,42
	>30%	1 (4,5%)	21 (95,5%)	
GH	I ou II	5 (55,6%)	25 (37,3%)	0,306
	III	4 (44,4%)	42 (62,7%)	
GN	I ou II	2 (22,2%)	21 (31,3%)	0,715
	III	7 (77,8%)	46 (68,7%)	
Tipo histológico	Ductal	8 (88,9%)	63 (94,0%)	0,477
	Outros	1 (11,1%)	4 (6,0%)	
IVS	Presente	1 (11,1%)	14 (20,9%)	0,678
	Ausente	8 (88,9%)	53 (79,1%)	
IVL	Presente	2 (25,0%)	21 (31,3%)	1
	Ausente	6 (75,0%)	46 (68,7%)	
IPN	Presente	1 (11,1%)	17(25,4%)	0,677
	Ausente	8 (8,9%)	50(74,6%)	
Necrose	Presente	3 (33,3%)	27 (40,9%)	0,733
	Ausente	6 (66,7%)	39 (59,1%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela E1 - Associação da expressão de CD68 categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	CD68 (células/mm ²)*		Valor p
		≤4457 N (%)	>4457 N (%)	
EC	IA ou IB	11 (73,3%)	4 (26,7%)	0,734
	IIA ou IIB	35 (81,4%)	8 (18,6%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	15 (83,3%)	3 (16,7%)	
T	T0, T1 ou T2	52 (78,8%)	14 (21,2%)	0,676
	T3 ou T4	9 (90,0%)	1 (10,0%)	
N	N0 ou N1	52 (80,0%)	13 (20,0%)	0,828
	N2	6 (75,0%)	2 (25,0%)	
	N3	3 (100,0%)	0 (0,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	41 (83,7%)	8 (16,3%)	0,208
	>30%	15 (68,2%)	7 (31,8%)	
GH	I ou II	26 (42,6%)	4 (26,7%)	0,402
	III	35 (57,4%)	11 (73,3%)	
GN	I ou II	19 (31,1%)	4 (26,7%)	1
	III	42 (68,9%)	11 (73,3%)	
Tipo histológico	Ductal	57 (93,4%)	14 (93,3%)	1
	Outros	4 (6,6%)	1 (6,7%)	
IVS	Presente	12 (19,7%)	3 (20,0%)	1
	Ausente	49 (80,3%)	12 (80,0%)	
IVL	Presente	21 (35,0%)	2 (13,3%)	0,128
	Ausente	39 (65,0%)	13 (86,7%)	
IPN	Presente	14 (23,0%)	4 (26,7%)	0,744
	Ausente	47 (77,0%)	11 (73,3%)	
Necrose	Presente	25 (41,7%)	5 (33,3%)	0,768
	Ausente	35 (58,3%)	10 (66,7%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela F1 - Associação da expressão de FOXP3 categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	FOXP3 (células/mm ²)*		Valor p
		≤6 N (%)	>6 N (%)	
EC	IA ou IB	7 (46,7%)	8 (53,3%)	0,114
	IIA ou IIB	19 (44,2%)	24 (55,8%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	3 (16,7%)	15 (83,3%)	
T	T0, T1 ou T2	27 (40,9%)	39 (59,1%)	0,301
	T3 ou T4	2 (20,0%)	8 (80,0%)	
N	N0 ou N1	27 (41,5%)	38 (58,5%)	0,335
	N2	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
	N3	0 (0,0%)	3 (100,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	17 (34,7%)	32 (65,3%)	0,813
	>30%	9 (40,9%)	13 (59,1%)	
GH	I ou II	12 (41,4%)	18 (38,3%)	0,980
	III	17 (58,6%)	29 (61,7%)	
GN	I ou II	10 (34,5%)	13 (27,7%)	0,710
	III	19 (65,5%)	34 (72,3%)	
Tipo histológico	Ductal	25 (86,2%)	46 (97,9%)	0,067
	Outros	4 (13,8%)	1 (2,1%)	
IVS	Presente	5 (17,2%)	10 (21,3%)	0,894
	Ausente	24 (82,8%)	37 (78,7%)	
IVL	Presente	5 (17,9%)	18 (38,3%)	0,110
	Ausente	23 (82,1%)	29 (61,7%)	
IPN	Presente	8 (27,6%)	10 (21,3%)	0,726
	Ausente	21 (72,4%)	37 (78,7%)	
Necrose	Presente	13 (44,8%)	17 (37,0%)	0,663
	Ausente	16 (55,2%)	29 (63,0%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela G1 - Associação da expressão de ausência de PTEN categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	PTEN*		Valor p
		=0 N (%)	>0 N (%)	
EC	IA ou IB	2 (13,3%)	13 (86,7%)	0,514
	IIA ou IIB	3 (7,0%)	40 (93,0%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	3 (16,7%)	15 (83,3%)	
T	T0, T1 ou T2	6 (9,1%)	60 (90,9%)	0,282
	T3 ou T4	2 (20,0%)	8 (80,0%)	
N	N0 ou N1	6 (9,2%)	59 (90,8%)	0,437
	N2	2 (25,0%)	6 (75,0%)	
	N3	0 (0,0%)	3 (100,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	6 (12,2%)	43 (87,8%)	0,423
	>30%	1 (4,5%)	21 (95,5%)	
GH	I ou II	3 (37,5%)	27 (39,7%)	1
	III	5 (62,5%)	41 (60,3%)	
GN	I ou II	3 (37,5%)	20 (29,4%)	0,692
	III	5 (62,5%)	48 (70,6%)	
Tipo histológico	Ductal	7 (87,5%)	64 (94,1%)	0,436
	Outros	1 (12,5%)	4 (5,9%)	
IVS	Presente	1 (12,5%)	14 (20,6%)	1
	Ausente	7 (87,5%)	54 (79,4%)	
IVL	Presente	2 (25,0%)	21 (31,3%)	1
	Ausente	6 (75,0%)	46 (68,7%)	
IPN	Presente	1 (12,5%)	17 (25,0%)	0,672
	Ausente	7 (87,5%)	51 (75,0%)	
Necrose	Presente	4 (50,0%)	26 (38,8%)	0,706
	Ausente	4 (50,0%)	41 (61,2%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela H - Associação da expressão de pSTAT categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	pSTAT1 (células/mm ²)*		Valor p
		≤367 N (%)	>367 N (%)	
EC	IA ou IB	12 (80,0%)	3 (20,0%)	0,368
	IIA ou IIB	40 (93,0%)	3 (7,0%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	17 (94,4%)	1 (5,6%)	
T	T0, T1 ou T2	59 (89,4%)	7 (10,6%)	0,584
	T3 ou T4	10 (100,0%)	0 (0,0%)	
N	N0 ou N1	59 (90,8%)	6 (9,2%)	0,379
	N2	8 (100,0%)	0 (0,0%)	
	N3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	44 (89,8%)	5 (10,2%)	1
	>30%	20 (90,9%)	2 (9,1%)	
GH	I ou II	28 (40,6%)	2 (28,6%)	0,697
	III	41 (59,4%)	5 (71,4%)	
GN	I ou II	22 (31,9%)	1 (14,3%)	0,668
	III	47 (68,1%)	6 (85,7%)	
Tipo histológico	Ductal	64 (92,8%)	7 (100,0%)	1
	Outros	5 (7,2%)	0 (0,0%)	
IVS	Presente	14 (20,3%)	1 (14,3%)	1
	Ausente	55 (79,7%)	6 (85,7%)	
IVL	Presente	22 (32,4%)	1 (14,3%)	0,427
	Ausente	46 (67,6%)	6 (85,7%)	
IPN	Presente	17 (24,6%)	1 (14,3%)	1
	Ausente	52 (75,4%)	6 (85,7%)	
Necrose	Presente	28 (41,2%)	2 (28,6%)	0,695
	Ausente	40 (58,8%)	5 (71,4%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela I - Associação da expressão de células PDL-1 positivo no estroma, categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	PD-L1 ESTROMA (células/mm ²)*		Valor p
		≤5 N (%)	>5 N (%)	
EC	IA ou IB	5 (50,0%)	5 (50,0%)	0,378
	IIA ou IIB	16 (64,0%)	9 (36,0%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	10 (76,9%)	3 (23,1%)	
T	T0, T1 ou T2	26 (61,9%)	16 (38,1%)	0,402
	T3 ou T4	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
N	N0 ou N1	24 (61,5%)	15 (38,5%)	0,619
	N2	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
	N3	3 (100,0%)	0 (0,0%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	23 (85,2%)	4 (14,8%)	0,001
	>30%	5 (29,4%)	12 (70,6%)	
GH	I ou II	15 (48,4%)	4 (23,5%)	0,169
	III	16 (51,6%)	13 (76,5%)	
GN	I ou II	14 (45,2%)	2 (11,8%)	0,043
	III	17 (54,8%)	15 (88,2%)	
Tipo histológico	Ductal	30 (96,8%)	16 (94,1%)	1
	Outros	1 (3,2%)	1 (5,9%)	
IVS	Presente	8 (25,8%)	2 (11,8%)	0,459
	Ausente	23 (74,2%)	15 (88,2%)	
IVL	Presente	11 (35,5%)	4 (23,5%)	0,597
	Ausente	20 (64,5%)	13 (76,5%)	
IPN	Presente	9 (29,0%)	2 (11,8%)	0,284
	Ausente	22 (71,0%)	15 (88,2%)	
Necrose	Presente	11 (35,5%)	4 (25,0%)	0,689
	Ausente	20 (64,5%)	12 (75,0%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela J – Associação da expressão de células PDL-1 positivas no tumor, categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas.

