



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Faculdade de Medicina**

MARIA DE FÁTIMA DIAS GAUI

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA EM CÂNCER DE  
MAMA TRIPLO NEGATIVO E SUA CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA AO  
TRATAMENTO NEO ADJUVANTE

Rio de Janeiro – RJ – Brasil

2023

Maria de Fátima Dias Gaudi

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA EM CÂNCER DE  
MAMA TRIPLO NEGATIVO E SUA CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA AO  
TRATAMENTO NEO ADJUVANTE

Volume 1

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Orientadores:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nathalie Henriques Silva Canedo

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Bonomo – Fiocruz

Rio de Janeiro – RJ – Brasil

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

D268a      Dias Gaudi, Maria de Fatima.

            Avaliação da presença de infiltração linfocitária em câncer de mama triplo negativo e sua correlação com a resposta ao tratamento neo adjuvante / Maria de Fátima Dias Gaudi. -- Rio de Janeiro, 2023.

            99 f.

            Orientadora: NathalieHenriques Silva Canedo.  
            Coorientadora: Adriana Bonomo.

            Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2023.

            1. câncer de mama triplo negativo. 2. infiltração linfocitária tumoral. 3. proteína de morte celular programada (PD1). I. Henriques Silva Canedo, Nathalie, orient. II. Bonomo, Adriana, coorient.

            III. Título.

Maria de Fátima Dias Gaudi

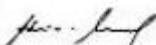
AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE INFILTRAÇÃO LINFOCITÁRIA EM CÂNCER DE  
MAMA TRIPLO NEGATIVO E SUA CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA AO  
TRATAMENTO NEO ADJUVANTE

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina, Área de Concentração em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito final para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

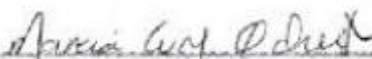
Aprovada em 30/03/2023



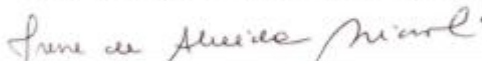
Dra. Nathalie Henriques Silva Canedo  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



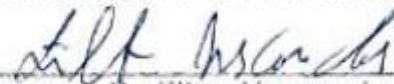
Dra. Adriana Bonomo  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ



Dra. Marcia Cury El-Cheikh  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



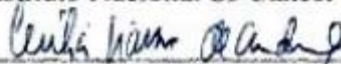
Dra. Irene de Almeida Biasoli  
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dr. Zilton Vasconcelos  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ



Dr. Gelcio Quintella Mendes  
Instituto Nacional do Cancer-INCA



Dra. Cecilia Vianna de Andrade  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

## DEDICATÓRIA

Aos meus mestres Jose Carlos de Moraes (in memoriam) e Wolmar Pulcheri, exemplos de competência e dedicação profissional, inspiração que guiaram meus passos em direção à vida acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Os mais sinceros agradecimentos

À Eduardo Gaudi, amigo e companheiro. Parceiro de todos os momentos.

Aos meus filhos Luis Eduardo e Tatiana Gaudi que me inspiraram com suas trajetórias acadêmicas, e em especial a minha filha e a meu genro, Daniel Carvalho, por suas contribuições no curso da elaboração deste trabalho.

Aos funcionários e novos amigos do serviço de Anatomia Patológica do HUCFF por seu precioso apoio.

Aos funcionários e amigos do Registro de Câncer, em especial Henrique Rodriguez que me acolheram no serviço e me disponibilizaram os dados clínicos, aonde tudo começou.

Aos meus orientadores Nathalie Canedo e Adriana Bonomo por todo o apoio recebido.

Aos meus pacientes, motivação de meus questionamentos e aprendizado.

## RESUMO

GAUI, Maria de Fátima Dias. Avaliação da presença de infiltração linfocitária em câncer de mama triplo negativo e sua correlação com a resposta ao tratamento neo adjuvante. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Medicina, Área de Concentração em Anatomia Patológica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A presença de infiltrados linfocitários tumorais (TILs) no câncer de mama triplo negativo (TNBC) tem importância preditiva à quimioterapia, podendo o tratamento quimioterápico estimular e alterar a composição dos TILs. Entretanto, dependendo de sua composição os TILs, podem ter um papel inibidor ou estimulador da progressão do tumor. Este é um estudo observacional de coorte retrospectiva. Foram analisados dados clínicos e patológicos de 38 pacientes com câncer de mama, subtipo triplo negativo, diagnosticados e tratados com quimioterapia neoadjuvante (QTNEO) no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, entre novembro de 2004 a novembro de 2018. Os objetivos deste estudo foram descrever e quantificar a composição de infiltrados linfocitários tumorais (TILs) na biópsia, identificar as mudanças no perfil imunológico (TILs) decorrentes da quimioterapia (peça cirúrgica) e correlacionar com os desfechos de resposta patológica completa (pCR) e sobrevida global (SG). Foram avaliados os infiltrados linfocitários tumorais estromais (sTILs) na Hematoxilina eosina (HE) usando as diretrizes do *International TILs Working Group* e sua composição imunofenotípica realizada por imuno-histoquímica (IHQ), observando a expressão de células imuno estimulantes como: CD3, CD4, CD8 e aumento de expressão de células imunossupressoras como FOXP3 e PD1. Como resultado, observamos alteração nas categorias de sTILs pré e pós-quimioterapia ( $p=0.016$ ). Cerca de 32% dos infiltrados linfocitários sTILs moderados se tornaram acentuados. Diferente dos resultados da literatura não encontramos associação entre sTILs pré-QTNEO e pCR ( $p=0.67$ ) e entre sTILs pré-QTNEO, sTILs pós-QTNEO e sobrevida global ( $p=0.92$  e  $p=0,17$  respectivamente). Entretanto, ao identificarmos as populações de células que compõem os sTILs e compararmos entre pré e pós-quimioterapia percebemos que existe uma ativação de células imuno estimulantes (CD3, CD8, Relação CD8/foxp3) e um decréscimo significativo ( $p=0.011$ ) de células imunossupressoras (Foxp3, Pd1) decorrentes da ação da quimioterapia. Apenas o PD1 (proteína de morte celular programada) pré-QTNEO se correlacionou de forma estatisticamente significativa com pCR, sugerindo este ser um possível biomarcador prognóstico de resposta à QTNEO.

**Palavras chaves:** Infiltração linfocitária tumoral, câncer de mama triplo negativo, Proteína de morte celular programada (PD1)



## ABSTRACT

GAUI, Maria de Fátima Dias. Avaliação da presença de infiltração linfocitária em câncer de mama triplo negativo e sua correlação com a resposta ao tratamento neoadjuvante. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Medicina, Área de Concentração em Anatomia Patológica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The presence of tumor lymphocytic infiltrates (TILs) in triple negative breast cancer has predictive importance for chemotherapy. The chemotherapy treatment can stimulate and change the composition of TILs. Depending on the subtype of TILs, this effect can be inhibitory or stimulatory for breast cancer progression. This is a retrospective observational cohort study. Clinical and pathological data of 38 patients with breast cancer, triple negative subtype (TNBC), diagnosed and treated with neoadjuvant chemotherapy (QTNEO) at the Clementino Fraga Filho University Hospital, between November 2004 and November 2018, were analyzed. The aim of this study was described and quantify the composition of tumor lymphocytic infiltrates (TILs), in the biopsy, before chemotherapy, to identify changes in the immunological pattern (TILs) resulting from chemotherapy (surgical specimen samples) and to correlate with the outcomes of pathological complete response (pCR) and overall survival (OS). Stromal tumor lymphocytic infiltrates (sTILs) were evaluated on routine hematoxylin and eosin (H&E) stained slides, standardized methodology based on the guidelines of the International TILs Working Group and their immunophenotypic composition performed by immunohistochemistry (IHC), observing the expression of immune cells subsets such as: CD3, CD4, CD8 and increased expression of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T (Treg) cells and PD-1(programmed cell death protein). CD8/foxp3 ratio was calculated. As a result, we observed changes in the categories of sTILs pre and post chemotherapy ( $p=0.016$ ). Around 32% of moderate sTILs become high TILs. Unlike the results in the literature, we found no association between pre-QTNEO sTILs and pCR ( $p=0.67$ ) and between pre-QTNEO sTILs, post-QTNEO sTILs and overall survival ( $p=0.92$  and  $p=0.17$  respectively). We observed an activation of immune cells subsets (CD3, CD8, CD8/foxp3 ratio) and a significant decrease ( $p=0.011$ ) of immunosuppressive cells (Foxp3, Pd1) resulting from the action of chemotherapy. Only pre-QTNEO PD1 (programmed cell death protein) was statistically significantly correlated with pCR, suggesting that PD1 could be a prognostic biomarker of response to QTNEO.

**Keywords: Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), triple negative Breast Cancer, Programmed cell death protein (PD1)**

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1-</b> Micrográficos representativos de variantes de TNBC de baixo e alto grau.                                                                                                                                                                                                                                                    | 25 |
| <b>Figura 2</b> - Classificações moleculares dos carcinomas de mama triplos negativos (técnica de <i>microarray</i> ) descritas por Lehmann et al 2011(A) e posteriormente por Burstein et al (2015).                                                                                                                                        | 26 |
| <b>Figura 3</b> - Distribuição de subtipos moleculares intrínsecos nos tumores triplo negativos e basais classificados por critérios patológicos.                                                                                                                                                                                            | 27 |
| <b>Figura 4</b> - Representação da teoria de resposta imune tumoral. Fases de eliminação, equilíbrio e escape com seus microambientes respectivos.                                                                                                                                                                                           | 35 |
| <b>Figura 5</b> – Curva de sobrevida em função de tempo (meses). Comparação da sobrevida global de 38 pacientes (A) com a sobrevida global dos pacientes que obtiveram resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante ( pCR ausencia de tumor residual na mama e linfonodo ypT0N0M0) (B), utilizando o metodo de Kaplan-Meier. | 47 |
| <b>Figura 6</b> - Ilustração de quantificação de sTILs no HE em biópsia                                                                                                                                                                                                                                                                      | 49 |
| <b>Figura 7</b> - Associação de densidade de sTILs na biópsia (pré-quimioterapia) e sobrevida global. Curvas comparativas de sobrevida global entre os pacientes que apresentavam na biópsia pré-quimioterapia densidades diferentes de sTILs.                                                                                               | 51 |
| <b>Figura 8</b> - Associação de densidades (leve, moderado e acentuado) de sTILs na peça cirúrgica (pós-quimioterapia) e sobrevida global. Utilizando o método estatístico de Kaplan-Meier.                                                                                                                                                  | 52 |
| <b>Figura 9 A</b> - Fotografia de corte histológico com imuno marcação positiva para CD3.                                                                                                                                                                                                                                                    | 53 |
| <b>Figura 9 B</b> – Fotografia de Corte histológico com imunomarcação para CD4.                                                                                                                                                                                                                                                              | 54 |
| <b>Figura 9C</b> – Fotografia de Corte histológico com imunomarcação para CD4.                                                                                                                                                                                                                                                               | 54 |
| <b>Figura 9D</b> – Fotografias de Corte histológico com imunomarcação para FOXP3.                                                                                                                                                                                                                                                            | 56 |
| <b>Figura 9E</b> – Fotografias de imuno-histoquímicas com imuno marcação positivas para PD1.                                                                                                                                                                                                                                                 | 57 |
| <b>Figura 10</b> – Diagrama de barras comparando as médias de mononucleares imunopositivos contáveis em amostras de biópsias pré (em azul) e pós-quimioterapia neoadjuvante (em vermelho).                                                                                                                                                   | 59 |
| <b>Figura 11</b> – Diagrama de caixas comparando as medianas de imunofenótipos em amostras de biópsias pré e pós-quimioterapia: CD3, CD8, CD4, FOXP3 e PD1.                                                                                                                                                                                  | 60 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 12 A</b> - Correlação de mediana de células imunomarcadas por anticorpo anti-pd1 em amostras de biópsias pré e a obtenção de pCR utilizando o diagrama de caixas. ....                                                                               | 62 |
| <b>Figura 12 B</b> - T-Teste para avaliação de imunofenotipos em amostras independentes de biopsia pré e pós e a obtenção de pCR .....                                                                                                                         | 61 |
| <b>Figura 13</b> - Comparação da sobrevida (dias) de pacientes que apresentaram recidiva e os que não apresentaram recidiva. Abreviações: sim (em vermelho): pacientes que apresentaram recidiva; não (em preto): pacientes que não apresentaram recidiva..... | 64 |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Protocolos de quimio e imunoterapia neoadjuvante em câncer de mama triplo negativos: Impacto da adição de inibidores de *checkpoint* nos protocolos de quimioterapia neoadjuvante em TNBC.....31

**Tabela 2** - Recomendações do grupo internacional de patologistas (International TILs Working Group) para avaliação de infiltrados tumorais linfocitários (TILs) em câncer de mama. ....36

**Tabela 3** - Características clínicas e patológicas de 38 pacientes com TNBC. ....46

**Tabela 4** - Proporção de densidades de sTILs (leve, moderado e acentuado) na biópsia (pré) e na peça cirúrgica (pós-quimioterapia), obtidos por Teste de Kappa.....48

**Tabela 5** - Associação de densidade (leve, moderado e acentuado) de sTILs e faixas etárias, agrupada por 3 faixas etárias: menor que 50 anos, entre 50 anos e 70 anos e maior que 70 anos. ....50

**Tabela 6** - Associação entre densidade de sTILs pré-quimioterapia (biópsia) e resposta patológica completa. Associação entre densidade de sTILs pré-quimioterapia neoadjuvante (biópsia) e resposta. ....51

**Tabela 7** - Média de mononucleares marcados com anticorpo anti CD3 em densidades de sTILs: leve, moderado e acentuado em biópsias pré-quimioterapia.....58

**Tabela 8** – Tabela descritiva de variáveis analisadas ( idade por faixa, densidade de TIL.preQT e composição de sTILs) e sua associação com o desfecho de resposta patológica completa. Associação de pCR com óbito e recidiva do câncer. ....63

**Tabela 9** - Descrição dos sítios de metástases mais frequentes nos 38 pacientes incluídos. Estatística descritiva dos locais de metástases descritos ao longo do seguimento ( tempo de acompanhamento). ....64

**Tabela 10** - Correlação entre sítios de metástases hepáticas e composição dos infiltrados linfocitários estromais (sTILs) .....65

**Tabela 11** - Correlação entre sítios de metástases pulmonares e composição dos infiltrados linfocitários estromais (sTILs) .....65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC carcinoma de células acinares

adCC - Adenoide cístico

ADPribose - Inibidores de polimerase

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

AME - Adenomioepitelioma

AMGA - adenose atípica microglandular

APC - Célula apresentadora de antígenos

ASCO - *American Society of Clinical Oncology*

BL1 e BL2 TN - Basais

BLIA TN - *Basal-like immuno* ativado

BLIS TN - *Basal-like* imunossuprimido

BRCA1/2- *Breast cancer 1/2gene*

BRCAness- alteração similar a deficiência homloga do BRCA

BTLA- *B and T lymphocyte attenuator*

CAP - *College of American Pathologists*

CCA - Carcinoma de células acinares

CDI - Carcinoma ductal infiltrante

CD3 - linfócitos totais

CD4 - linfócitos auxiliares

CD8 - linfócito citotóxico

CDI SOE - Carcinoma ductal sem outra especificação

Cerb-2- proteína de membrana celular produto do *HER2*

CLI - Carcinoma lobular infiltrante

CTLA-4 - *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*

*EGFR* – Gene codificador dos Receptores de fatores de crescimento epidérmicos

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

FOXP3 - *Forkhead boxP3*

GATA3- Fator de transcrição de ação “trans” específico de células T

GEP - *Whole-genome gene-expression profiling*

GNS - Next Generation sequencing

HE- Hematxilina eosina

HER2- proteína *Epidermal growth factor receptor-type2*

*HER2*- Gene codificador do receptor de fator de crescimento epidérmico 2

HER2 positivo- subtipo com HER2 superexpresso ou com amplificação do gene *HER2*

HER2-e - HER2 enriquecido ( HER2 com RH negativos)

HRD – Deficiência de recombinação homóloga do DNA

IGF- fator de crescimento insulínico

IHQ - Imuno-histoquímica

INPP4B- gene *Inositol polyphosphatase-4-phosphatase type II*

iTILS - Infiltrados linfocitários intratumorais

JAK/STAT- *Janus tyrosine kinase/ signal transducer and activator of transcription*

LAG-3 - *Lymphocyte activation gene-3*

LAR - TN Luminal

MBCs - Carcinomas metaplásicos

MDSCs - Células supressoras derivadas de mielóides

MEC - Carcinoma polimorfo, mucoepidérmoide

MES - TN mesenquimal

MGA - Adenose microglandular

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

miRNA - Micro RNA

NK - *Natural killer*

PARP- Enzima poli(ADP-ribose) polimerase

pCR - Resposta patológica completa

PD1 - Proteína de morte celular programada (*programmed cell death protein*)

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

*PDGFR*- gene codificador do PDGF

PDL1 - Ligante de morte celular programada 1 (*programmed death-ligand 1*)

PI3K- proteína fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato3 quinase.

*PIK3CA*- gene codificador da proteína PI3K

PRE QT- antes de quimioterapia

PÓS QT- Após a quimioterapia

*PTEN* – gene codificador da proteína homóloga de fosfatase e tensina

QTNEO - Quimioterapia neoadjuvante

*RB1* -gene do retinoblastoma

RE - Receptor de estrogênio

RH - Receptores hormonais

RP - Receptor de progesterona

SEER- *The Surveillance, Epidemiology, and End Results*

S/I - Sem informação

SG - Sobrevida Global

SLD - Sobrevida livre de doença

SLP - Sobrevida livre de progressão

sTILs - Infiltrados linfocitários estromais

TCR - *T cell receptor*

TIGIT- *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*

TIL<sup>H</sup> - Infiltrados linfocitários altos ou acentuados

TILs - Infiltrados linfocitários

TIM-3 - *T-cell immunoglobulin mucin-3*

TME - Microambiente tumoral

TNBC - Câncer de mama triplo negativo

TNM T- Extensão do tumor primário. N - Ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais. M - Ausência ou presença de metástase à distância

P53- proteína de tumor codificada pelo gene p53(guardião do genoma)

TP53- gene codificador da proteína P53

Treg - Linfócitos T regulatórios

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa;

Anexo 2 - Metodologia utilizada na identificação dos componentes de sTILs por imuno-histoquímica;

Anexo 3 - Artigo publicado;

Anexo 4 – Artigo submetido à publicação

## SUMÁRIO

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                               | <b>18</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                                    | <b>20</b> |
| 2.1. EPIDEMIOLOGIA.....                                                                                  | 20        |
| 2.2. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DO CÂNCER DE MAMA.....                                           | 20        |
| 2.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA.....                                                  | 22        |
| 2.4. CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO .....                                                                | 23        |
| 2.5. TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO (TNBC) .....                                           | 28        |
| 2.7. ANÁLISE DE PD-L1 E PD-1 .....                                                                       | 38        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>                                                                                | <b>41</b> |
| 3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....                                                                              | 41        |
| 3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....                                                                           | 41        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                                      | <b>42</b> |
| 4.1. TIPO DE ESTUDO .....                                                                                | 42        |
| 4.1.1. Critérios de inclusão .....                                                                       | 42        |
| 4.1.2. Critérios de exclusão .....                                                                       | 42        |
| 4.1.3. Avaliação de pacientes .....                                                                      | 42        |
| 4.1.4. Avaliação de amostras .....                                                                       | 43        |
| 4.1.5. Definições.....                                                                                   | 44        |
| 4.1.6. Análise estatística .....                                                                         | 45        |
| 4.2 COMITÊ DE ÉTICA.....                                                                                 | 45        |
| <b>5. RESULTADOS OBTIDOS.....</b>                                                                        | <b>46</b> |
| 5.2 ANÁLISES DE STILS .....                                                                              | 47        |
| 5.3 ANÁLISES DE DENSIDADE DE STILS E DESFECHOS .....                                                     | 50        |
| 5.4 ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DOS STILS .....                                                              | 52        |
| 5.5 IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS DE METÁSTASES .....                                                          | 63        |
| <b>6. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                | <b>66</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                 | <b>71</b> |
| <b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                      | <b>72</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                               | <b>73</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                      | <b>84</b> |
| ANEXO 1- COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....                                                                 | 84        |
| ANEXO 2 – METODOLOGIA UTILIZADA NA IDENTIFICAÇÃO DOS<br>COMPONENTES DE STILS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 86        |
| ANEXO 3- ARTIGO PUBLICADO .....                                                                          | 87        |
| ANEXO 4: ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO .....                                                             | 90        |

## 1. INTRODUÇÃO

A importância do microambiente tumoral (TME) e sua implicação prognóstica no comportamento de diversas neoplasias vem sendo tema bastante discutido na literatura (GALON et al 2006). O TME é formado por células endoteliais, adipócitos, fibroblastos, células do sistema imune e substâncias solúveis liberadas por estas células. Embora o câncer de mama não seja tipicamente uma doença imunogênica, infiltrados imunes, constituídos por células da resposta imune inata e adaptativa, podem ser detectados e caracterizados em amostras de tecidos tumorais principalmente nos subtipos de câncer de mama com amplificação do gene ERBB2 (HER2 superexpresso) e no triplo negativo (TNBC). Os infiltrados imunes são detectáveis em até 75% dos TNBC, onde aproximadamente 20% dos tumores apresentam um infiltrado particularmente denso. Os subtipos luminais apresentam menor intensidade destes infiltrados (STANTON et al 2016).

O Infiltrado linfocitário tumoral (TILs) representa a maioria dos infiltrados imunes no microambiente do tumor da mama. Existem evidências crescentes em relação aos valores prognósticos de TILs se correlacionando com sobrevida principalmente em câncer de mama TNBC e HER2. Estudos randomizados que comparavam protocolos de tratamento neoadjuvante em tumores HER2 e TNBC, demonstraram a correlação de TILs em biópsias com melhor resposta patológica (ADAMS et al, 2014). Desta forma, os TILs tem se mostrado um biomarcador para resposta ao tratamento de quimioterapia e consequentemente de sobrevida. (SALGADO et al, 2015). Recentemente, especialistas da 16ª Conferência Internacional de Câncer de Mama de St. Gallen endossaram a importância da inclusão rotineira de sTILs na análise prognóstica dos tumores de mama triplo-negativos e recomendam a incorporação do TILs como biomarcador no estadiamento do TNM na 8th edição da American Joint Committee on Cancer (AJCC) (BURSTEIN et al, 2019).

A população celular mais abundante em TILs é de linfócitos T (75%). Entretanto, dependendo da composição destes linfócitos, supressores ou reguladores, o prognóstico do câncer de mama pode variar (MAHMOUD et al, 2011).

As ações de quimioterápicos como estimuladores da resposta imune tem sido descrita por vários autores (BRACCI et al, 2014). Sua atuação pode ser consequente da morte celular com liberação de vários antígenos e recrutamento de células T citotóxicas ao leito tumoral ou modulação direta o microambiente tumoral (SCHIAVONI et al, 2011)

A proposta deste estudo foi analisar e quantificar o TILs de biópsias pré-operatória e peças cirúrgicas (pós-operatória), observando o efeito da quimioterapia neoadjuvante na intensidade de TILs e sua composição, correlacionando estes achados com os desfechos de resposta patológica completa e sobrevida global nas pacientes com TNBC submetidas a QTNEO no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho entre novembro de 2004 a novembro de 2018.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. EPIDEMIOLOGIA

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais incidente no mundo e a primeira entre as mulheres (SUNG et al, 2021). No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste. Para o ano de 2022 foram estimados 66.280 casos novos, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

A mortalidade do câncer de mama vem diminuindo em países desenvolvidos em decorrência do aumento do rastreamento, diagnóstico precoce, tratamento adjuvante e aumento de sobrevida na doença metastática (JEMAL et al, 2011). Dados estatísticos americanos do SEER (*The Surveillance, Epidemiology, and End Results*) estimam para 2022, 43.250 óbitos por câncer de mama, 19,6 óbitos por 100,000 mulheres/ano (National Cancer Institute, 2022). Entretanto no Brasil, a taxa de mortalidade por câncer de mama ajustada pela população apresenta uma curva ascendente. O Câncer de mama é a primeira causa de morte por neoplasia na população feminina brasileira. A taxa de mortalidade por câncer de mama foi de 11,84 óbitos/100.000 mulheres em 2020, ajustada por idade pela população mundial. As maiores taxas ocorreram nas regiões Sudeste e Sul, com 12,64 e 12,79 óbitos/100.000 mulheres, respectivamente (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2021).

### 2.2. CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DO CÂNCER DE MAMA

Existem diversos tipos histopatológicos de câncer de mama que diferem na sua aparência microscópica, macroscópica e comportamento biológico. O carcinoma ductal infiltrante (CDI) é o tipo mais frequente, acometendo 70 a 80% dos tumores, denominado sem outra especificação ou puro, quando não apresentam alguma característica ou padrão específico como mucinoso, papilar, tubular, medular e outros. Para que seja classificado como CDI deve ter pelo menos de 50% de CDI, caso contrário, será denominado carcinoma misto (SINN; KREIPE 2013). Mais recentemente a recomendação da OMS é de que só é considerado puro se tiver mais de 90% de CDI (PUAY et al. 2020). devendo ser mencionado o percentual de cada componente. Histologicamente, apresentam-se com células epiteliais coesas, com atipia variável, com tendência à formação de espaços ductais em meio a estroma com desmoplasias e

infiltrado linfoide. Na macroscopia apresentam frequentemente contornos espiculados, circunscritos e mais raramente difusos. O carcinoma lobular infiltrante (CLI) é o segundo subtipo histológico em frequência (8% a 15%). A forma clássica se caracteriza por baixa celularidade, baixo grau citológico, células pouco coesas e distribuídas em arranjos lineares e concêntricos ao redor de ductos e lóbulos. A perda de coesão está relacionada a perda da expressão do gene da molécula de adesão e-caderina (WILSON et al, 2020). Na macroscopia tem um padrão de infiltração insidiosa, sem definição de massa, com tendência a multicentricidade. O CLI é o tipo histológico com maiores taxas de multicentricidade e bilateralidade (10 a 20%) (DU TOIT et al, 1989). Subtipos mais raros e de melhor prognóstico podem se apresentar isolados ou associados ao CDI (misto), como carcinoma mucinoso ou colóide, tubular, cribriforme e medular. Outros subtipos ainda mais raros são os carcinomas papilíferos, secretor, adenoides císticos, micro papilar invasivo, tumores neuroendócrinos e carcinomas metaplásicos (ROBBINS, 2018).

O câncer de mama é uma entidade heterogênea tanto em sua apresentação clínica quanto em seu comportamento biológico. O seu prognóstico depende de diversos fatores clínicos e anatomopatológicos. Alguns fatores clínicos como idade e etnia, dificilmente são considerados variáveis independentes, geralmente se correlacionam com outros fatores moleculares e sociais. A extensão de doença é indubitavelmente um fator prognóstico. O TNM é um sistema internacional de padronização dos tumores, que foi criado com o objetivo de avaliar a extensão da neoplasia. Descreve o tamanho tumoral e o comprometimento local (T), o acometimento dos linfonodos (N) e de órgãos distantes (M). Revisões sistemáticas são realizadas tendo como base o TNM. A última revisão em câncer de mama realizada em janeiro de 2018 pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), em sua 8ª edição, incorporou características biológicas e imuno-histoquímicas, além dos dados de extensão, possibilitando uma maior correlação com a sobrevida destes pacientes (AMIN et al, 2018).

As diversidades anatomopatológicas isoladamente não são suficientes para diferenciar o comportamento e a resposta terapêutica das neoplasias de mama. A análise molecular, utilizando a tecnologia de *microarray*, permitiu a identificação de cluster de genes relacionados a expressão de receptores de estrogênio (ER), receptores de fatores de crescimento epidérmico 2 (HER2), e a um único cluster de células basais, propiciando a classificação de subtipos moleculares intrínsecos. Perou e colaboradores (PEROU et al, 2000) classificaram os tumores de mama em 5 subtipos conforme seu padrão de expressão gênica: luminal A, luminal B, superexpressor de HER-2, basaloide e *normal like*, e que posteriormente tiveram demonstradas

suas correlações com diferentes prognósticos (SØRLIE et al, 2003) ( SOTIRIOU et al 2003). O subtipo *normal like* não se consolidou exatamente como um subtipo molecular, mas sim por uma contaminação de epitélio mamário normal (PARKER et al, 2009; WEIGELT et al, 2010). Posteriormente outros autores utilizando *microarrays*, qRT-PCR (PERREARD et al, 2006) e pan citoqueratinas sugeriram novas classificações e descreveram outros subtipos como *null cell* (ABD EL-REHIM et al, 2004) e *claudin low* (PRAT et al, 2010).

### 2.3. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

A identificação dos subtipos moleculares é fundamental para a compreensão prognóstica e racionalização da terapêutica. Os tumores luminais A representam 40% dos tumores, com alta expressão de genes relacionados a RE, baixa proliferação e expressão de genes *HER2*, conferindo um bom prognóstico. Os luminais B (20%) representam uma baixa expressão de genes ER, variável expressão de cluster *HER2* e alta expressão de genes de alta proliferação, conferindo um pior prognóstico do que os luminais A. O subtipo *HER2* enriquecido (anteriormente *HER2*-positivo/*ER*-negativo) representa cerca de 10 a 15 % dos tumores, caracterizados por alta expressão de *HER2* e genes de alta proliferação, com baixa expressão de cluster luminais e basais. Cheang e colaboradores (CHEANG et al, 2015), utilizando a técnica de RT-qPCR, demonstraram que de 127 tumores *HER2*-positivos com RE>10%, somente 69 (54%) eram *HER2* amplificados e 43% eram luminais (39 luminal B, 16 luminal A). Bertucci et al (2004) identificaram um grupo de 19 genes que caracterizam o fenótipo *HER2*. Entre estes, está o próprio *HER-2* e mais cinco genes vizinhos localizados no cromossoma 17 e 8, relacionados a perda da expressão do RE alfa, fato que poderia justificar a resistência destes tumores a hormonioterapia.

*The Cancer Genome Atlas Network*, utilizando plataformas de *microarrays* e *next generation sequencing* (GNS), identificou e relatou mutações de DNA, metilações e padrões de micro RNA (miRNA) de aproximadamente 800 espécimes de subtipos moleculares de neoplasias de mama. Os subtipos *HER2* enriquecido (*HER2-e*) e o basalóide apresentaram altas taxas de mutação de gene *TP53* (72% a 80%). Os tumores Luminais A, luminais B e *HER2-e* apresentaram mutações do gene *PIK3CA* em 45%, 29%, e 39%, respectivamente, enquanto o basal like raramente (9%). Fenômenos de hipermetilação e silenciamento de genes foram descritos em genes responsáveis pelo ciclo celular (p16INK4a), receptores de esteroides (ESR1,

PGR e RARB) e outros. Estas alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem no câncer de mama afetam as assinaturas e contribuem para diferentes comportamentos do tumor.

## 2.4. CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

Conceitualmente denominamos de carcinomas triplo negativos (TNBC) os tumores de mama com ausência de expressão de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (PR) e ausência da hiperexpressão de proteína *cerb2* ou amplificação do gene *HER2*. De acordo com os critérios da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e Colégio Americano de Patologia (*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists* (ASCO/CAP) são considerados negativos os resultados de imuno-histoquímica (IHQ) para RE/RP é  $\leq 1\%$  e para a proteína *cerb2* de 0/ 1+ ou IHQ 2+ com teste de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) negativo (HAMMOND et al, 2010; WOLFF et al, 2013). OS TNBC Representam 10 a 20% dos canceres de mama.

Entretanto, dentro desta classificação identificamos múltiplas entidades com diferenças clínicas, histopatológicas, genéticas e transcricional. Embora a maioria seja composta por tumores agressivos, alguns subtipos de histologia rara se comportam como TNBC de baixo grau (Figura1). Evidências atuais sugerem existir pelo menos dois subgrupos de baixo grau. O primeiro grupo denominado *breast family cancer* que inclui a adenose microglandular (MGA), a adenose atípica microglandular (AMGA) e o carcinoma de células acinares (ACC) (GEYER et al, 2017a). A MGA é definida como uma proliferação aleatória de pequenas glândulas arredondadas e de aparência suave que se infiltram no tecido adiposo e estroma colágeno, faltando uma camada de células mioepiteliais semelhante a carcinomas invasivos, mas sem reação desmoplásica. A MGA foi inicialmente considerada como uma lesão hiperplásica benigna. O ACC é caracterizado por uma proliferação epitelial de baixo grau com diferenciação serosa difusa representada pela presença de grânulos citoplasmáticos de tipo zimogênico. A maioria dos ACCs têm um padrão de crescimento microglandular, mas células claras podem estar presentes, na ausência destas, os ACCs têm um excelente prognóstico, mas não raramente tem um componente de alto grau e elevada carga mutacional, apresentando alta taxa de recorrência local e metástases, diferentemente de quando ocorre em glândulas salivares. Este grupo está frequentemente associados a mutação germinativa do gene *BRCA1*(*Breast cancer 1/2gene*). Existem evidencias de que estes subtipos possam evoluir para o TNBC de alto grau (GEYER et al, 2017b). O segundo grupo são de tumores semelhantes ao das glândulas salivares

e que apresentam padrões mutacionais característicos na mama e em outros órgãos (glândula salivar, pele pulmão). Constituem este grupo o carcinoma adenoide cístico (AdCC) e o carcinoma secretório identificados por mutações patognomônicas de fusão a MYB-NFIB e ETV6-NTRK3, sendo estes alvos terapêuticos (PERSSON et al, 2009). O carcinoma polimorfo, mucoepidermoide (MEC), e adenomioepitelioma (AME) também fazem parte do TNBC de baixo grau.