Variáveis	Categorias	PD-L1 TUMOR (células/mm ²)*		Valor p
		≤1 N (%)	>1 N (%)	
EC	IA ou IB	11 (84,6%)	2 (15,4%)	0,677
	IIA ou IIB	28 (84,8%)	5 (15,2%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	12 (75,0%)	4 (25,0%)	
T	T0, T1 ou T2	43 (81,1%)	10 (18,9%)	1
	T3 ou T4	8 (88,9%)	1 (11,1%)	
N	N0 ou N1	46 (86,8%)	7 (13,2%)	0,046
	N2	3 (50,0%)	3 (50,0%)	
	N3	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	37 (90,2%)	4 (9,8%)	0,049
	>30%	11 (64,7%)	6 (35,3%)	
GH	I ou II	23 (45,1%)	2 (18,2%)	0,174
	III	28 (54,9%)	9 (81,8%)	
GN	I ou II	18 (35,3%)	2 (18,2%)	0,478
	III	33 (64,7%)	9 (81,8%)	
Tipo histológico	Ductal	49 (96,1%)	10 (90,9%)	0,449
	Outros	2 (3,9%)	1 (9,1%)	
IVS	Presente	12 (23,5%)	1 (9,1%)	0,431
	Ausente	39 (76,5%)	10 (90,9%)	
IVL	Presente	19 (37,3%)	2 (18,2%)	0,305
	Ausente	32 (62,7%)	9 (81,8%)	
IPN	Presente	12 (23,5%)	3 (27,3%)	1
	Ausente	39 (76,5%)	8 (72,7%)	
Necrose	Presente	17 (34,0%)	5 (45,5%)	0,504
	Ausente	33 (66,0%)	6 (54,5%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Tabela K - Associação da expressão de células PD-1 positivas, categorizada pelo ponto de corte ótimo para análise de sobrevida global com variáveis clínico-patológicas. Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Variáveis	Categorias	PD-1 (células/mm ²)*		Valor p
		≤5 N (%)	>5 N (%)	
EC	IA ou IB	0 (0,0%)	15 (100,0%)	0,148
	IIA ou IIB	2 (5,0%)	38 (95,0%)	
	IIIA, IIIB ou IIIC	3 (16,7%)	15 (83,3%)	
T	T0, T1 ou T2	3 (4,8%)	60 (95,2%)	0,135
	T3 ou T4	2 (20,0%)	8 (80,0%)	
N	N0 ou N1	4 (6,5%)	58 (93,5%)	0,272
	N2	0 (0,0%)	8 (100,0%)	
	N3	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Infiltrado inflamatório	≤30%	4 (8,3%)	44 (91,7%)	1
	>30%	1 (5,0%)	19 (95,0%)	
GH	I ou II	3 (60,0%)	27 (39,7%)	0,396
	III	2 (40,0%)	41 (60,3%)	
GN	I ou II	4 (80,0%)	19 (27,9%)	0,032
	III	1 (20,0%)	49 (72,1%)	
Tipo histológico	Ductal	5 (100,0%)	63 (92,6%)	1
	Outros	0 (0,0%)	5 (7,4%)	
IVS	Presente	0 (0,0%)	15 (22,1%)	0,576
	Ausente	5 (100,0%)	53 (77,9%)	
IVL	Presente	1 (20,0%)	22 (32,8%)	1
	Ausente	4 (80,0%)	45 (67,2%)	
IPN	Presente	0 (0,0%)	18 (26,5%)	0,324
	Ausente	5 (100,0%)	50 (73,5%)	
Necrose	Presente	0 (0,0%)	27 (40,3%)	0,150
	Ausente	5 (100,0%)	40 (59,7%)	

* Ponto de corte ótimo para avaliação de SG foi determinado pelo método da maximização do log-rank.

Teste do qui-quadrado ou exato de Fisher foi empregado para avaliar associação entre as variáveis.

Anexo 6 – Curvas de Sobrevida da População Analisada no TMA.

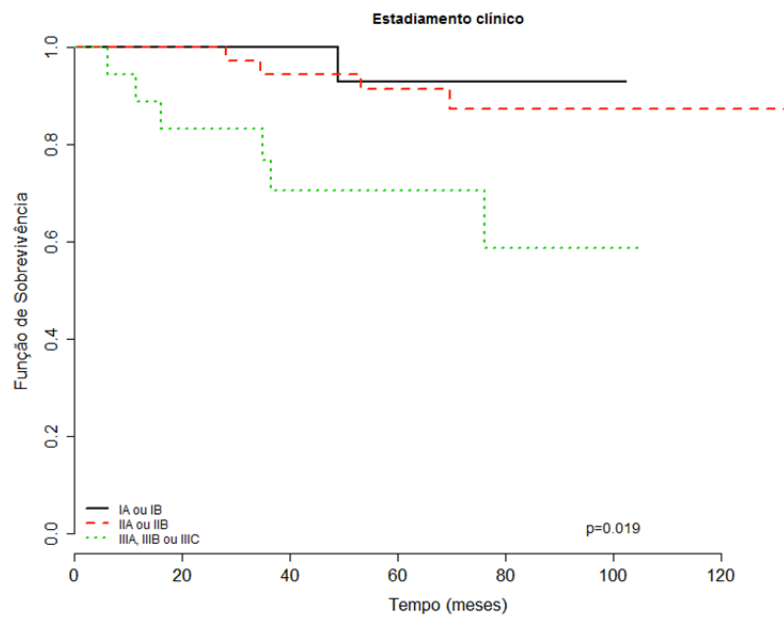


Figura A - Curvas de sobrevida global de acordo com a estadiamento clínico categorizado da população incluída no TMA. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