A maioria dos TNBCs são carcinomas ductais invasivos de alto grau, com grande pleomorfismo nuclear e numerosas mitoses, usualmente com necrose e infiltrados linfocitários. Estão inclusos neste grupo os carcinomas com diferenciação apócrina, carcinomas medulares e carcinomas metaplásicos (MBCs). Os carcinomas de diferenciação apócrina são usualmente RH negativos, mas a expressão de HER2 é variável (FARMER et al, 2005). Em geral acometem pessoas idosas, tem comportamento menos agressivo, recaem tardiamente de forma semelhante aos luminais A. Apresentam expressão de receptores androgênicos e comparados aos outros TNBCs apresentam altas taxas de mutações de PIK3CA e baixas taxas de mutações do gene *TP53*, sugerindo sensibilidade à terapêutica hormonal (WEISMAN et al, 2016). Os carcinomas medulares apresentam bordas bem circunscritas, um padrão de crescimento sincicial e infiltrado linfocitário abundante. Historicamente foram considerados tumores de melhor prognóstico, porém podem ter comportamentos agressivos não devendo ser tratados de forma diferente dos outros TNBCs. Os carcinomas metaplásicos (MBCs) constituem um grupo de tumores com diferenciação escamosa e mesenquimal. Esses tumores são em sua maioria de alto grau, com pleomorfismo nuclear conspícuo e atividade mitótica. Ao contrário de TNBC convencionais, são resistentes à quimioterapia e apresentam pior evolução (WEIGELT et al, 2014). Ao utilizar a classificação genômica de Lehmann et al em 2011, os carcinomas metaplásicos se encaixam em diferentes classificações. Os MBCs condroides e de células fusiformes são preferencialmente de subtipos mesenquimais, enquanto MBCs escamosos pertencem a distintos subtipos. MBCs têm alta complexidade de mutações genômicas, semelhantes aos TNBCs de alto grau que se caracterizam por instabilidade genômica e padrões complexos de rearranjos estruturais. Os genes *TP53* (82%) e *PIK3CA* (10%) são os dois genes mais frequentemente mutados (SHAH et al, 2012).

Alterações genéticas somáticas são encontradas em um pequeno grupo de TNBCs e, em particular, aquelas de inativação de genes supressores tais como *PTEN*, *RB1* e *INPP4B* (PERREARD et al, 2006). Um achado clinicamente relevante é a alta taxa de deficiência de recombinação homóloga do DNA (HRD) similarmente encontrada em pacientes portadores de

mutação genética de *BRCA1/2* (sendo conhecidos como BRCAness (FOULKES, SMITH, REIS-FILHO, 2010). Portanto, os pacientes com TNBC e principalmente os com HRD podem se beneficiar de quimioterapia à base de platina ou inibidores de polimerase (ADPribose), drogas que causam primariamente lesão no DNA e impedem a reparação deste respectivamente.

**Figura 1-** Micrográficos representativos de variantes de TNBC de baixo e alto grau.

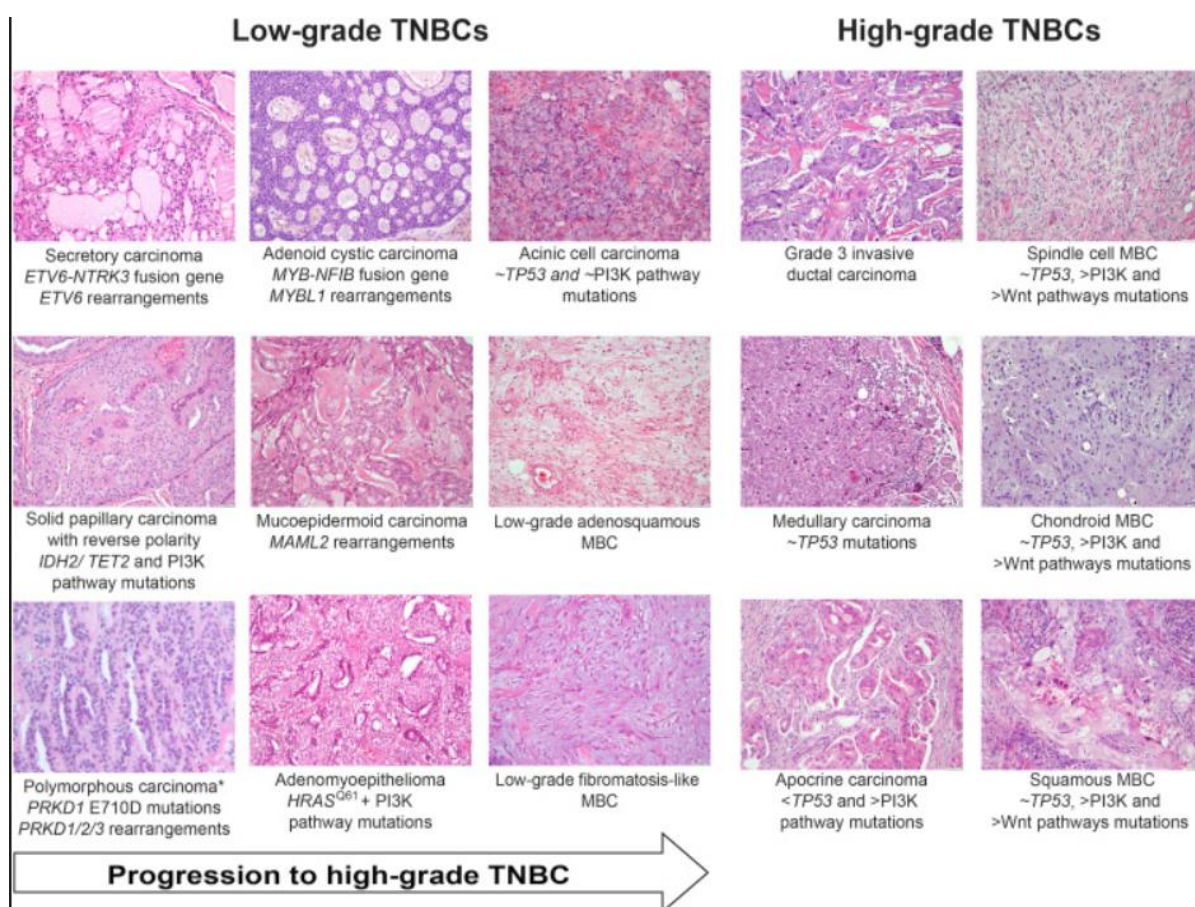
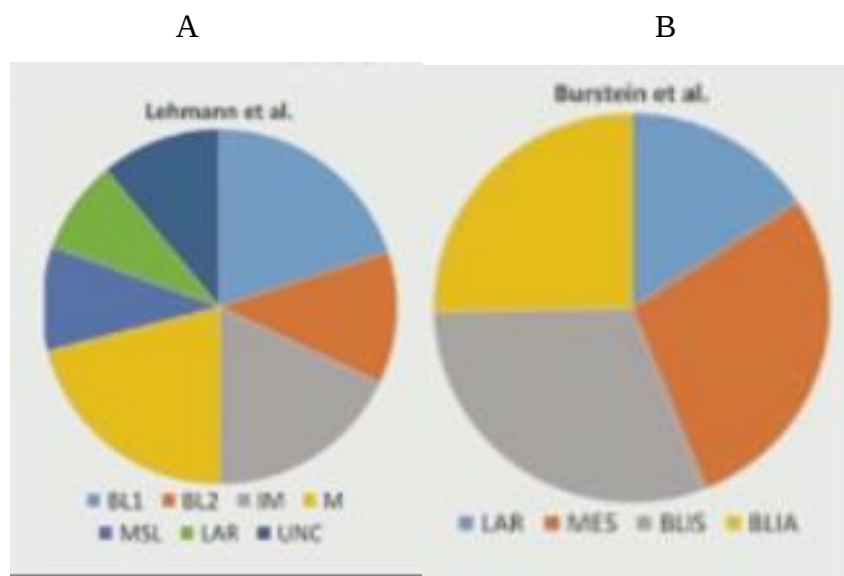


Figura adaptada: GEYER et al, 2017. Tipos histológicos de baixo grau e alto grau de carcinomas de mama triplos negativos (TNBC). Micrográficos representativos de variantes de TNBC de baixo e alto grau. Vários subtipos histológicos de TNBC de baixo grau, incluindo tumores de mama semelhantes a glândula salivar e carcinoma papilar com polaridade reversa, sustentado por alterações genéticas específicas/patognomônicas. Em contraste, carcinomas de células acinares e variantes de alto grau de TNBC que têm alterações genômicas somáticas similares aos TNBC convencionais. Suas alterações genéticas são comparáveis com aquelas reportadas para formas comuns de TNBC. Variantes de baixo grau de carcinoma de mama metaplásicos (MBCs) que provavelmente não expressam alterações genéticas específicas. Entretanto, a análise genética, atualmente realizada, poucas alterações. Progressão para alto grau de TNBC tem sido descrita na maioria das formas de baixo grau.; entretanto, ocorrendo em diferentes taxas. Sendo mais comum em carcinomas de células acinares, e raramente em tumores semelhantes a glândula salivar e carcinomas sólidos papilares com polaridade reversa. Deve-se notar que a evidência da presença de mutação de *PRKD1* E710D ou rearranjo *PRD1/2/3* em carcinoma polimórfico de mama ainda precisa ser documentada. Magnificação original, x 200 (tradução nossa).

Além da heterogeneidade histopatológica e de mutações genéticas patognomônicas acima descritas, os TNBC tal qual outros subtipos de câncer de mama, podem ser classificados molecularmente por perfis genômicos, identificados pela técnica de *microarray* e *whole-genome gene-expression profiling* (GEP). A primeira diferenciação de subtipos moleculares entre os TNBC foi a descrição do *claudin-low* (PERREARD et al, 2006). Este subtipo se diferencia do luminal A, luminal B, HER2-e e basal, por apresentar baixa expressão de citoqueratinas expressas em células basais (5, 14 e 17), baixa expressão de HER2 e apresentar marcadores luminais tais como ER, PR, GATA3 e ceratinas 18 e 19. Além de baixa expressão de E-cadherin, presença da proteína claudin 3 e células com características de *stem cell* do epitélio mamário. Clinicamente eram descritos como de pior prognóstico. Posteriormente, Lehmann e colaboradores (LEHMANN et al, 2011) identificaram e analisaram o perfil de expressão gênica (GE) de 587 amostras de TNBC, de 21 bancos de dados de câncer de mama. Estes autores descreveram 6 subtipos TNBC: basais (BL1 e BL2), imunomodulado (IM), mesenquimal (M), um subtipo semelhante ao mesenquimal com *stem cell* (MSL) e um subtipo com receptores de androgênios (LAR). Burstein e colaboradores (BURSTEIN et al., 2015) utilizaram análises de DNA e RNA de 198 TNBC classificados por IHQ e identificaram 4 distintos subtipos: receptor androgênico luminal (LAR), mesenquimal (MES), *basal-like* imunossuprimido (BLIS) e *basal-like* imuno ativado (BLIA). Descreveram ainda, que quando comparados aos outros subtipos, o BLIS tem pior prognóstico e o BLIA melhor prognóstico. Estes mesmos autores sugeriram possíveis alvos terapêuticos para cada subtipo: antagonistas de receptores de androgênio (AR) para LAR, inibidores de fatores de crescimento insulínico (IGF) e de plaquetas (PDGFR) para MES, inibidores de sinalização *JAK-STAT* e citocinas para o BLIS e inibidores de *checkpoint* para os BLIA. Podemos destacar que a identificação de genes estromais, imunes e basais reportados na classificação Lehman também é identificada nesta última classificação (Figura 2).

**Figura 2** - Classificações moleculares dos carcinomas de mama triplos negativos (técnica de *microarray*) descritas por Lehmann et al 2011(A) e posteriormente por Burstein et al (2015).



**A-** BL1: basaloide1; BL2: basaloide 2; IM: mesenquimal imunomodulado; M: mesenquimal; MSL mesenquimal com *stem cell*; LAR: Luminal receptor de androgênio.  
**B-** LAR: Luminal receptor de androgênio, MES: mesenquimal, BLIS basaloide suprimido e BLIA basaloide ativado.

A denominação tumor basalóide tem sido identificada como sinônimo da TNBC por representar cerca de 70% desta última. Um estudo que avaliou TNBC e diferentes plataformas genômicas, demonstrou discordância de 25% (PRAT et al, 2013) (Figura 3). Os tumores basalóides são caracterizados pelo cluster basal que inclui receptores de fatores de crescimento EGFR (HER1), citoqueratinas 5/6, c-kit, alta proliferação, ausência de expressão de receptores de hormonais e HER2. Cerca de 20% dos pacientes com TNBC possuem uma mutação no gene de suscetibilidade ao câncer de mama (*BRCA*), particularmente no *BRCA1*, enquanto a população normal apresenta esta mutação em torno de 6%. Por esta razão, os consensos internacionais recomendam a realização do teste do *BRCA* para pacientes com diagnóstico de câncer de mama triplo negativo, principalmente para os de 60 anos ou menos, independente da história familiar, (THOMSSENA et al, 2021).

As características clínicas descritas para os TNBC se confundem com as descritas para os basalóides que usualmente acometem duas vezes mais mulheres jovens, com menos de 40 anos e negras (TRIVERS et al, 2009). Os TNBCs apresentam um rápido crescimento, podendo surgir entre as mamografias de rastreamento (COLLET et al, 2005). Clinicamente os TNBC tem alto risco de metástases precoces e óbito em cinco anos desde o diagnóstico.

**Figura 3** - Distribuição de subtipos moleculares intrínsecos nos tumores triplo negativos e basais classificados por critérios patológicos.

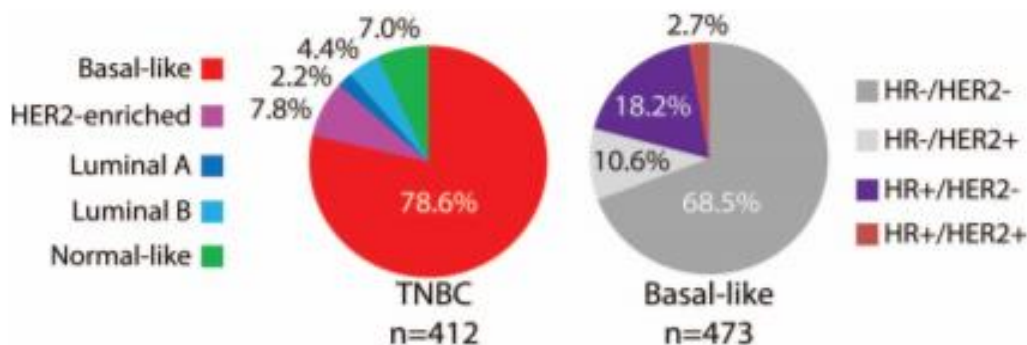


Figura adaptada: CHEANG et al 2013. Distribuição de subtipos moleculares intrínsecos e baseados em patologia dentro de tumores triplo negativos e basais. Abreviações: HR receptores hormonais; TNBC, câncer de mama triplo negativo.

## 2.5. TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO (TNBC)

Sob o ponto de vista clínico, dividimos o câncer de mama, em estádios iniciais (estádios I e II), localmente avançados (estádio III) e metastáticos (estádio IV). Tumores iniciais, de melhor prognóstico, são abordados inicialmente com cirurgia e, em seguida, submetidos a tratamentos sistêmicos complementares (adjuvantes). Os tumores localmente avançados (>5cm ou axila positiva) são tratados com quimioterapia neoadjuvante (QTNEO) com finalidade de reduzir o tumor e facilitar a cirurgia (DEVITA, LAWRENCE, ROSENBERG, 2011).

Entretanto, no tratamento de TNBC, a QTNEO tem sido indicada precocemente, em tumores maiores do que 1 cm ou axila positiva, pois são tumores de pior prognóstico, que utilizarão necessariamente quimioterapia no tratamento adjuvante e a utilização primária de quimioterapia poderá indicar a sensibilidade do tumor as drogas empregadas (DENDULURI et al, 2018). A resposta patológica na peça cirúrgica irá nortear o tratamento adjuvante. Pacientes com doença residual, supostamente resistente ao tratamento primário, terão a oportunidade de trocar o esquema terapêutico. Estudo recente, randomizado e prospectivo demonstra o benefício de sobrevida com o uso de capecitabina (5fluorouracil oral), nos pacientes com doença residual após a QTNEO clássica baseada em antraciclinas e taxanes (MASUDA et al, 2017). Neste mesmo cenário adjuvante, a adição de inibidores de PARP (enzima poliADP-ribose polimerase) mostrou benefício de SLP (sobrevida livre de doença) em pacientes com mutação *germline* com

alto risco de recidiva (TUTT et al, 2021). A resposta ao tratamento quimioterápico é um fator prognóstico. A resposta patológica completa (pCR), definida como ausência de tumor na mama e na axila é o melhor indicador de resposta à QTNEO, se correlacionando com aumento de sobrevida (sobrevida global e sobrevida livre de doença), conforme demonstrado inicialmente pelo grupo do NSABP, no estudo clássico B18 (FISCHER et al, 1998). Esta correlação é especialmente verdadeira para tumores triplo negativos (TNBC) e HER2 positivos (VON MINCKWITZ et al, 2012).

Como anteriormente discutido, apesar dos TNBC apresentarem alvos terapêuticos conhecidos o tratamento primário neoadjuvante ainda é a quimioterapia. Os protocolos internacionais recomendam o uso preferencial de antraciclinas e taxanes. Sendo ainda controversa a adição de platina, antiangiogênicos (bevacizumabe), inibidores da PARP e imunoterapia (CARDOSO et al, 2019). A resposta dos TNBC à quimioterapia neoadjuvante é usualmente elevada, sendo relatado pCR de 26% a 64% em diferentes protocolos de estudo e populações (RUGO et al, 2016; VON MINCKWITZZ et al, 2014). Alguns fatores prognósticos relacionados a melhor resposta à quimioterapia são conhecidos na literatura como menor tamanho de tumor (COLLET et al, 2005), maior grau tumoral e presença de infiltrados linfocitários (TILS). Estudos adicionais têm demonstrado que a assinatura imune é um importante preditor de resposta a quimioterapia para os tumores receptores hormonais negativos (TESCHENDORFF et al, 2007).

Atualmente no tratamento do TNBC metastático, além da quimioterapia, utilizamos inibidores de PARP e imunoterapia. Desta forma, todos os pacientes em estágio IV ou localmente avançado não cirúrgicos devem ser testados para mutação do gene *BRCA* e ligante de morte celular programada 1 (PDL1), alvos terapêuticos respectivos para estas modalidades de tratamento. A imunoterapia com anticorpos monoclonais tem sido indicada para pacientes com PDL1 positivos. O estudo IMpassion 130, randomizou 902 pacientes com câncer de mama metastático em primeira linha entre nabpaclitaxel com atezolizumab ou placebo. Cerca de metade dos pacientes recebeu paclitaxel como QTNEO ou adjuvante e, portanto, necessitaram permanecer livres de tratamento por um intervalo de 12 meses até a entrada no protocolo. O não foi testado nestas pacientes do estudo. No seguimento de 13 meses houve um modesto, mas significativo ganho de SLP em favor da associação (7,2 *versus* 5,5 meses, HR 0,80, 95% CI 0,69-0,92), com um não significativo ganho de sobrevida global (SG) de 21,3 *versus* 17,6 meses (HR de 0.84, 95% CI 0,69-1,02) (SCHMID et al, 2018). Entretanto, em uma análise prospectiva planejada ao serem avaliados apenas casos PD-L1 expressos dentro do tumor, o atezolizumabe

melhorou a SLP (7.5 *versus* 5 meses; HR 0,62, 95% CI 0,49-0,78) e SG (25 *versus* 15.5 meses; HR 0,62, 95% CI 0,45-0,86). A análise final de SG com 20 meses de seguimento demonstrou benefício de 18 *versus* 25 meses, com toxicidade semelhante, excetuando-se maior número de eventos imunomodulados no braço da imunoterapia (23% de doença tireoidiana e 10% de outros eventos imunomodulados) (EMENS et al, 2020).

Outro estudo o IMpassion 131, testou atezolizumabe combinado com paclitaxel em primeira linha de câncer de mama metastático. Entretanto, diferente do estudo anterior, não houve significativo benefício de PFS (sobrevida livre de progressão). Apesar de não existir uma explicação evidente para esta inferioridade, uma hipótese sugerida por pesquisadores é a combinação de um diferente quimioterápico com a imunoterapia (MILES et al, 2020). Outro estudo, o KEYNOTE 355, que incluiu 847 pacientes com TNBC metastático, com intervalo livre de doença  $\geq 6$  meses, randomizou a quimioterapia com ou sem o pembrolizumabe, e observou discreto benefício de SLP (7,5 *versus* 5,6 meses HR 0,82, 95% CI 0,69-0,97). Quando avaliado o subgrupo com positividade de PD-L1 por CPS  $\geq 10$ , houve ganho de SLP de 9,7 *versus* 5,6 meses (HR 0,65, 95% CI 0,49-0,86). Os eventos adversos de Grau 3 a 4 foram similares entre os dois grupos (CORTES et al, 2020). Desta forma, a atezolizumabe com nabpaclitaxel foi aprovado pelo FDA e pela Anvisa para o tratamento TNBC metastáticos em primeira linha com PD-L1  $\geq 1$  em células tumorais (anticorpo SP142) e pembrolizumabe aprovado pelo FDA combinado com quimioterapia se o score CPS  $\geq 10$  (anticorpo 22C3). Pequenos estudos com imunoterapia isolada com pembrolizumabe (ADAMS et al, 2019), assim como anti-PD-L: avelumabe e atezolizumabe, apresentaram taxas de resposta  $< 20\%$  mesmo em tumores PD-L1 positivos (REDDY et al, 2020; DIRIX et al, 2018). Em resumo, quando é necessária alta taxa de resposta, a combinação de quimioterapia com imunoterapia é principalmente recomendada em tumores PDL1 positivos em pacientes com metástases viscerais. O critério de positividade de PDL1 varia de acordo com o anticorpo. Para SP142 consideramos o resultado positivo, se mais de 1% das células imunes infiltrantes, na área tumoral, são coradas, independente da intensidade. Quando o anticorpo é o 22C3 é utilizado um escore (CPS) que representa a percentagem de células tumorais, linfócitos e macrófagos corados, divididos pelo total de células tumorais.

A presença de TILs e PDL1 é mais frequente em TNBC em estádios iniciais do que avançados (SZEKELY et al, 2018). Desta forma, diversos estudos têm testado a imunoterapia em tratamento neoadjuvante (tumores não metastáticos) correlacionando com pCR e alguns com sobrevida. O estudo fase III KEYNOTE-522 demonstrou que a adição de pembrolizumabe

à quimioterapia neoadjuvante com paclitaxel e carboplatina seguido de doxorubicina e ciclofosfamida foi capaz de aumentar a pCR de 51 para 65%, independente da positividade de PDL1 (SCHMID et al, 2020). Atualizações deste estudo demonstraram benefício de sobrevida livre de doença no braço da imunoterapia (SCHMID et al, 2022).

Dois estudos avaliaram atezolizumabe na neoadjuvância. O estudo fase III IMpassion031 testou a adição de atezolizumabe à nabpaclitaxel semanal seguido de doxorubicina e ciclofosfamida com aumento de pCR de 41 para 58% independente de PDL1 (MITTENDORF et al, 2020). Já o estudo NeoTRIP não demonstrou diferença estatística da adição de atezolizumabe à quimioterapia com nabpaclitaxel e carboplatina (GIANNI et al, 2022). Por último o estudo fase II do grupo Alemão GeparNuevo testou durvalumabe associado nabpaclitaxel seguido de epirubicina e ciclofosfamida obtendo aumento significativo de pCR e ganho de SLP (LOIBL et al, 2019). (Tabela 1). Ao contrário do que é observado no tratamento metastático do TNBC, o PDL1 não parece ser um bom biomarcador para avaliação de resposta ao tratamento neoadjuvante de quimioterapia associado à imunoterapia. Porém, se nos atentarmos para a pCR dos subgrupos PDL1 positivos e negativos, observamos que em todos os estudos no subgrupo PDL1+, a pCR no braço placebo (apenas com quimioterapia) foi melhor ou igual ao grupo com PDL1 negativo com imunoterapia associada, sugerindo que os tumores PDL1 positivos tem excelente resposta à quimioterapia independente de imunoterapia. Essa pode ser a justificativa para a ausência de correlação entre a positividade do PDL1 e resposta à imunoterapia na neoadjuvância. A interação entre tumor, microambiente e hospedeiro é um processo dinâmico, os achados no perfil imunológico podem variar dependendo da fase em que observamos, do tipo de neoplasia, da resposta imunológica do hospedeiro e ainda da técnica utilizada para aferição. Desta forma, estudos que analisam os TILs e seus componentes relacionando aos protocolos de tratamento, são de extrema relevância contribuindo na construção deste conhecimento ainda incipiente.

**Tabela 1** - Protocolos de quimio e imunoterapia neoadjuvante em câncer de mama triplo negativos: Impacto da adição de inibidores de checkpoint nos protocolos de quimioterapia neoadjuvante em TNBC.

| estudo                   | quimioterapia                                       | Imunoterapia<br>Nº/pCR                           | Placebo<br>Nº/pCR                        | Sobrevida livre<br>de doença (SLD)<br>(imunox placebo) | referência                |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------|
| <b>Keynote -522</b>      | 12 paclitaxel<br>+carbo sem-<br>4EC                 | Pembrolizumabe<br>PDL1+ 656/69%<br>PDL1- 127/45% | Placebo<br>PDL1+ 317/55%<br>PDL1- 69/30% | Em 18 meses: 91% x<br>85% (HR0.63)                     | NEJM 2020<br>Schmidt      |
| <b>Impassion<br/>031</b> | 12sem<br>nabpaclitaxel -<br>4EC                     | Atezolizumabe<br>PDL1+ 77/69%<br>PDL1- 88/48%    | Placebo<br>PDL1+ 75/49%<br>PDL1- 93/34%  | Em 20 meses:<br>media não<br>alcançada (HR0.76)        | Lancet 2020<br>Mittendorf |
| <b>NeotripaPDL1</b>      | nabpaclitaxel e<br>carbo D1e D8<br>cada 21 dias (8c | Atezolizumabe<br>PDL1+ 79/52%<br>PDL1- 88/48%    | Placebo<br>PDL1+ 77/48%<br>PDL1- 65/32%  | Não reportada                                          |                           |
| <b>Gerpanuevo</b>        | 12sem<br>nabpaclitaxel -<br>4EC                     | Durvalumabe<br>PDL1+ 69/58%<br>PDL1- 11/44%      | Placebo<br>PDL1+ 69/51%<br>PDL1- 09/18%  | Não reportada                                          | Ann Oncol<br>2019         |

Abreviações: Imuno: imunoterápicos (inibidores de *checkpoint*) pCR: resposta patológica completa (ypT0/is/N0) e SLD: sobrevida livre de doença, PDL1+: PDL1 ligante de morte celular programada 1 (*Programmed death-ligand 1*) imunocorado no escore positivo de acordo com os critérios de cada estudo. HR: *hazard ratio*.

## 2.6. RESPOSTA IMUNOLÓGICA E INFILTRADOS LINFOCITÁRIOS (TIL)

O desenvolvimento de neoplasias é ocasionado por um descontrole de um complexo sistema biológico, derivado de uma sucessão de eventos mutacionais cumulativos de origem hereditária e ambiental, em genes responsáveis pela proliferação, crescimento, morte e evasão celular, que podem ocorrer nas células tumorais, no estroma, em células inflamatórias e microambiente (HANAHAHAN, WEINBERG, 2000; HAHAN, WEINBERG, 2002). As células tumorais apresentam genes mutados que produzem proteínas ou peptídeos expressos na sua superfície celular que funcionam como antígenos, não evidenciadas em células normais, sendo desta forma, reconhecidas como *non self* e capazes de gerar uma resposta imune.

A resposta imunológica é caracterizada por uma primeira linha de defesa rápida e pouco específica, denominada imunidade inata. As células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* (NK) são as responsáveis pela eliminação dos antígenos nesta fase. O sistema imune inato é capaz de estimular uma resposta imune mais específica, ativando linfócitos T e B, resposta denominada adaptativa. Os linfócitos T reconhecem os antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC), através dos receptores de

membrana ou TCR (*T cell receptor*) que reconhecem um complexo formado pelas moléculas de MHC (HLA em humanos) e um peptídeo. Esta ligação do TCR com a molécula de MHC, permite que o correceptor CD4 reconheça o MHC II e o CD8 reconheça o MHC I. A resposta ao estímulo antigênico leva os linfócitos T, CD4 a diferenciarem-se em vários tipos de células efetoras denominadas como Th1, Th2, Th9, Th17, entre outras; ou supressoras denominadas como Treg (clássica, FoxP3+) e outras T reguladoras que não expressam FOXP3 mas produzem IL-10 ou TGFb. (SCHENTEN, MEDZHITON, 2011). Os subtipos de células efetoras mais estudados no câncer são as Th1 e Th2. A principal característica das células Th1 é a secreção de IFN- $\gamma$  que ativa macrófagos e ajuda a diferenciação das células citotóxicas do tipo CD8+, conduzindo a resposta imune a ser mediada por células. O contato dos linfócitos T CD8, previamente ativados, com a molécula de MHC I+ peptídeo (MHCp) induz os linfócitos T CD8 efetores a terem ação citotóxica, seja por meio de contato de moléculas de superfície ou solúveis, como TNFa ou FASL, liberando grânulos citoplasmáticos contendo perforinas e granzimas que ocasionarão apoptose das células tumorais. Já as Th2 são as que produzem IL-4, IL-5, e IL13, induzem principalmente a diferenciação das células B e a produção de anticorpos, resposta imune humoral.

Apesar da ligação MHCp –TCR desempenhar papel central na ativação de linfócitos T, várias outras moléculas acessórias têm grande importância. Os principais sinais coestimuladores resultam da ligação entre receptores CD28 e CTLA4 expressos em linfócitos T com seus ligantes B7, expressos nas APCs. As proteínas da família B7 estimulam os linfócitos T ligando-se ao CD28. No entanto, há ligantes de proteínas da família B7 que têm papel inibitório, como a molécula CTLA-4 presente em linfócitos T ativados ou supressores. No caso, quando CTLA-4 do linfócito ativado encontra B7 na APC, o linfócito é inibido (VIOLA, TEIXEIRA, WERNECK, 2005).

Desta forma, dependendo da resposta imune tumoral, podemos observar diferentes fases de interação do tumor com o sistema imune: Fases de eliminação, equilíbrio e escape. (Figura 4). Na fase de eliminação a imunidade antitumoral é ativada com a estimulação de células T, com produção de IFN $\gamma$ , granzimas e perfurinas ocasionando a apoptose tumoral. Esta fase poderá progredir para o “escape” tumoral (DUNN, OLD, SCHREIBER, 2004; MITTAL et al, 2014). A fase de escape poderá ocorrer devido a proliferação e sobrevivência de células imunossupressoras como Tregs e células mieloide supressoras (MDSCs); diminuição do reconhecimento imune, decorrente de redução da expressão de MHC I e MHC II, ocasionada principalmente por citocinas do microambiente tumoral como a VEGF e TGF-beta, assim como

diminuição de B7 ou ativação das *immune checkpoints*, que usualmente evitam uma reação autoimune, mas neste contexto inibem a vigilância tumoral. Além de inibir diretamente a atividade dos linfócitos T, o tumor produz citocinas inibitórias para células T como TGF- $\beta$  e IL-10 (RAVELLI et al, 2017). Desta forma, na fase de escape, podemos observar aumento da produção de fatores imunossupressores solúveis como TGF-B, IL-13, ou de superfície celular, como PD-1 ou ainda fatores de transcrição que identificam células Treg, como o FOXP3 (POSTOW, CALLAHAN, WOLCHOK, 2015). O bloqueio da atividade imune pode ocorrer por supressão da sinalização através de imuno receptores, como PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, TIGIT e BTLA. Eles são nomeados como pontos de controle imunológico ou *immune check points* referindo-se a moléculas que atuam como guardiãs das respostas imunes. As *immune check points*, são parte normal do nosso sistema imune cuja a função é prevenir uma reação imune exacerbada evitando a agressão e morte de células normais. Como moléculas de superfície suas atividades podem ser facilmente inibidas pelo bloqueio de anticorpos que atuam impedindo a ligação de ligante e receptor (Xing He, 2020). O bloqueio das *immune checkpoint* por anticorpos monoclonais anti PD1 e PDL1 tem demonstrado excelentes resultados terapêuticos em neoplasias que super expressam PD1/PDL1.

**Figura 4** - Representação da teoria de resposta imune tumoral. Fases de eliminação, equilíbrio e escape com seus microambientes respectivos.

Ravelli et al.