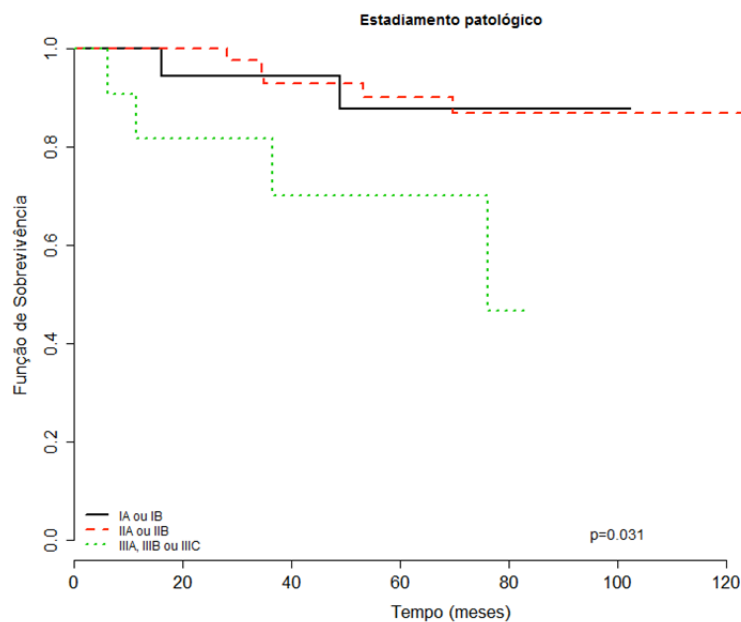


Figura B- Curvas de sobrevida global de acordo com a estadiamento patológico categorizado da população incluída no TMA. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

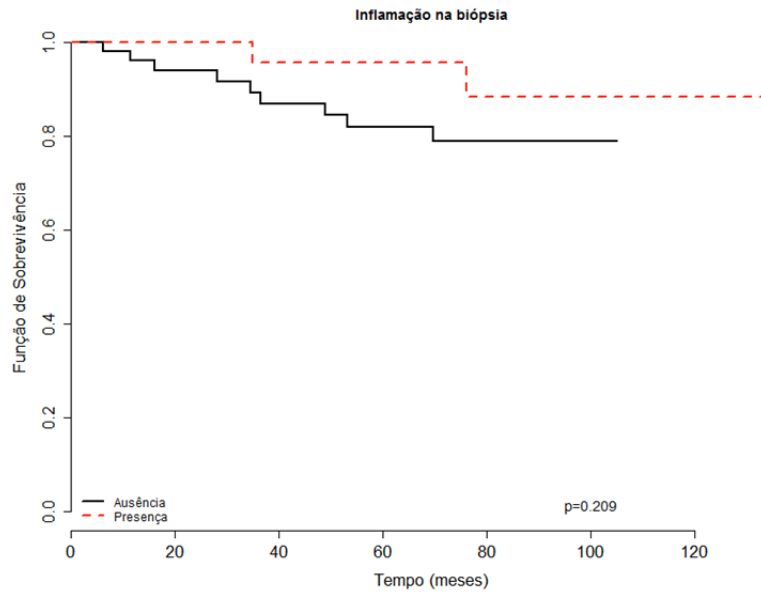


Figura C - Curvas de sobrevida global de acordo com a presença ou ausência de inflamação na biópsia da população incluída no TMA. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

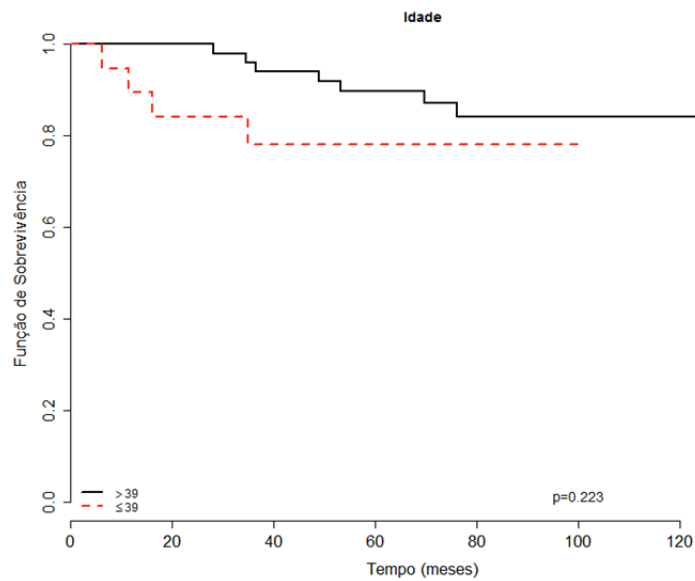


Figura D - Curvas de sobrevida global de acordo com o *cutt-of* encontrado para a idade ≤ 39 ou > 39 na população incluída no TMA. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

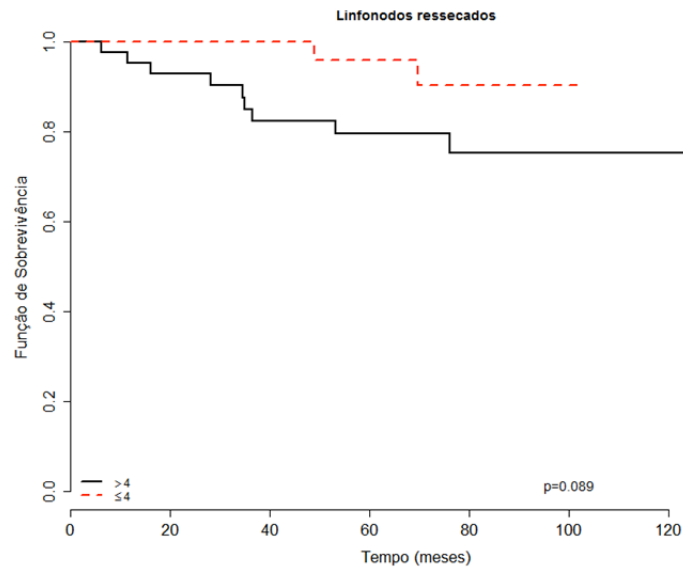


Figura E - Curvas de sobrevida global de acordo com o *cut-off* encontrado para linfonodos ressecados \leq ou > 4 linfonodos da população incluída no TMA (≤ 4 Linfonodos ressecados x > 4 linfonodos ressecados). As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

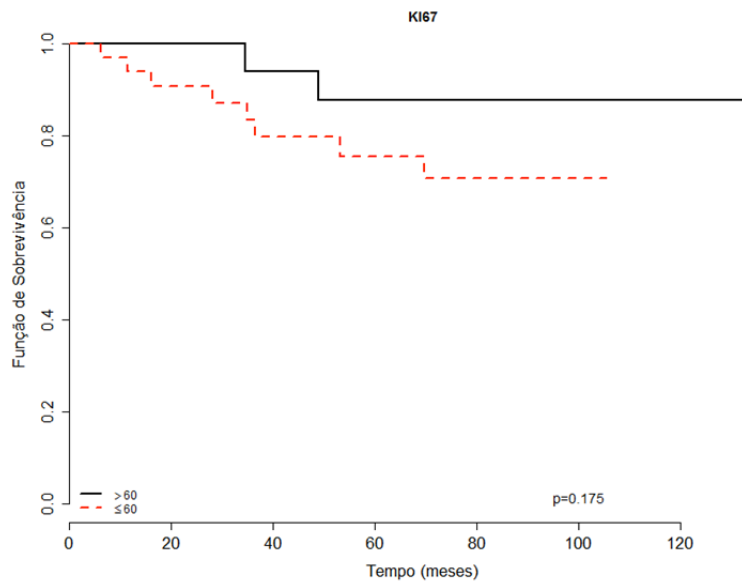


Figura F - Curvas de sobrevida global de acordo com o *cut-off* encontrado para Ki-67, \leq ou $> 60\%$ da população incluída no TMA (Ki-67 $>60\%$ x Ki-67 $\leq 60\%$). As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank. Os traços verticais nas curvas representam casos censurados.

Anexo 7 – Microfotografias Representativas das Lâminas Empregadas para Análise da Intensidade do Infiltrado Inflamatório e Imuno-Histoquímica

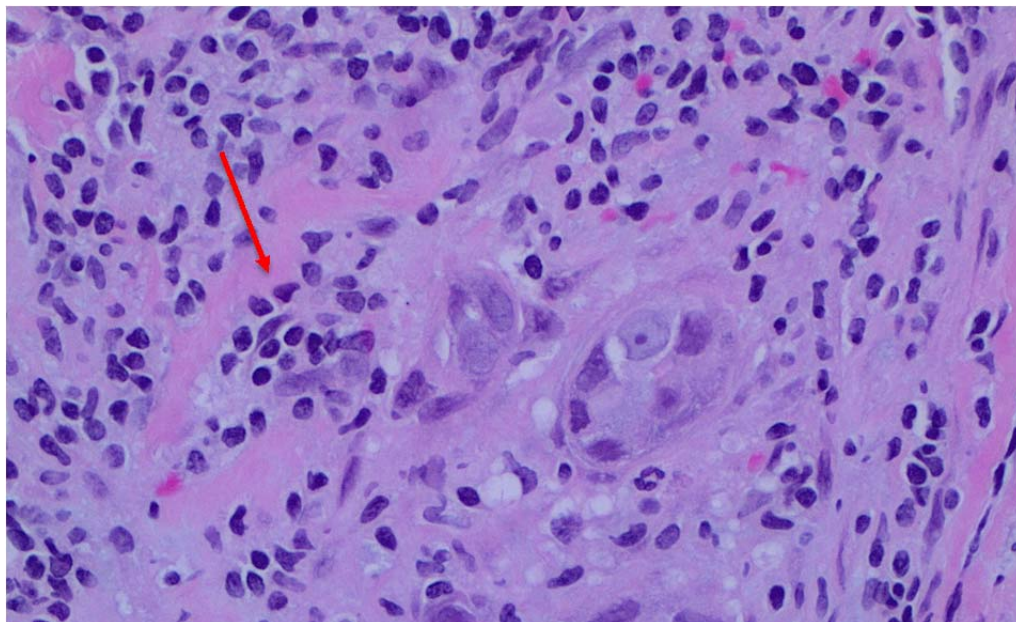


Figura 7.1 - Tumor mamário triplo-negativo, corado por H&E, com aumento de 400 vezes no microscópio ótico, demonstrando um infiltrado inflamatório estromal rico em linfócitos (seta).

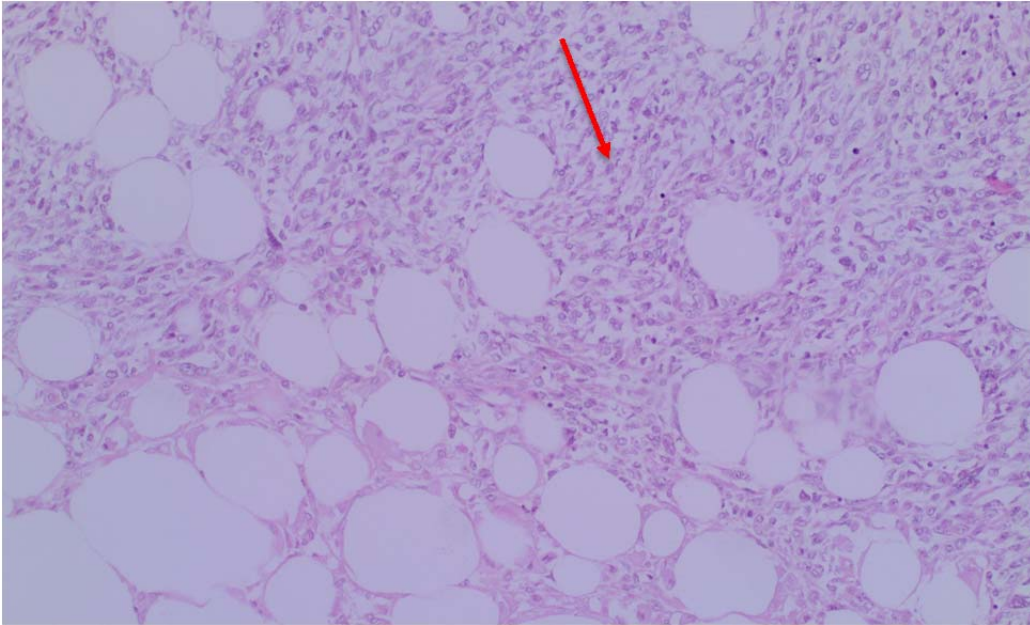


Figura 7.2 - Tumor mamário triplo-negativo, corado por H&E, com aumento de 400 vezes no microscópico ótico, demonstrando estroma tumoral sem infiltrado linfocitário (seta).

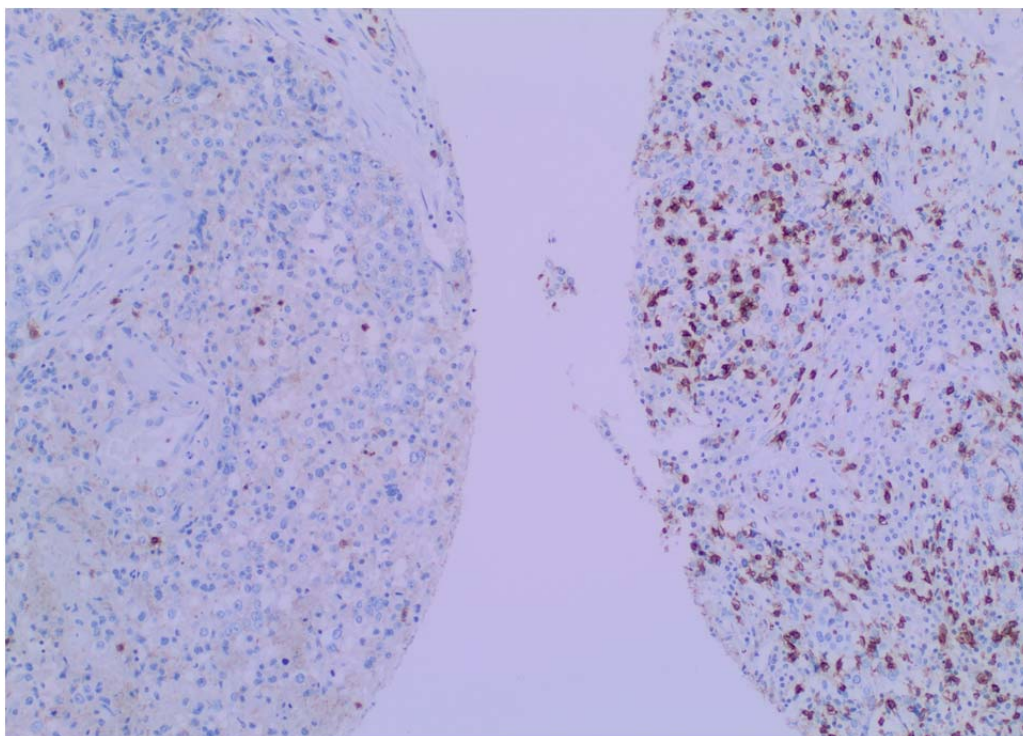


Figura 7.3 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para CD8 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 100 vezes no microscópio automático (APERIO). Comparativo entre uma amostra pobre em células marcadas para CD8 (à esquerda) com uma amostra rica em células CD8+ (à direita). As células positivas para o marcador avaliado estão coradas em marrom.