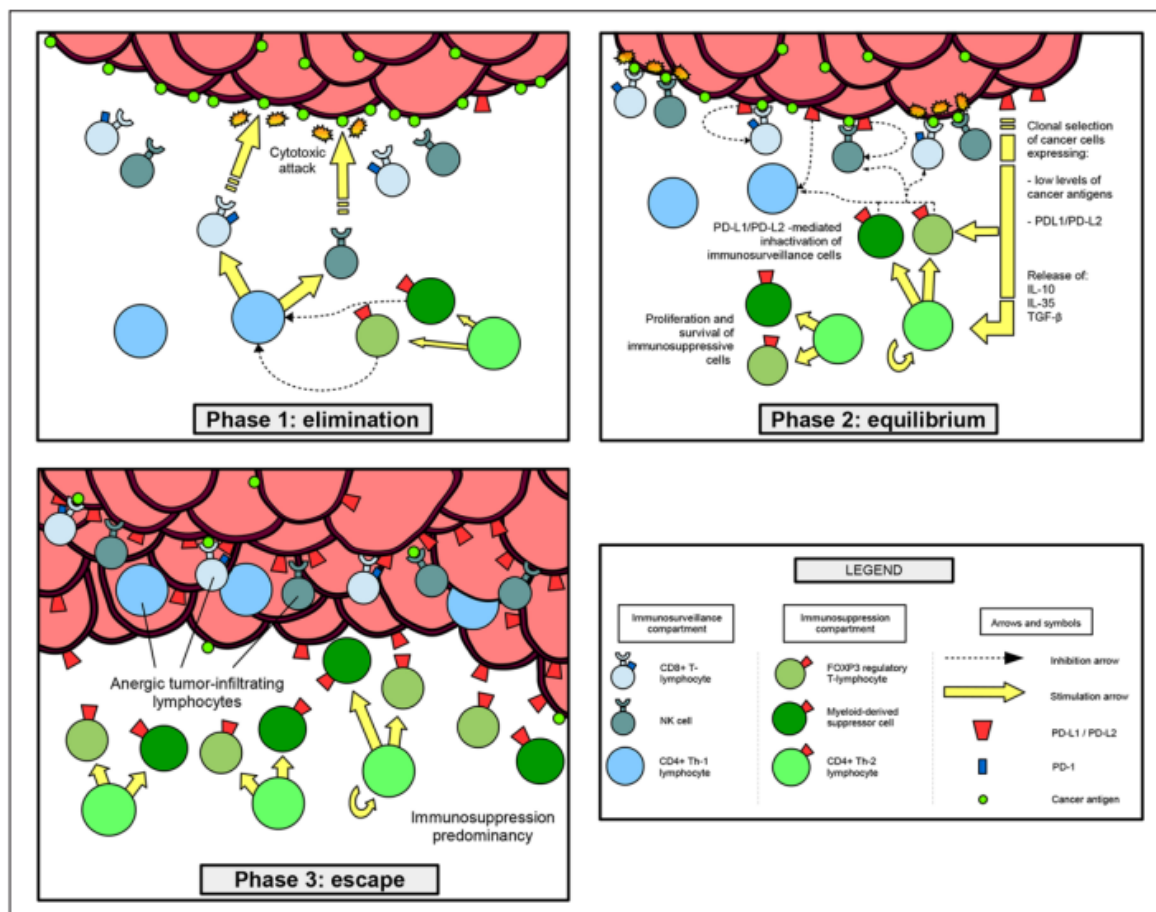


Figura adaptada: RAVELLI et al 2017. Representação da teoria de imuno edição: Inicialmente o compartimento de imunovigilância (CD8+ T linfócitos, *natural killer* (NKs) e CD4+ tipo I linfócito T-helper (th-1) neutraliza eficazmente a proliferação de células cancerígenas (fase de eliminação). Entretanto, clones de células malignas, caracterizadas pela redução de expressão de antígenos cancerígenos e pelo aumento da expressão de moléculas de *immune-checkpoint* (PD-L1/PD-L2) são de modo darwiniano selecionadas como células que escapam e proliferam sobre outros clones. Durante esta fase, a taxa de células eliminadas é igual ao montante que escapa (fase de equilíbrio). Em última análise o micro ambiente tumoral torna-se rico em células de escape e linfócitos imunossupressores (FOXP3+, Linfócito T reguladores, células supressores derivadas de mielócitos (MDSCs), e CD4+ tipo 2 linfócito T-helper), enquanto o compartimento de imuno vigilância está anérgico (fase de escape).

Os infiltrados linfocitários tumorais (TILs) são células imunes mononucleares que se infiltram no tecido tumoral. Eles foram amplamente descritos em vários tumores sólidos, incluindo câncer de mama, câncer de cólon, câncer cervical, melanoma e câncer de pulmão (HEPPNER, LOIBL, DENKERT, 2016). Os TILs são geralmente detectados pela avaliação semiquantitativa, por microscopia, em lâminas coradas com H&E e podem ser identificados em

dois compartimentos: Estromal e intratumoral. Altos níveis de TILs em câncer de mama são mais comuns em subtipos TNBC e HER2. Em estádios iniciais destes tumores, os TILs são detectáveis em cerca de 75%, onde aproximadamente 20% dos tumores apresentam um infiltrado particularmente denso (MAO et al, 2015; GARCIA-MARTINEZ et al, 2014; GALON et al, 2013).

Recentemente, a publicação de uma meta-análise incluindo pacientes individuais de 9 grandes estudos confirmou o papel prognóstico do TILs em TNBC. Desta forma, os autores sugerem que os TILs podem ser considerados um biomarcador para uso clínico (LOI et al, 2019). Os estudos iniciais de TILs no câncer de mama avaliaram os linfócitos estromais (sTILs) e intratumorais (iTILs) separadamente e, embora ambos se correlacionassem com o resultado, os sTILs se mostraram mais reprodutíveis e com melhor correlação com os desfechos (GARCIA-MARTINEZ et al, 2014; MAHMOUD et al, 2011). Em um esforço para promover sua implementação clínica, um grupo de patologistas envolvidos em estudos clínicos se organizaram e publicaram um consenso para padronizar o processo de avaliação desse biomarcador (SALGADO et al, 2015) (tabela 2).

**Tabela 1** - Recomendações do grupo internacional de patologistas (International TILs Working Group) para avaliação de infiltrados tumorais linfocitários (TILs) em câncer de mama.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Reportar os TILs do compartimento estromal (= % stromal TILs). O denominador usado para determinar a % de TILs stromal é a área de tecido estromal (a área ocupada por células mononucleares inflamatórias sobre o total de área de estroma intratumoral), não o número de células estromais (a fração do total de núcleos estromais que representam células mononucleares inflamatórias) |
| 2. Os TILs devem ser avaliados dentro das bordas do tumor invasivo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 3. Excluir TILs fora da borda e ao redor de CDIS (carcinoma ductal in situ) e lóbulos normais.                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 4. Excluir TILs em zonas com artefatos, necrose, regressão hialina assim como área de biópsia prévia.                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 5. Incluir todos os mononucleares, linfócitos e plasmócitos, excluir polimorfonucleares.                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 6. Uma lâmina por paciente é suficiente (4–5 µm, magnificação × 200–400)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 7. A utilização da peça é preferível sobre biópsia quando possível. Core biópsia pode ser usada no tratamento neoadjuvante. Até o momento nenhum método validado foi desenvolvido para mensurar TILs depois do tratamento neoadjuvante.                                                                                                                                                      |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8. Toda a área do tumor deve ser vista na análise de TILs e não focada em pontos de maior densidade.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 9. O consenso do grupo de trabalho é de que TILs podem prover maior informação quando analisados como uma variável contínua, pois permitem melhor análise estatística, podendo mais tarde serem categorizados com diferentes limiares. Entretanto, na prática diária, a maioria dos patologistas arredondam para cima. Patologistas podem relatar os escores da forma que se sentirem mais confortáveis.                                                                                                 |
| 10. TILs podem ser avaliados como um parâmetro contínuo. A porcentagem de TILs estromais é um parâmetro semiquantitativo, por exemplo 80% de TILs estromais significa que 80% da área estromal demonstra infiltrados mononucleares densos. Para avaliação de valores percentuais, o padrão de crescimento do linfócito precisa ser considerado. Linfócitos tipicamente não formam agregados celulares. Portanto a designação de 100% de TILs estromais deve permitir espaços vazios entre os linfócitos. |
| 11. Nenhuma recomendação formal para um limiar clinicamente relevante pode ser estabelecida neste momento. O consenso foi de que o mais importante é a metodologia e não o limiar que serão determinados assim que a metodologia estiver em vigor. Câncer de mama com predomínio linfocitário pode ser utilizado como descrição de tumores que contem mais linfócitos do que células tumorais. Entretanto, o limiar varia entre 50 a 60% de linfócitos estromais.                                        |

Adaptado do Annals of Oncology 2015, Salgado et al.

Os TILs estromais (sTILs) são definidos como a porcentagem da área estromal infiltrada por TILs, não considerando os linfócitos em contato direto com células do carcinoma, enquanto os TILs intratumorais (iTILs) são definidos como a porcentagem da área do tumor ocupada por TILs, ou linfócitos dentro de ninhos de tumorais em contato direto com células de carcinoma. Embora exista uma correlação evidente entre sTILs e iTILs, recomenda-se apenas que os sTILs sejam avaliados para análises prognósticas ou preditivas, devido à maior reprodutibilidade analítica da pontuação do sTILs entre diferentes patologistas.

A população celular mais abundante em TILs é de linfócitos T (75%). Entretanto, dependendo da composição destes linfócitos, supressores ou reguladores, o prognóstico do câncer de mama pode variar. Os CD8 são linfócitos T citotóxicos e sua alta expressão em TILs conferem melhor prognóstico (MAHMOUD et al, 2011), enquanto a baixa expressão de NK tem sido associado com pior prognóstico (RATHORE et al, 2014). A presença de CD4, especialmente Th1, se correlaciona com melhor prognóstico (AHN et al, 2015; GU-

TRANTIEN et al, 2013). Por outro lado, a presença de infiltrados com células T reguladoras (2 a 3%), que podem se caracterizar pela expressão do fator de transcrição Foxp3, indicam pior prognóstico (BATES et al, 2006). Existem fortes sugestões de que uma extensa infiltração de linfócitos T (Th1) e CD8 citotóxicos se correlacionam com melhor resposta à quimioterapia neoadjuvante (pCR) (SEO et al, 2013). A melhor caracterização do infiltrado imune foi realizada por IHQ com CD3 (total de linfócitos T), CD8 células citotóxicas e FoxP3 expressando Treg. A razão CD8/FoxP3 no TILs se correlaciona com melhor resposta à quimioterapia neoadjuvante (QT NEO) e maior chance de obter pCR (YU et al, 2016; MIYASHITA et al, 2014).

A presença de TILs depois de QTNEO (doença residual na peça cirúrgica) é relacionada a melhor prognóstico (LUEN et al, 2019). Um estudo retrospectivo avaliando TILs como variável contínua no tumor residual demonstra uma redução de 21% do risco relativo de metástases e morte a cada 10% de aumento do TILs (DIECI et al, 2014). Entretanto, até o momento, a avaliação morfológica de TILs na hematoxilina eosina na peça residual não tem sido o padrão. Dieci e colaboradores (DIECI et al, 2017) discutem os padrões usuais de TILs na peça residual e publicam recomendações para sua análise. O papel dos TILs como preditor de resposta à imunoterapia ainda está em estudo. Dados preliminares do GeparNuevo não demonstraram este benefício (LOIBL et al, 2019).

## 2.7. ANÁLISE DE PD-L1 E PD-1

Vários mecanismos que justificam o escape de células tumorais à imunidade usual têm sido descritos. Entre os quais a *downregulation* de antígenos tumorais, o que permite gerar um microambiente imunossupressor através da secreção de citocinas anti-inflamatórias e expressão de reguladores do sistema imunitário que efetivamente desligam o combate às células tumorais. Uma das interações chave neste processo de combate às células neoplásicas reside precisamente na sinalização da ligação entre PD-1 (*Programmed cell death-1 receptor*) e seu ligante PDL1.

O PD1 é inibidor de *checkpoint* expresso na superfície dos linfócitos T, B ativados, monócitos e células dendríticas. O PD1 foi originalmente isolado em hibridoma de células T submetido à morte celular induzida pela ativação do receptor de célula T, justificando sua denominação (ISHIDA et al, 1992). O PD1 se liga a dois ligantes PD-L1/2, proteínas transmembrana, que estão expressas em macrófagos, células T e B ativadas, algumas células epiteliais e também em células tumorais. Sua ativação induz a regulação da célula T ativada,

reduz produção de citocinas, lise de célula T e induz tolerância aos antígenos (LACTCHMAN et al, 2011). O bloqueio das *immune-checkpoint* por anticorpos monoclonais anti PD1 e PDL1 tem demonstrado resultados terapêuticos em neoplasias com positividade de PD1/PDL1. Entretanto, apenas uma minoria de pacientes com câncer se beneficia do tratamento anti PD1/PDL1. Aqueles que não respondem primariamente à imunoterapia são denominados de resistentes primários. Aqueles que desenvolvem resistência durante o decorrer do tratamento são denominados resistentes secundários. O eixo PD1/PDL1 pode ser modulado em células cancerígenas por outras proteínas de vias da carcinogênese, como P13K/AKT (fosfoinositida 3-quinase/proteína quinase B), MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), JAK/STAT, WNT, NF- $\kappa$ B (fator nuclear NF- $\kappa$ B impulsionado por IFN- $\gamma$ ) e Hedgehog, podendo contribuir para mecanismos de resistência à imunoterapia. Micro RNAs e histonas também podem regular o eixo. Inibidores e ativadores destas vias podem ser futuros alvos terapêuticos adicionados a imunoterapia.

A presença de PDL1 no TNBC está presente em 20% dos casos (SCHUTZ et al, 2017). Estudos demonstram que neoplasias de mama iniciais tem maior expressão de PDL1 do que os metastáticos (SZEKELY et al, 2018). O estado de PD-L1 é modulado pelo tratamento quimioterápico com taxa de conversão alcançando 25 a 30%. O papel de PDL1 isolado como fator prognóstico e preditivo é bastante controverso na literatura (LOTFINEJAD et al, 2020), variando de acordo com a metodologia empregada, estadiamento e sua apresentação, se em células tumorais ou células imunes, apesar de alguns autores descreverem a existência de correlação entre as duas positivities (ONER et al, 2021). O estudo translacional “ETNA TRIAL” sugere que PDL1/PD1 positivos na biópsia seja um marcador de resposta à quimioterapia independente de TILs (BIANCHINI et al, 2020). Outros estudos também demonstram que a alta positividade de PDL1 também se correlaciona com maior número de pCR (PELEKANOU et al, 2018) e quimioterapia (CERBELLI et al, 2017). Uma meta análise correlaciona PD-L1 positivos em TILs com melhor sobrevida livre de doença e global (HUANG et al, 2019). Porém, outro estudo descreve que alta expressão de PDL1 em células tumorais foi associada a presença de maior doença residual após quimioterapia (GRANDAL et al, 2021).

Para o câncer de mama metastático, o PDL1 tem sido um biomarcador preditivo à imunoterapia, apesar de uma série de problemas técnicos existentes em sua padronização (VAN ROOIJEN et al, 2015). Estudos demonstram maior resposta aos inibidores de *checkpoint* quanto maior a expressão de PD-L1 (IWA et al, 2002; CORTES et al, 2020). A positividade de PDL1

depende do local analisado, sendo maior em linfonodos e pulmão e mais baixa no fígado, osso e partes moles (LI et al, 2020).

Em protocolos neoadjuvantes a imunoterapia adiciona à quimioterapia resposta e sobrevida, independente do estado de PDL1 (SCHMID et al, 2020; SCHIMD et al, 2022). Desta forma, um grande desafio é encontrar biomarcadores preditivos para imunoterapia para selecionar com precisão os pacientes que se beneficiarão da imunoterapia, poupando o restante de efeitos adversos e custos desnecessários. Uma análise exploratória de estudo utilizando inibidores de PDL1 mostrou maior eficácia quando havia amplificação de genes PDL1/CD274 (BACHELOT et al, 2021), TMB (*tumor mutation burden*) ou assinaturas imunes (KARN et al, 2020).

Na tentativa de realizar mais uma contribuição à literatura existente, optamos em rever tumores localmente avançados, triplo negativos, tratados com quimioterapia neoadjuvante. Descrever a resposta patológica obtida com o tratamento, a presença de infiltrado linfocitário tumoral estromal (sTILs) pré e pós-tratamento e sua composição correlacionando com os desfechos de resposta ao tratamento e a sobrevida. Além de melhor compreensão da interação da neoplasia, microambiente tumoral e resposta à quimioterapia, poderemos ter um resultado que nos encaminhe para testar uma nova combinação de moléculas com valor prognóstico e preditivo de metástases.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

- Avaliar a presença dos infiltrados linfocitários estromais (sTILs) e sua composição em câncer de mama triplo negativo e sua correlação com a resposta ao tratamento neoadjuvante.

#### **3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Quantificar e descrever a composição dos sTILs pré-tratamento;
- Identificar as mudanças de composição sTILs decorrentes da quimioterapia na peça cirúrgica;
- Correlacionar os achados imunológicos com resposta patológica;
- Correlacionar os achados imunológicos com sobrevida global;
- Correlacionar os achados imunológicos com possíveis sítios de metástases.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional de coorte retrospectiva. A unidade de análise foram os casos de câncer de mama triplo negativos que possuíam material de biopsia e peça cirúrgica diagnosticados entre novembro de 2004 a novembro de 2018 e tratados com QT Neo no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), localizado na cidade do Rio de Janeiro.

As pacientes incluídas no estudo foram selecionadas a partir do registro hospitalar de câncer do HUCFF/UFRJ. Dados clínicos e patológicos foram obtidos por consulta do prontuário físico e eletrônico. Identificadas as pacientes com câncer de mama triplo negativas (TNBC). A subclassificação dos tumores de mama por imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada a partir de resultados emitidos pela Anatomia Patológica do HUCFF/UFRJ baseando na avaliação dos RE, RP, HER2 e Ki67.

#### 4.1.1. Critérios de inclusão

- Mulheres com câncer de mama triplo negativo que se submeteram a terapia neoadjuvante no HU e que possuíam amostra tumoral inicial e pós-cirurgia.