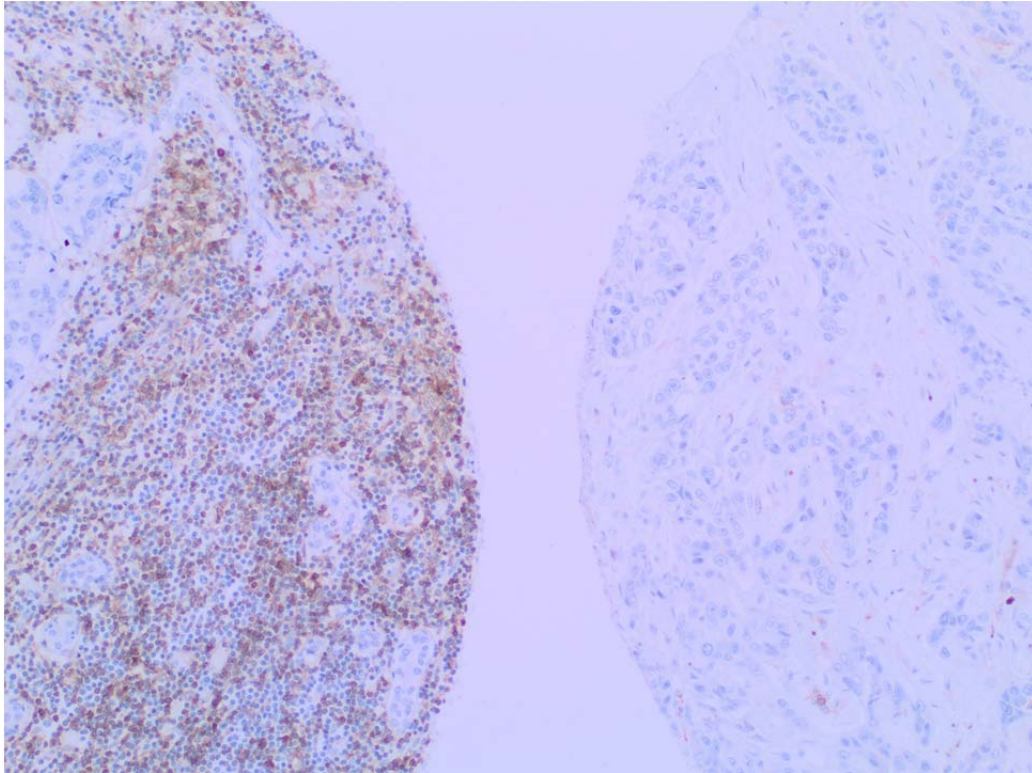


Figura 7.4 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para CD4 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 100 vezes no microscópio automático (APERIO). Comparativo entre uma amostra pobre em células marcadas para CD4 (à direita) com uma amostra rica em células CD4+ (à esquerda). As células positivas para o marcador avaliado estão coradas em marrom.

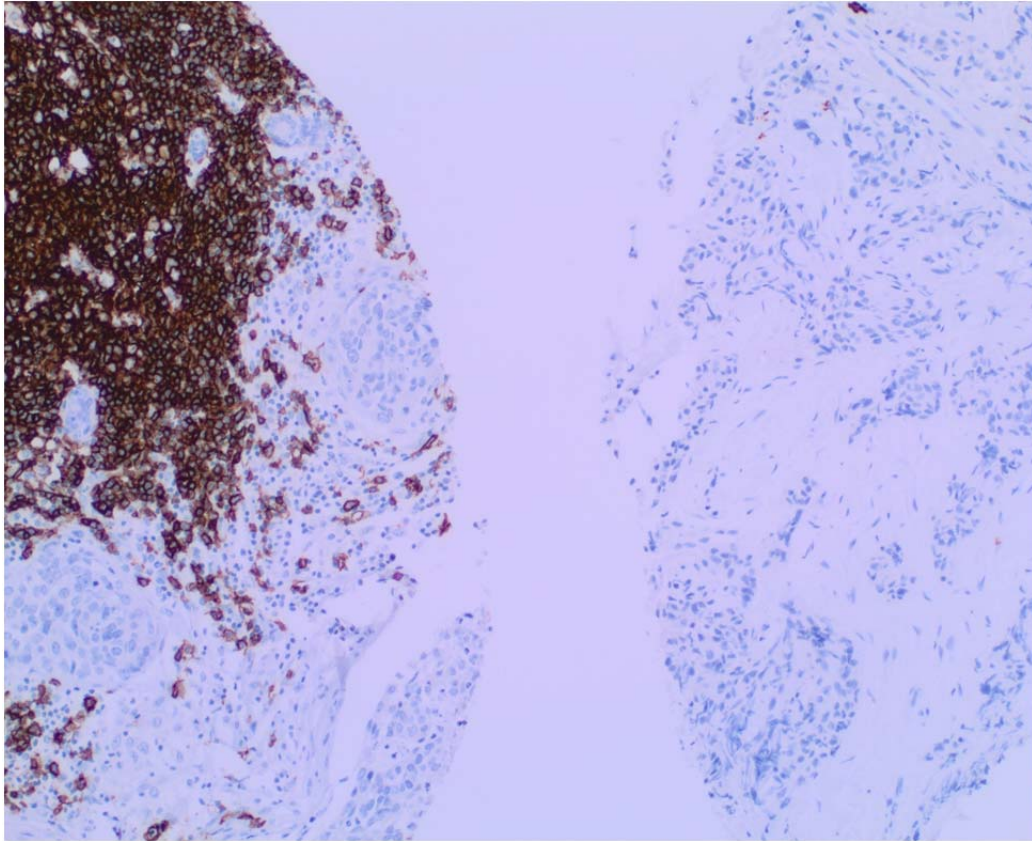


Figura 7.5 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para CD20 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 100 vezes no microscópio automático (APERIO). Comparativo entre uma amostra pobre em células marcadas para CD20 (à direita) com uma amostra rica em células CD20+ (à esquerda). As células positivas para o marcador avaliado estão coradas em marrom.

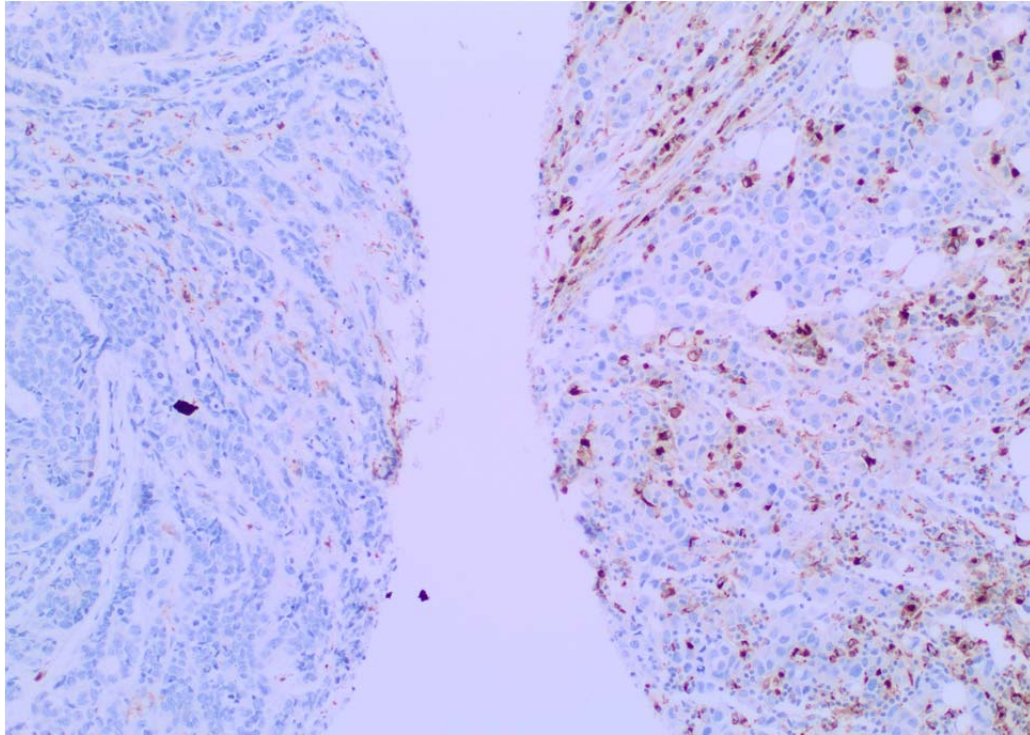


Figura 7.6 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para CD68 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 100 vezes no microscópio automático (APERIO). Comparativo entre uma amostra pobre em células marcadas para CD68 (à esquerda) com uma amostra rica em células CD68 (à direita). As células positivas para o marcador avaliado estão coradas em marrom.

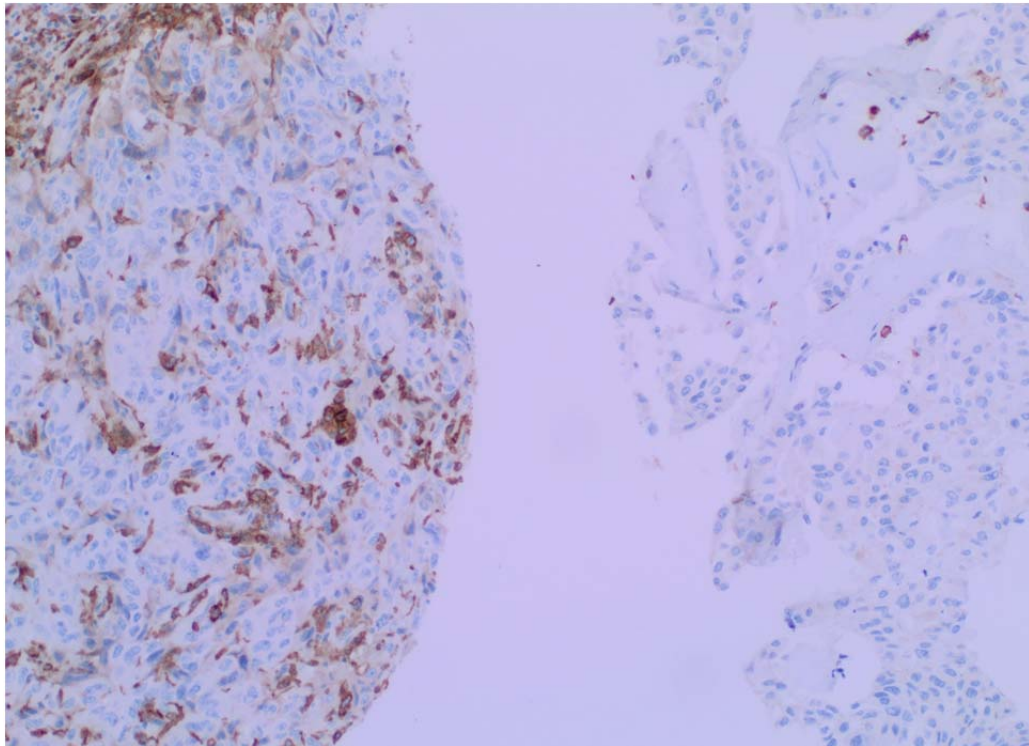


Figura 7.7 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para CD163 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 100 vezes no microscópio automático (APERIO). Comparativo entre uma amostra pobre em células marcadas para CD163 (à direita) com uma amostra rica em linfócitos CD163 (à esquerda). As células positivas para o marcador avaliado estão coradas em marrom.

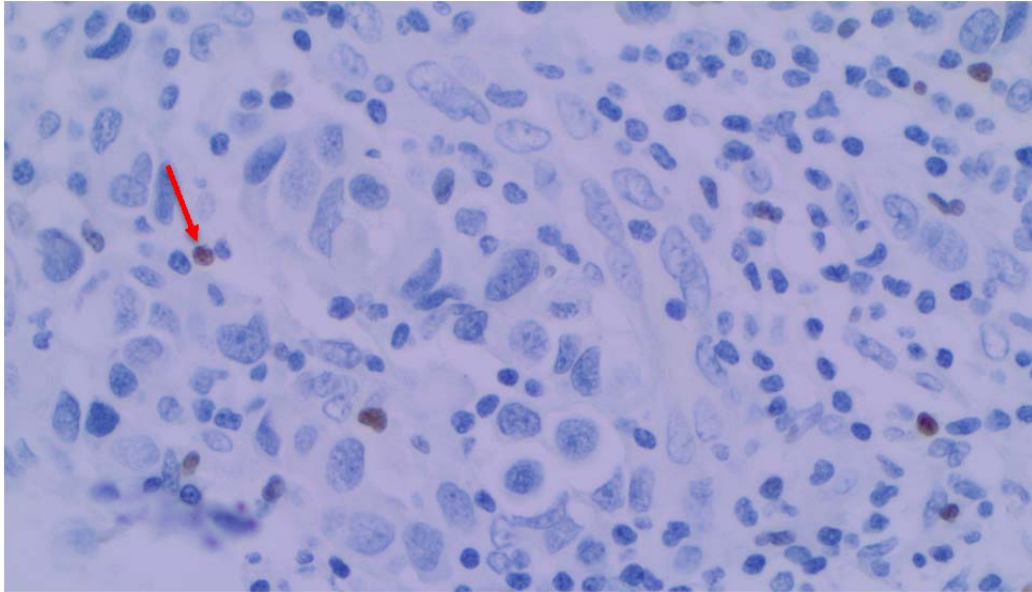


Figura 7.8 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para FOXP3 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 400 vezes no microscópio automático (APERIO). Caso com raras células marcadas para FOXP3 (seta).

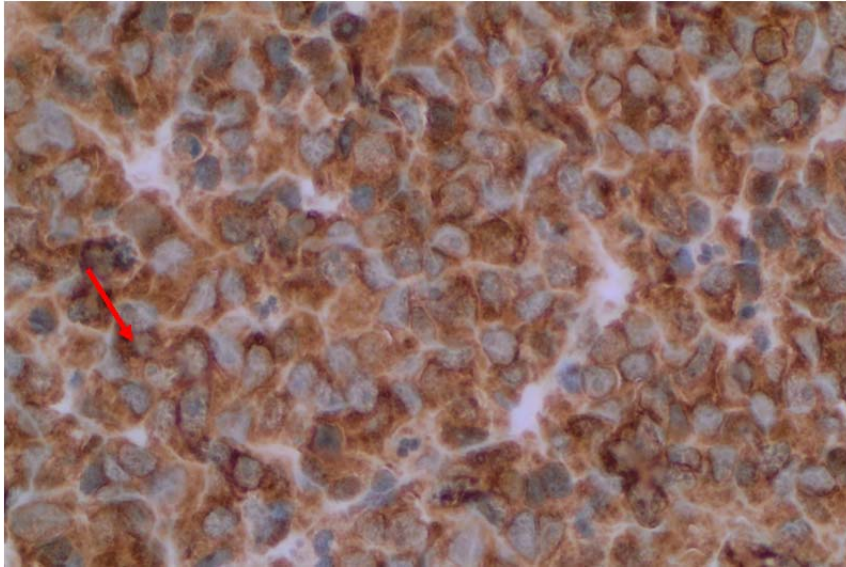


Figura 7.9 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para PTEN por imuno-histoquímica, visto com aumento de 400 vezes no microscópico automático (APERIO). Caso com marcação forte e difusa para presença de PTEN. As células positivas para o marcador avaliado estão coradas em marrom.