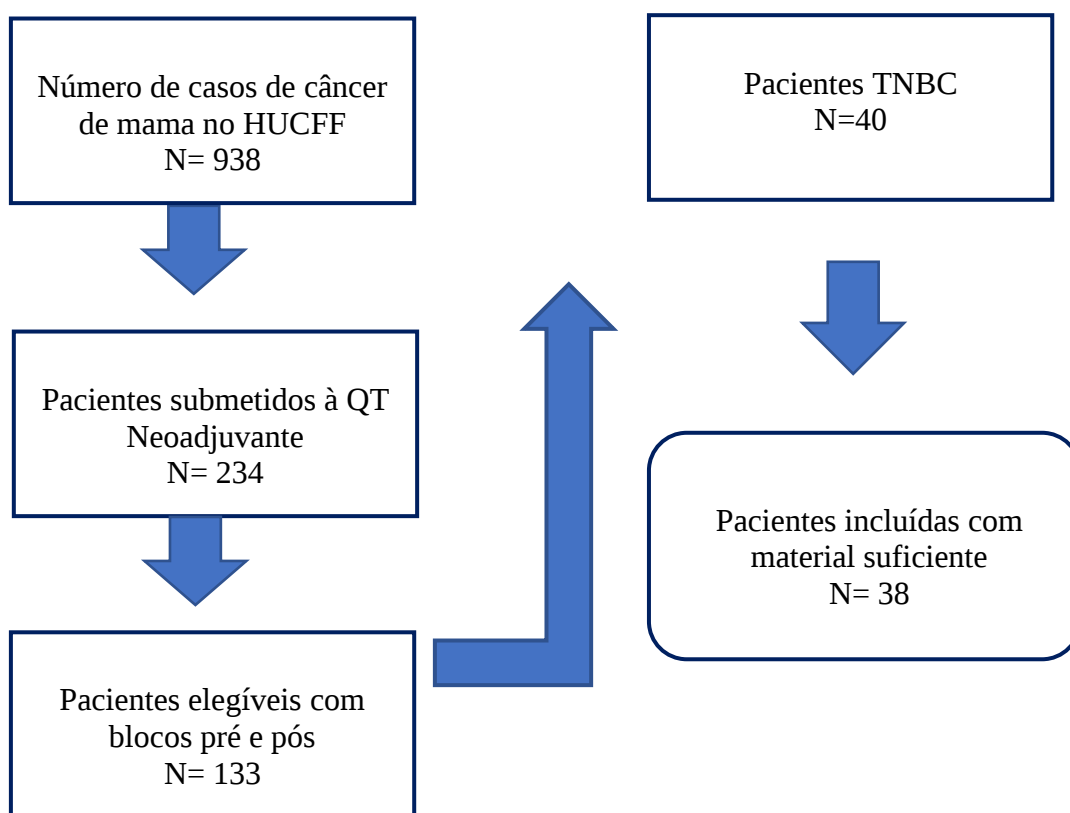
#### 4.1.2. Critérios de exclusão

- Ausência de amostra tumoral inicial adequada;
- Não realização de pelo menos 50% do tratamento programado de quimioterapia neoadjuvante;
- Pacientes com estágio IV.

#### 4.1.3. Avaliação de pacientes

A partir do prontuário foram extraídos os dados clínicos dos pacientes: idade, data do diagnóstico, estadiamento, tratamento realizado, data da cirurgia, data da recorrência, data do óbito ou último seguimento. O estadiamento patológico foi efetuado de acordo com a classificação TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC) 7ª edição.

## FLUXOGRAMA DE SELEÇÃO



## 4.1.4. Avaliação de amostras

A identificação de TNBC: Para seleção dos casos foi utilizada a imuno-histoquímica já existente. Sendo considerados receptores positivos (estrogênio ou progesterona) a coloração de pelo menos 1% dos núcleos, de acordo com as recomendações da ASCO/CAP (ALLISON et al, 2020). O diagnóstico de HER2 é determinado por IHQ 3+ ou IHQ 2+ com FISH amplificado. O ki 67 foi reportado pela patologia de forma contínua. Porém utilizamos como ponto de corte > 20 por ter sido o mesmo utilizado para muitos estudos de neoadjuvância (YERUSHALMI et al, 2010).

A identificação de sTILs: A partir do HE foi selecionado a área de infiltrados linfocitários estromais, dentro da borda da cicatriz tumoral, após exclusão de áreas de carcinoma ductal *in situ*, e zonas tumorais com necrose e artefatos. Foi pontuada a porcentagem média da área de estroma ocupada por células mononucleares, usando as diretrizes do *International TILs Working Group* para avaliação do sTILs no cenário pré-tratamento e pós-quimioterapia (WEISMAN et al, 2016) e a avaliação dos sTILs em peça cirúrgica (pós-

quimioterapia) de acordo com as recomendações do *International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer* (DIECI et al, 2014).

A identificação e quantificação dos sTILs foi realizada de forma cega por dois patologistas experientes e professores da UFRJ. Nenhum dos dois tinha acesso aos dados dos pacientes ou a leitura prévia.

- Magnificação de 200 -400x (ocular 10x com uma objetiva de 20-40x);
- Espessura de corte de 4-5  $\mu$ m;
- O quantitativo de sTILs foi realizada utilizando três categorias predefinidas: leve sTILs (0–10%), sTILs moderado (10–40%) ou sTILs acentuados (40-90%). A quantificação de TILs foi realizada de acordo com a metodologia recomendado pelo grupo de trabalho TILs 2014 (WEISMAN et al, 2016).

A identificação da composição do infiltrado tumoral foi realizada por imuno-histoquímica. Observando a expressão de: CD3, CD4, CD8 e aumento de fatores de imunossupressão como expressão de PD-1 e FOXP3 e a Razão CD8/foxp3. De acordo com a metodologia descrita em etapas no anexo 2.

Foram utilizados os seguintes anticorpos: CD3 o anticorpo da Dako (A0452) com diluição de 1:800, CD8 SP clone (M3162) com diluição de 1:100, CD4 Utilizando o anticorpo Spring (SP35 ) com diluição de 1:100 , FoxP3 e *Bioscience* (14-4777-82) com diluição de 1:100 e o anticorpo PD1 Cell Marque com diluição 1:100. Foram realizadas a contagem de células imunomarcadas em 3 campos da área estromal (Magnificação de 200 -400x (ocular 10x com uma objetiva de 20-40x) e descrita uma média das células contadas.

#### 4.1.5. Definições

- Resposta patológica completa (pCR): ausência de tumor residual na mama e nos linfonodos;
- Sobrevida livre de recidiva: tempo estimado do diagnóstico até recidiva ou óbito
- Sobrevida global: tempo estimado do diagnóstico até o último seguimento ou óbito

#### 4.1.6. Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilha de Excel<sup>R</sup> (Microsoft Office 10). O tratamento estatístico dos dados foi realizado por meio das bibliotecas do R versão 4.1.3, Banco SPSS e o software **JASP** (JASP Team 2022). JASP (Version 0.16.3).

Para comparar médias entre dois estratos foi utilizado o Teste T student, considerando estatisticamente significativo p-valor  $<0,05$ .

Para análise de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier. O início da observação é a data do diagnóstico do primeiro caso incluído e a data de óbito (falha) foi àquela registrada no prontuário ou no banco do SIM.

#### 4.2 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo CEP/UFRJ em 05/03/2020. **CAAE: 28003420.1.0000.5257 (anexo 1).**

## 5. RESULTADOS OBTIDOS

### 5.1. DESCRIÇÃO DOS PACIENTES

Foram avaliadas 133 pacientes tratadas no HUCFF/UFRJ, com diagnóstico de câncer de mama, submetidas à QTNEO seguida de cirurgia no período de setembro/2001 a outubro/2018 e identificadas as pacientes TNBC com critérios para inclusão no estudo (40 pacientes TNBC). O esquema de quimioterapia neoadjuvante utilizado foi baseado em antraciclina e docetaxel usualmente o esquema 3 FEC 3 Docetaxel (Protocolo PACS 01) (ROCHÉ et al, 2006). Após o término de quimioterapia, as pacientes foram encaminhadas para cirurgia de mama (conservadora ou radical) e axila (biopsia de linfonodo sentinela ou linfadenectomia axilar) a critério do cirurgião. Das 40 pacientes TNBC, 38 foram elegíveis por possuírem material histopatológico pré e pós tratamento de quimioterapia. As características clínicas e patológicas dos pacientes estão descritas na tabela 3.

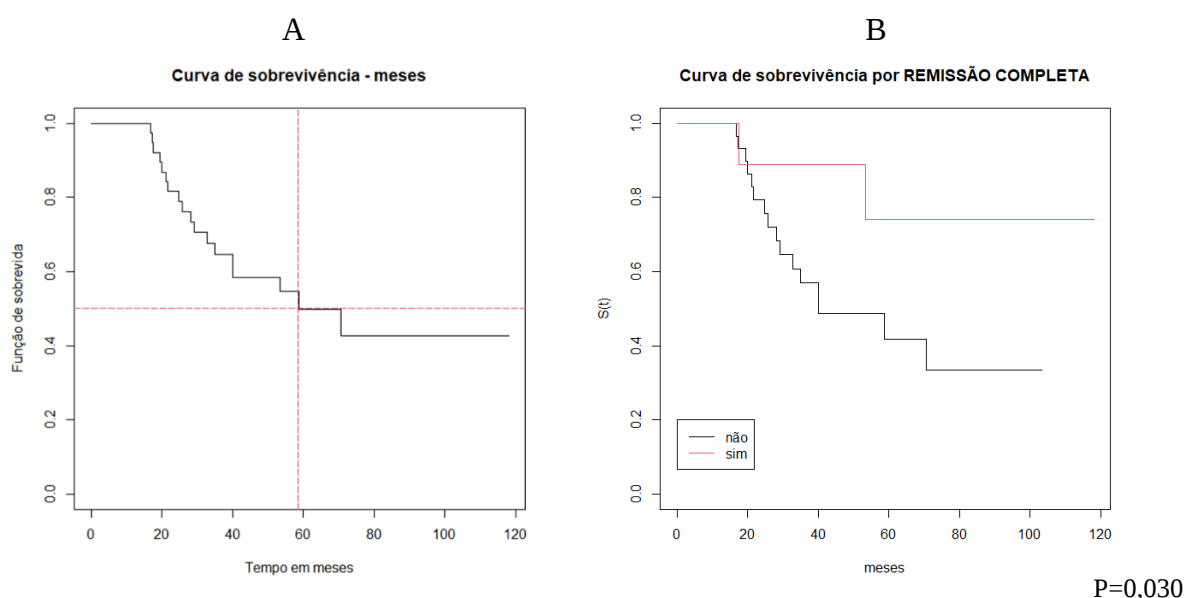
**Tabela 2** - Características clínicas e patológicas de 38 pacientes com TNBC.

|                        |                                                                                                                |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nº de pacientes</b> | <b>38</b>                                                                                                      |
| Idade (anos)           | Media 54 (33-81)                                                                                               |
| Estadiamento (N/%)     | IIA (1/2,6%)<br>IIB (10/26%)<br>IIIA (19/50%)<br>IIIB (3/7,8%)<br>S/I (5/13%)                                  |
| Ki 67 (percentual)     | 13 S/I (34%)<br>2 (5%) $\leq 20\%$<br>24 (63%) $> 20\%$                                                        |
| Tipo histológico (N/%) | Medular (2/5%)<br>Metaplásico (1/ 2,6%)<br>Micropapilar (1/2,6%)<br>Carcinoma ductal infiltrante SOE (34/ 89%) |
| Cirurgia na mama       | Mastectomia a Patey(31/81%)<br>Segmentectomia ou conservadora (7/18%)                                          |
| Abordagem axilar       | Linfadenectomia (30/79%)<br>Pesquisa de linfonodo sentinela (8/21%)                                            |

Características clínicas: Estadiamento clínico baseado no TNM da União Internacional Contra o Câncer (UICC) 7ª edição. Características patológicas: Ki 67 Considerado Baixo  $\leq 20\%$  e alto  $> 20\%$  . Abreviações: S/I sem informação.

Em relação a sobrevida global dos pacientes TBNC estudados, 50% dos pacientes estão vivos em 60 meses (Figura 5). A resposta patológica completa (pCR) foi obtida em 5 pacientes (13%) e um paciente apresentou como doença residual apenas doença microscópica. Como descrito na literatura os pacientes que obtiveram pCR após a quimioterapia neoadjuvante apresentaram melhor sobrevida (Figura 5).

**Figura 5** – Curva de sobrevida em função de tempo (meses). Comparação da sobrevida global de 38 pacientes (A) com a sobrevida global dos pacientes que obtiveram resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante ( pCR ausência de tumor residual na mama e linfonodo ypT0N0M0) (B), utilizando o metodo de Kaplan-Meier.



**A-** Curva de sobrevida da amostra de 38 pacientes (pCR e doença residual).

**B-** Curva de sobrevida por remissão completa (pCR) versus doença residual em 38 pacientes.  $p=0.030$ .

Não (linha preta): não obtiveram resposta patologica completa (pCR); Sim (linha vermelha): obtiveram resposta patologica completa (pCR)

## 5.2 ANÁLISES DE STILS

Cem por cento das amostras de biópsias iniciais estudadas apresentou sTILs. Na biópsia os sTILs se apresentavam de forma leve em 10 (26%) casos, moderado em 22 (58%) e acentuados em 6 (16%). Houve alteração estatisticamente significativa nas categorias de sTILs pré e pós-quimioterapia (leve 10 para 12, moderado 22 para 14 e acentuado 6 para 12). Cerca de 70% dos sTILs leves, 67% dos acentuados e 45% dos moderados, não sofreram alterações e Cerca de 32% de moderados se tornaram acentuados. (Tabela 4).

**Tabela 3** - Proporção de densidades de sTILs (leve, moderado e acentuado) na biopsia (pré) e na peça cirúrgica (pós-quimioterapia), obtidos por Teste de Kappa.

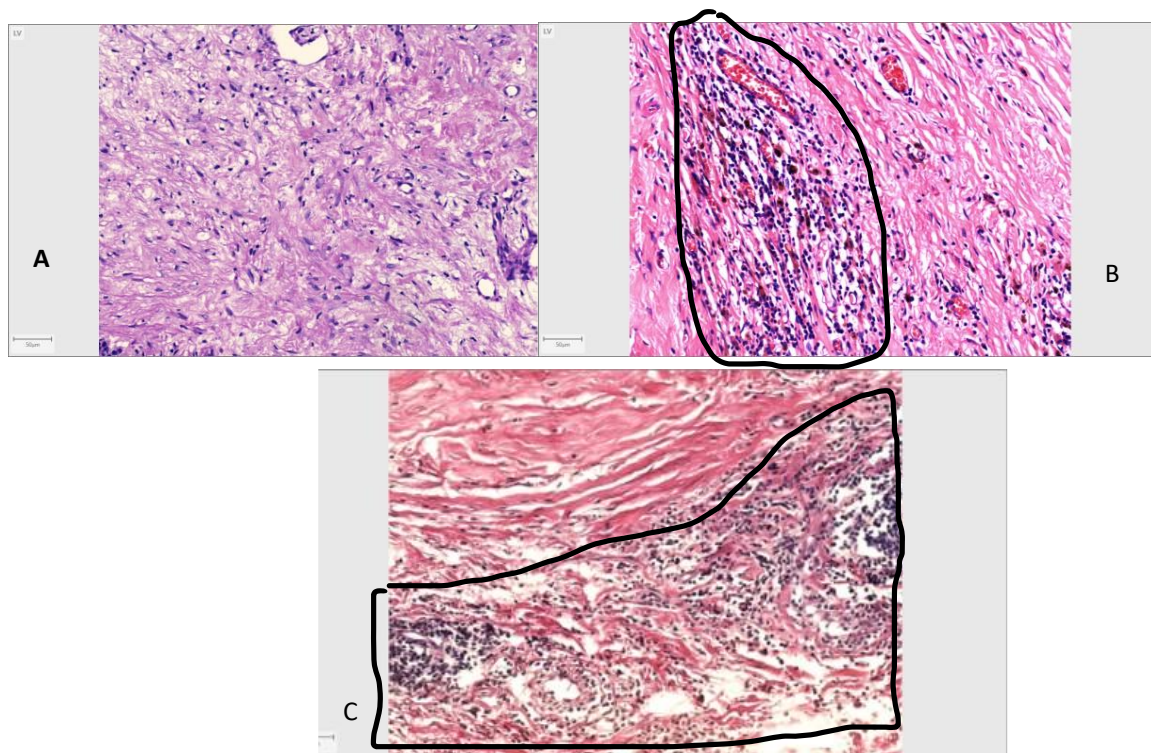
| N<br>sTILs_PRÉ  | 38     | sTILs_PÓS      |                |                |
|-----------------|--------|----------------|----------------|----------------|
|                 |        | LEVE           | MODERADO       | ACENTUADO      |
| LEVE (N/%)      | 10/26% | 7 (70%)        | 2 (20%)        | 1(10%)         |
| MODERADO (N/%)  | 22/58% | 5(23%)         | 10(45%)        | 7(32%)         |
| ACENTUADO (N/%) | 6/16%  | 0 (0%)         | 2(33%)         | 4(67%)         |
| <b>Total</b>    |        | <b>12(32%)</b> | <b>14(36%)</b> | <b>12(32%)</b> |

P= 0,016

A identificação de sTILs foi realizada em 38 pacientes no HE. Foi selecionada a área de infiltrados linfocitários estromais, dentro da borda da cicatriz tumoral, após exclusão de áreas de carcinoma ductal *in situ*, e zonas tumorais com necrose e artefatos.

O quantitativo de sTILs foi analisado, sendo utilizadas três categorias predefinidas: sTILs leve (0–10%), sTILs moderado (10–40%) ou sTILs acentuados (40-90%) (Figura 6). A quantificação de sTILs foi realizada de acordo com a metodologia recomendado pelo grupo de trabalho TILs 2014 (WEISMAN et al, 2016).

**Figura 6** - Ilustração de quantificação de sTILs no HE em biópsia



**A:** sTILs leve (0–10%), **B:** sTILs moderado (10–40%) ou **C:** sTILs acentuados (40-90%)

Foi testada a associação de densidade de sTILs com critérios clínicos de idade, estratificado por faixas etárias, pois a literatura refere que TNBC em idosos tem menor intensidade de sTILs quando comparados com jovens (LOI et al, 2019). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a população com menos de 50 anos e mais de 50 anos em relação a intensidade de sTILs pré ( $p= 0.38$ ) e pós ( $p=0.15$ ). Devendo ressaltar a existência de apenas 8% da amostra acima de 70 anos (tabela 5).

**Tabela 4** - Associação de densidade (leve, moderado e acentuado) de sTILs e faixas etárias, agrupada por 3 faixas etárias: menor que 50 anos, entre 50 anos e 70 anos e maior que 70 anos.

|           | N/%       | Faixa etária<br><50 anos | Faixa etária<br>51-70 anos | Faixa etária<br>>70 anos | P-valor |
|-----------|-----------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|---------|
| sTILs pré | <b>38</b> | 6(16%)                   | 3 (8%)                     | 1(2%)                    | 0,386   |
| Leve      | 10 (26%)  | 7(18%)                   | 13 (34%)                   | 2(5%)                    |         |
| Moderado  | 22 (57%)  | 4 (11%)                  | 2 (5%)                     | 0 (0%)                   |         |
| acentuado | 6 (16%)   |                          |                            |                          |         |
| sTILs pos | <b>38</b> | 5(13%)                   | 6 (16%)                    | 0(0%)                    | 0,151   |
| Leve      | 12 (31%)  | 4 (11%)                  | 8 (21%)                    | 2(5%)                    |         |
| Moderado  | 14 (37%)  | 1 (3%)                   | 7 (18%)                    | 4 (10%)                  |         |
| acentuado | 12 (31%)  |                          |                            |                          |         |

Abreviações: sTILs PRÉ-QT: infiltrados linfocitários estromais na biópsia pré-quimioterapia e sTILs. POS QT: infiltrados linfocitários estromais na peça cirúrgica pós-quimioterapia.

### 5.3 ANÁLISES DE DENSIDADE DE STILS E DESFECHOS

A associação entre densidade de sTILs em biópsia pré-QT e a resposta patológica completa, com desfecho intermediário de sobrevida foi submetida a análise estatística e não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 6).

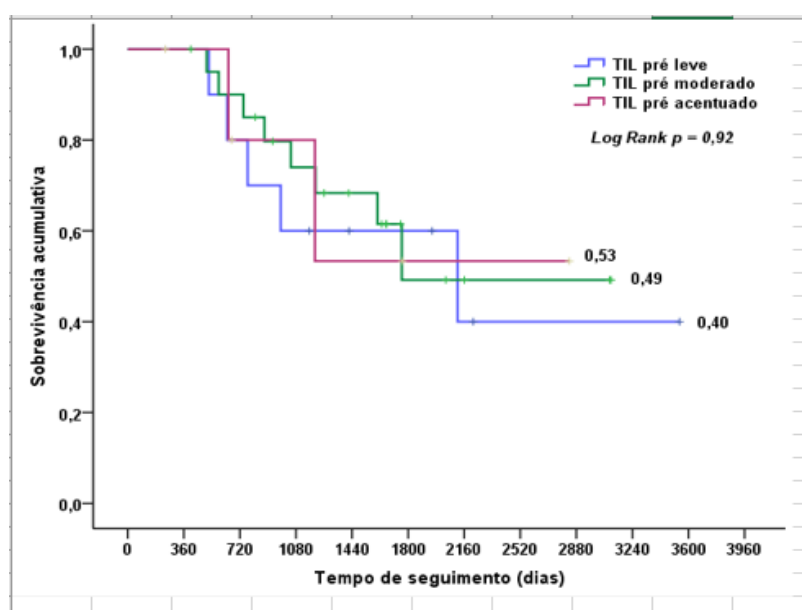
**Tabela 5** - Associação entre densidade de sTILs pré-quimioterapia (biópsia) e resposta patológica completa. Associação entre densidade de sTILs pré-quimioterapia neoadjuvante (biópsia) e resposta.

| sTILs PRE        | Resposta patológica completa (pCR) |               |         |
|------------------|------------------------------------|---------------|---------|
|                  | Não                                | Sim           |         |
| Leve (N /%)      | 8 /80%                             | 2 /20%        | p=0.673 |
| Moderado (N /%)  | 20/90%                             | 2 / 9%        |         |
| Acentuado (N /%) | 5 / 83%                            | 1 /16%        |         |
| <b>Total</b>     | <b>33 /86%</b>                     | <b>5 /13%</b> |         |

Abreviações: N: número total de tumores por extratos de sTILs e %: o percentual de tumores por extratos. pCR: ausência de tumor residual na mama e linfonodo (ypT0N0M0); sTILs PRÉ: infiltrados linfocitários estromais na biópsia pré-quimioterapia.

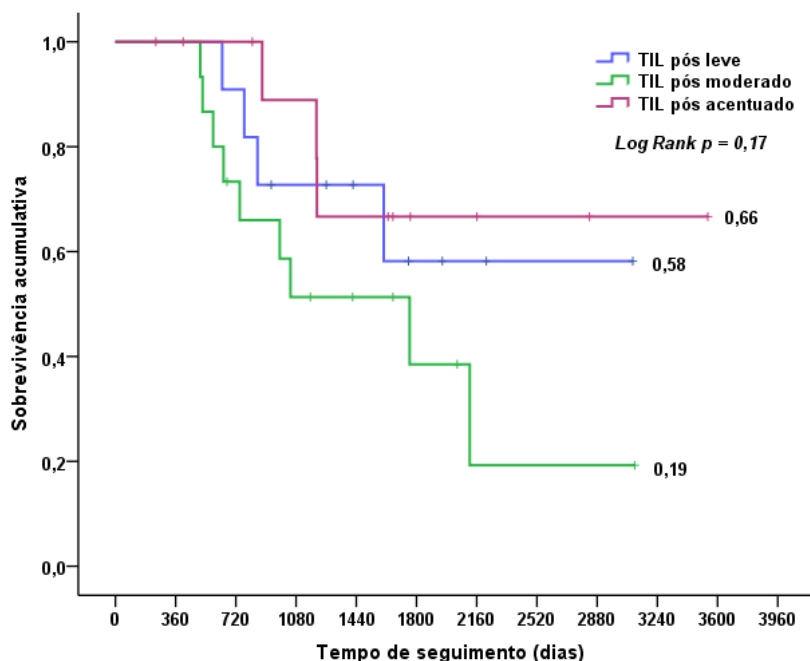
A associação entre densidade de sTILs pré-QT e sobrevida global (figura 7) e densidade de sTILs pós-quimioterapia e sobrevida global (figura 8) não mostraram significância estatística.

**Figura 7** - Associação de densidade de sTILs na biópsia (pré-quimioterapia) e sobrevida global. Curvas comparativas de sobrevida global entre os pacientes que apresentavam na biópsia pré-quimioterapia densidades diferentes de sTILs.



Abreviações: TIL pré leve (em azul): infiltrados linfocitários estromais leves na biópsia pré-quimioterapia; TIL pré moderado (verde): infiltrados linfocitários estromais moderados na biópsia pré-quimioterapia; TIL pré acentuado (vinho): infiltrados linfocitários estromais acentuados na biópsia pré-quimioterapia.

**Figura 8** - Associação de densidades (leve, moderado e acentuado) de sTILs na peça cirúrgica (pós-quimioterapia) e sobrevida global. Utilizando o método estatístico de Kaplan-Meier.

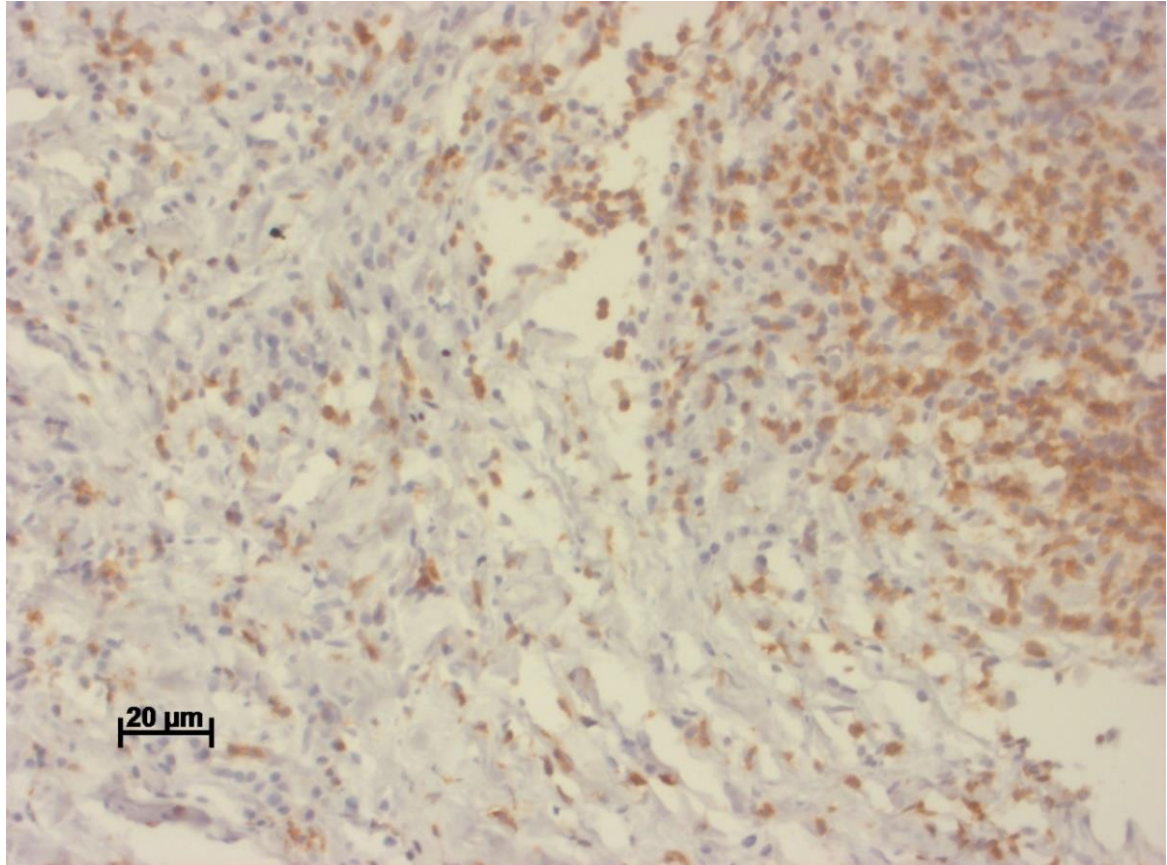


Abreviações: TIL pós leve (em azul): infiltrados linfocitários estromais leves na biópsia pós-quimioterapia; TIL pós-moderado (verde): infiltrados linfocitários estromais moderados na biópsia pós-quimioterapia; TIL pré-acentuado (vinho): infiltrados linfocitários estromais acentuados na biópsia pós-quimioterapia.

#### 5.4 ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DOS STILS

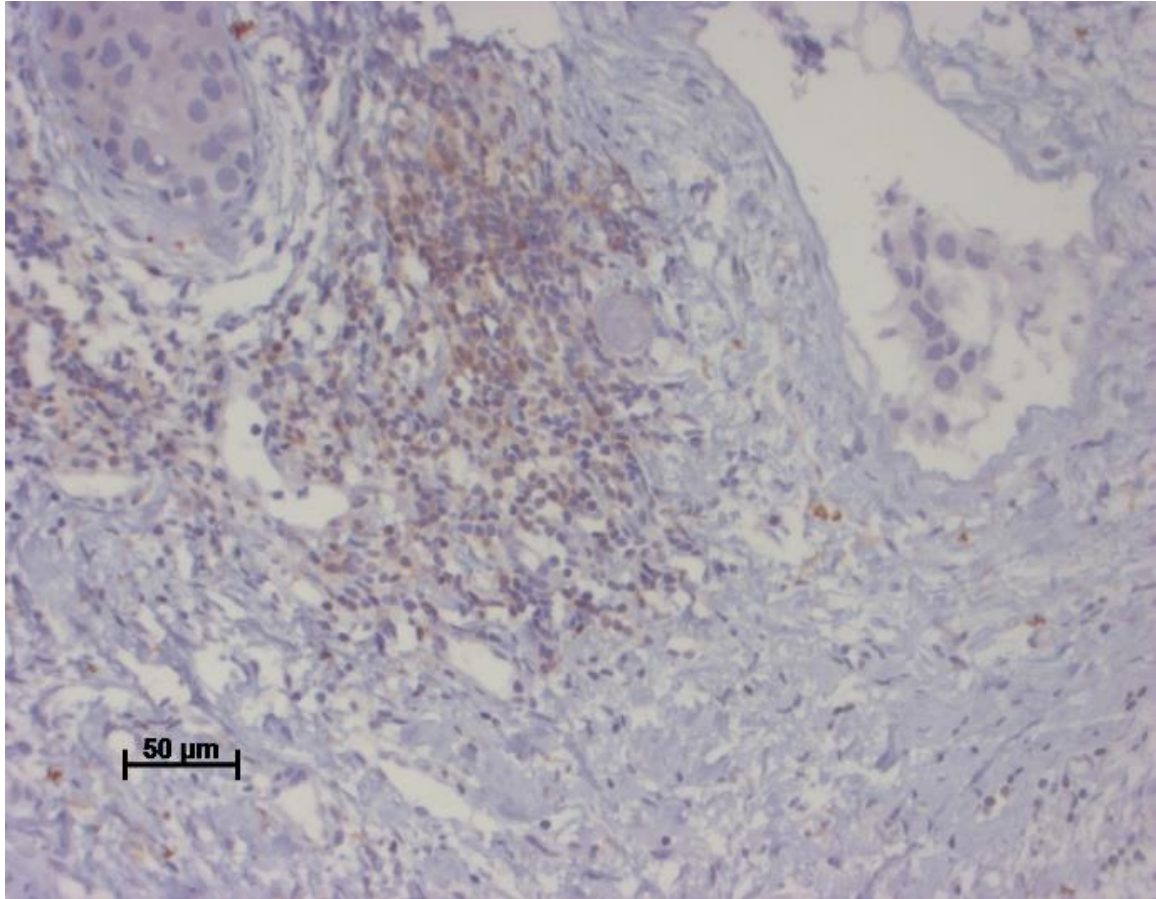
A identificação da composição do infiltrado tumoral foi realizada por imuno-histoquímica. (Figura 9). Observando a expressão de: CD3 (linfócitos T totais), CD4 (linfócitos auxiliares), CD8 (linfócito citotóxico), FOXP3 (fator de transcrição *Foxp3*), PD-1 (Proteína de morte celular programada) e calculada a Razão CD8/*foxp3*.

**Figura 9 A** - Fotografia de corte histológico com imuno marcação positiva para CD3.



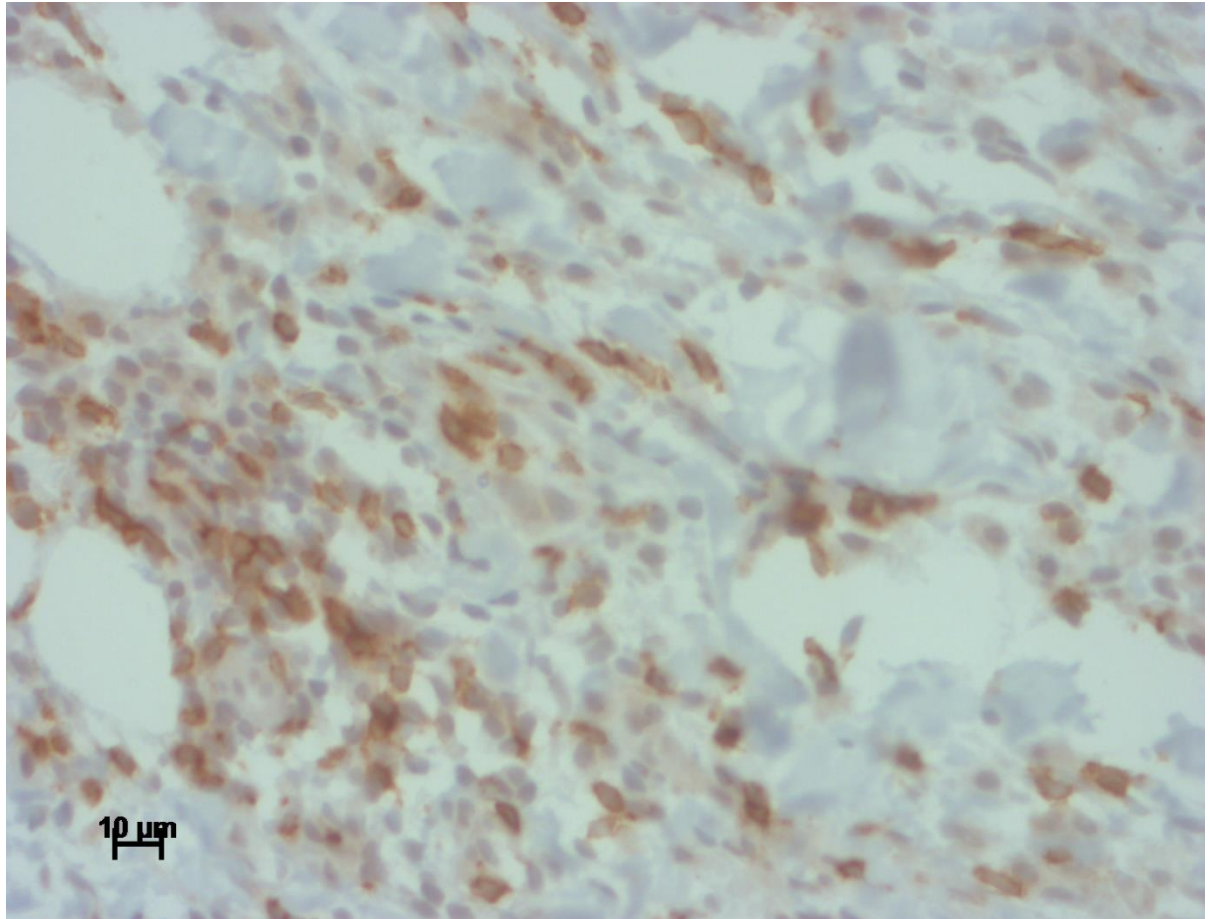
A cor acastanhada corresponde ao citoplasma de linfócitos pan-T (CD3 positivos).