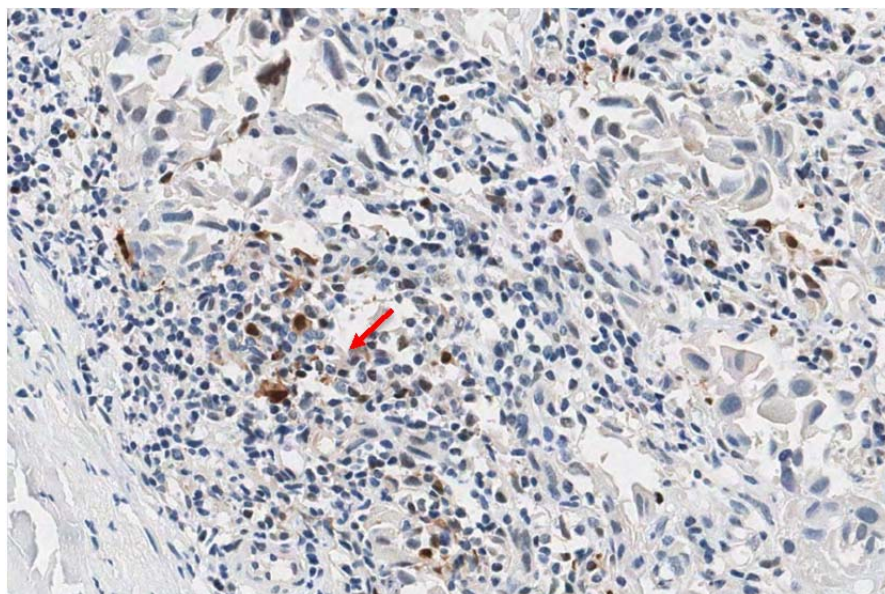


Figura 7.10 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para pSTAT1 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 200 vezes no microscópico automático (APERIO). Caso rico em células marcadas para pSTAT1 (seta).

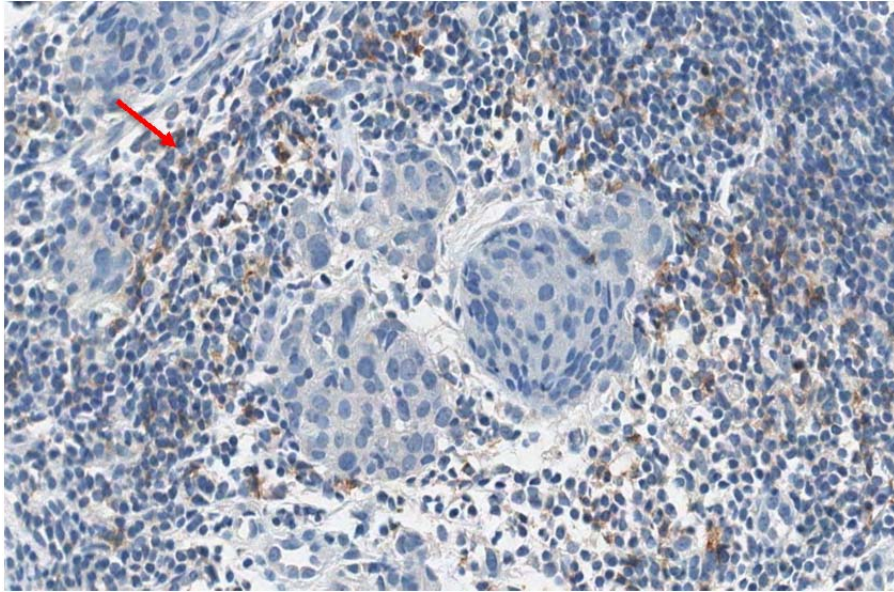


Figura 7.11 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para PD-1 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 100 vezes no microscópio automático (APERIO).

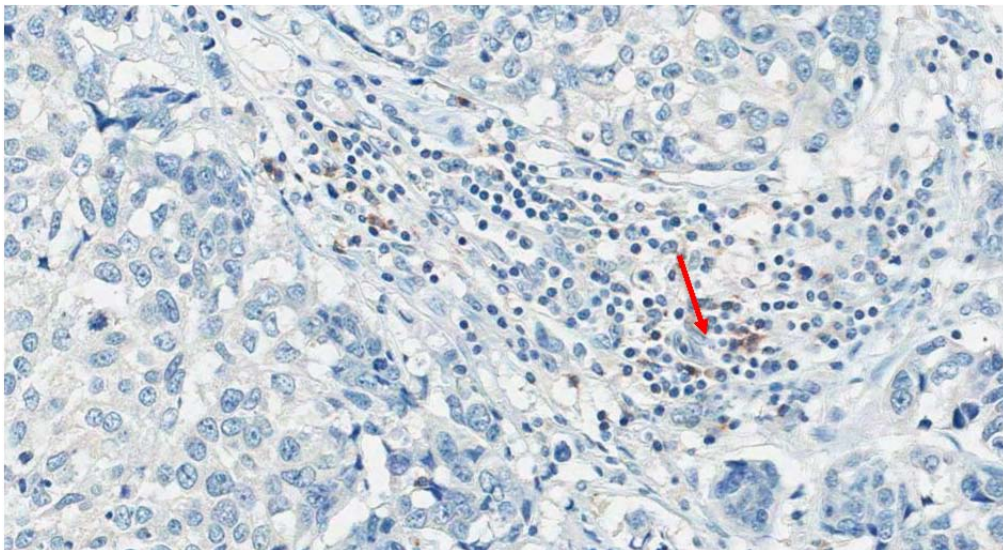


Figura 7.12 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para PD-1 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 100 vezes no microscópio automático (APERIO). Caso com raras células marcadas para PD-1 (seta).

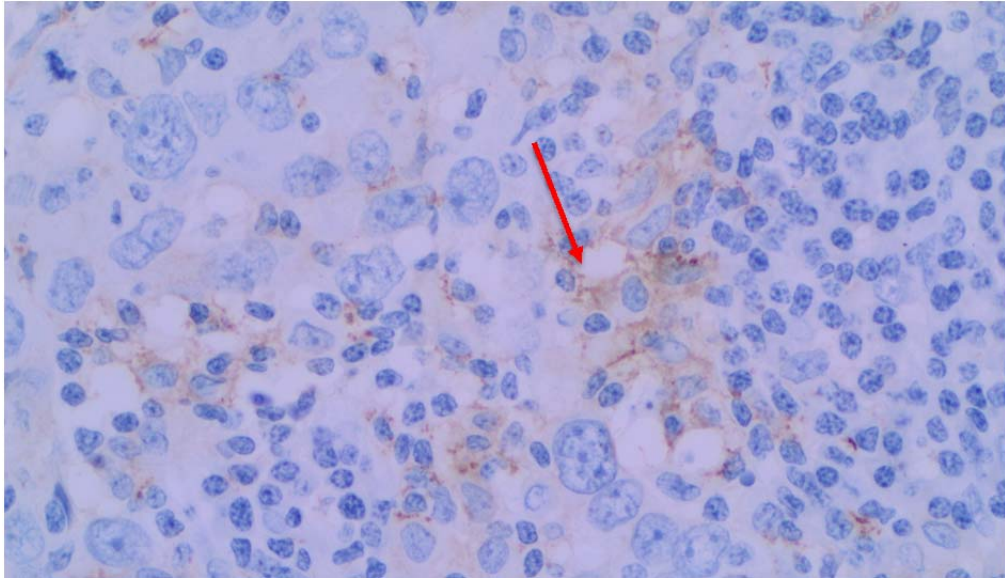


Figura 7.13 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para PD-L1 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 400 vezes no microscópio automático (APERIO). Caso com raras células marcadas para PD-L1 no estroma (seta).

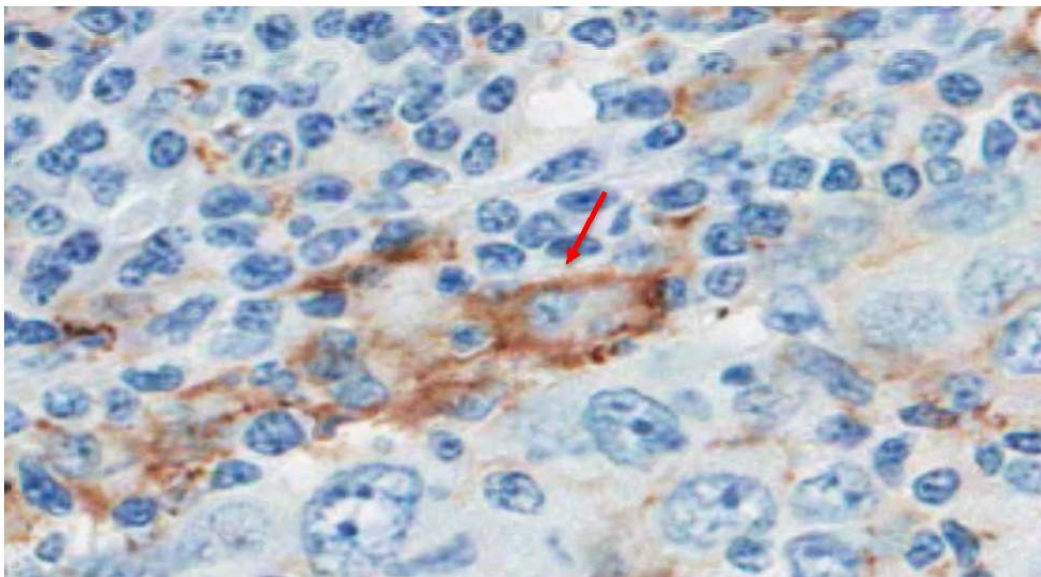


Figura 7.14 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para PD-L1 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 600 vezes no microscópio automático (APERIO). Caso com marcação PD-L1 no estroma (seta).

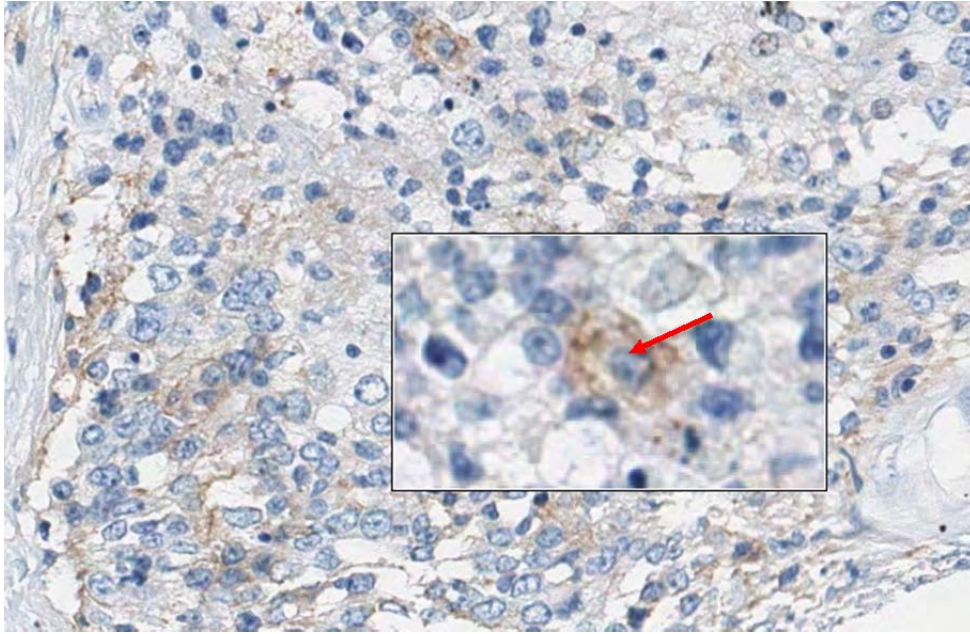


Figura 7.15 – Amostras de tumor mamário triplo-negativo submetido à marcação para PD-L1 por imuno-histoquímica, visto com aumento de 400 vezes (inserto) no microscópico ótico. Caso com marcação PD-L1 na célula tumoral (seta).

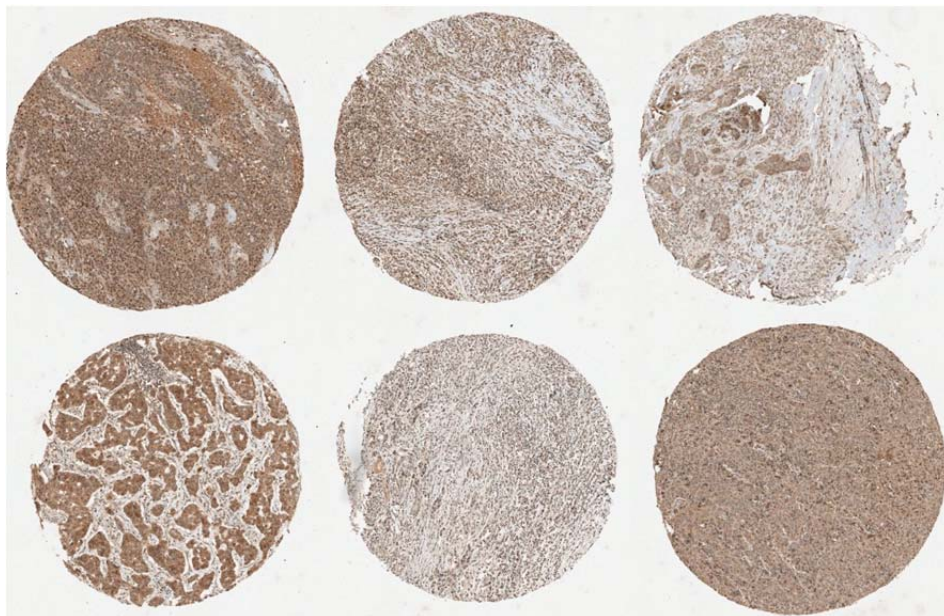


Figura 7.14 - Vista panorâmica do TMA. Marcação para PD-L2 por imuno-histoquímica. Observa-se marcação difusa, inespecífica, tanto das células tumorais quanto do estroma, com *background* considerável. Foram realizadas várias tentativas de modificar as condições da reação e concentração do anticorpo, sem melhora do resultado obtido.