**Figura 10 B** – Fotografia de Corte histológico com imunomarcção para CD4.



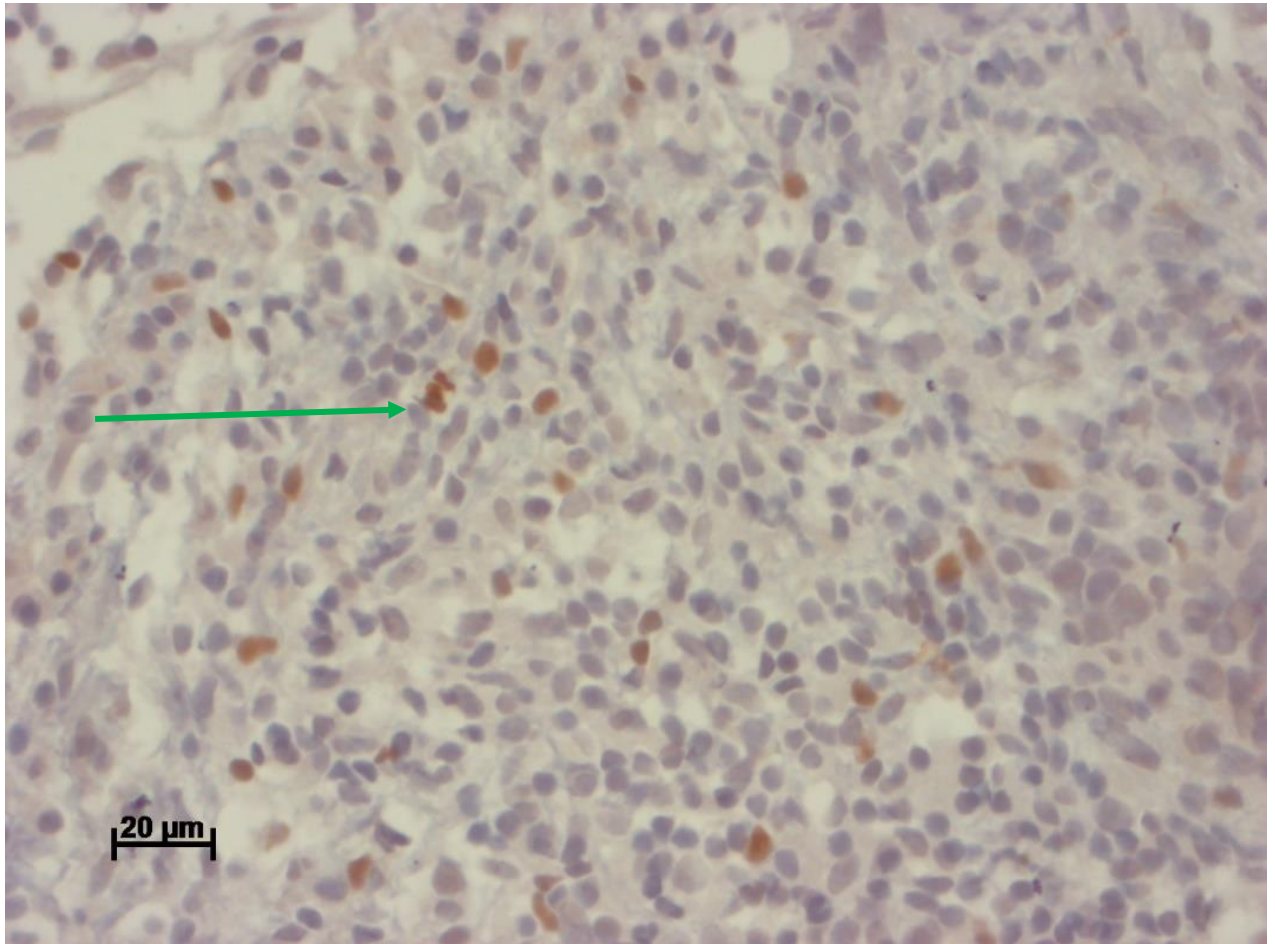
A cor acastanhada corresponde ao citoplasma de linfócitos T auxiliares (CD4 positivos).

**Figura 9C** – Fotografia de Corte histológico com imunomarcação para CD4.



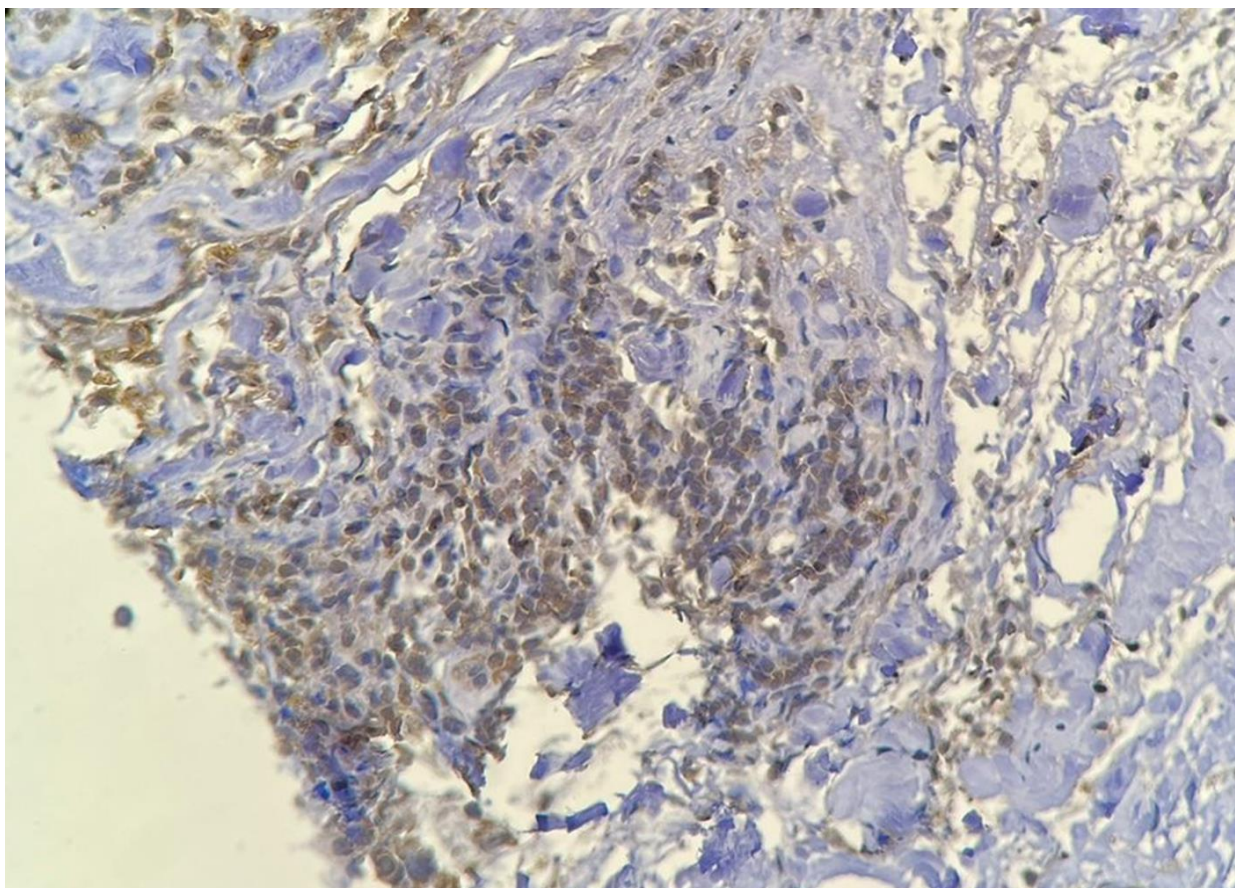
A cor acastanhada corresponde ao citoplasma de linfócitos T citotóxicos (CD8 positivos).

**Figura 11D** – Fotografias de Corte histológico com imunomarcção para FOXP3.



A cor acastanhada corresponde ao núcleo de linfócitos positivos seta verde

**Figura 12E** – Fotografias de imuno-histoquímicas com imuno marcação positivas para PD1.



A cor acastanhada corresponde ao núcleo de linfócitos positivos.

Ao avaliarmos o número de CD3 (linfócitos totais) no sTILs pré-quimioterapia, observamos uma média de mononucleares marcados com anticorpo anti CD3 de: 43 linfócitos no sTILs leves, 84 no sTILs moderados e 98 no sTILs acentuados (Tabela 7).

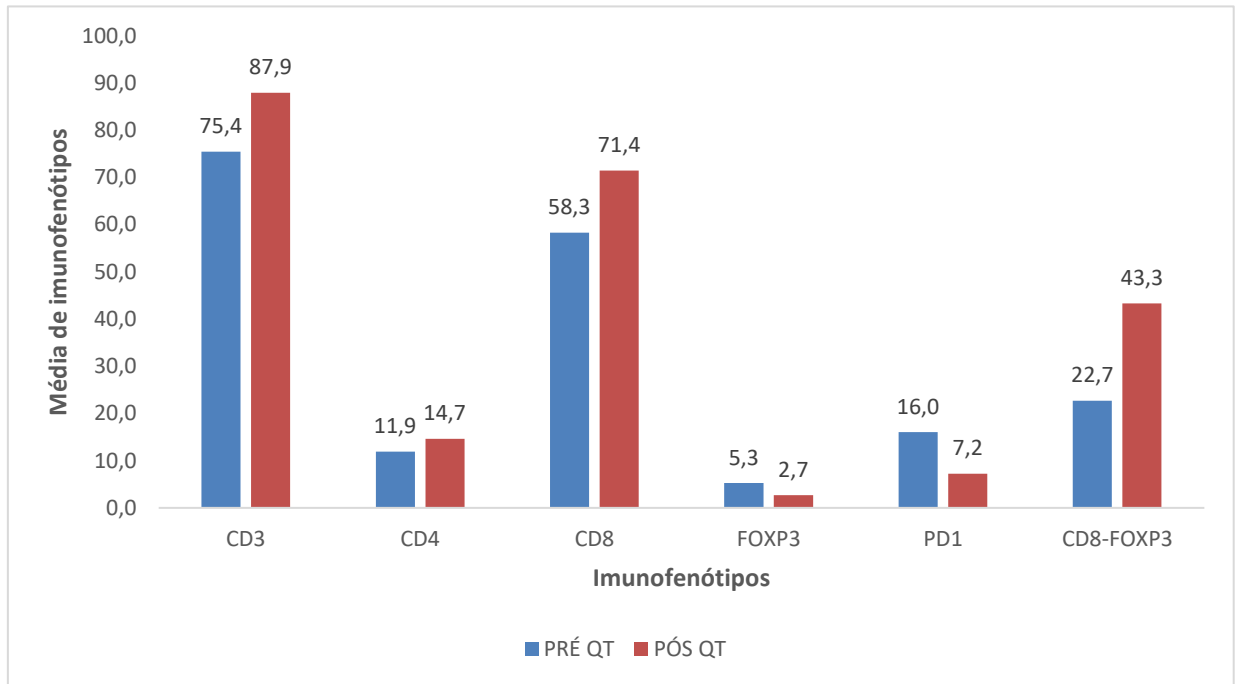
**Tabela 6** - Média de mononucleares marcados com anticorpo anti CD3 em densidades de sTILs: leve, moderado e acentuado em biópsias pré-quimioterapia.

| Descrição de CD3 nas categorias de sTILs PRÉ |      |          |           |
|----------------------------------------------|------|----------|-----------|
|                                              | LEVE | MODERADO | ACENTUADO |
| <b>n</b>                                     | 12   | 14       | 12        |
| <b>Média</b>                                 | 43   | 84       | 98        |
| <b>Desvio padrão</b>                         | 43   | 59       | 81        |
| <b>Mínimo</b>                                | 4    | 0        | 0         |
| <b>Máximo</b>                                | 140  | 190      | 230       |

Abreviações: sTILs PRÉ: infiltrados linfocitários estromais na biópsia pré-quimioterapia.

Ao realizarmos as análises imunofenotípicas de nossas biópsias pré-quimioterapia e compararmos com as amostras cirúrgicas, pós-quimioterapia, observamos um aumento numérico, porém não significativo de células imuno estimulantes: CD3: 75,4 (Dp:63,6) x 88 (Dp:58,6) ; CD8: 58,3 (Dp: 63) x 71,4 (Dp:56) ; (Figura 10).

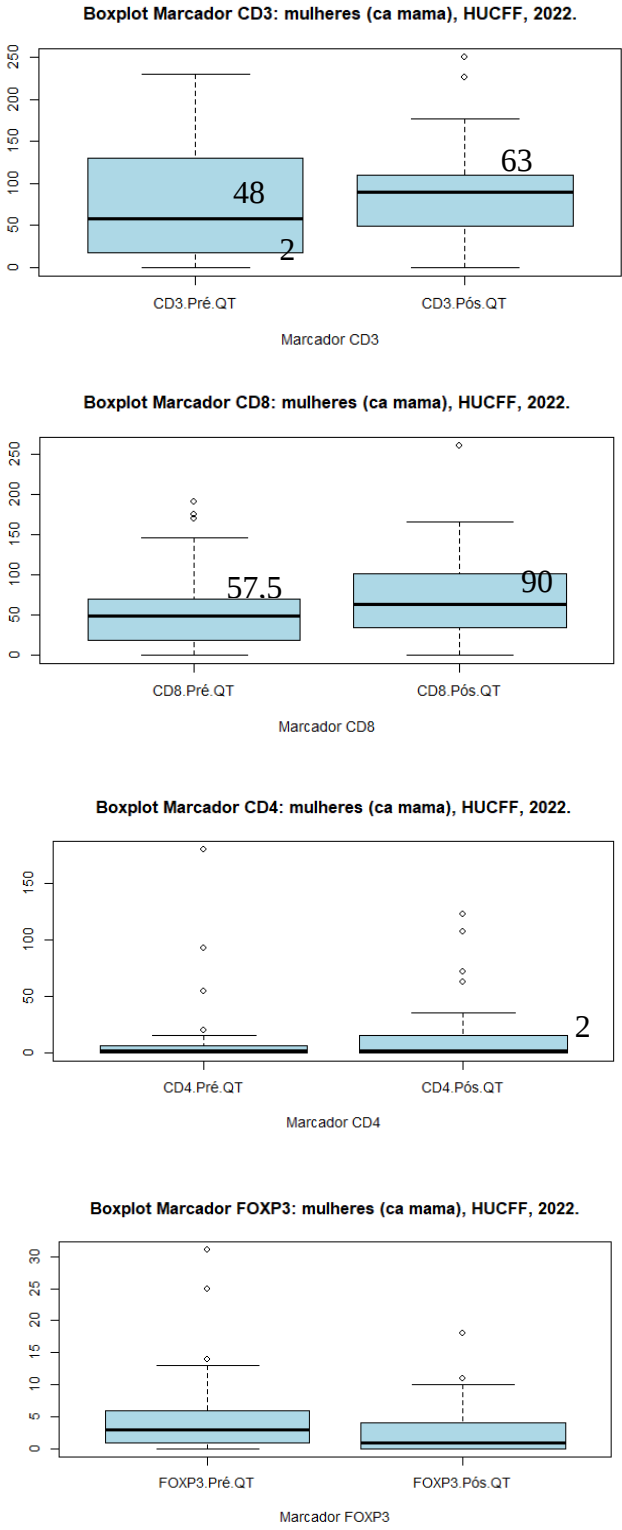
**Figura 13** – Diagrama de barras comparando as médias de mononucleares imunopositivos contáveis em amostras de biópsias pré (em azul) e pós-quimioterapia neoadjuvante (em vermelho).



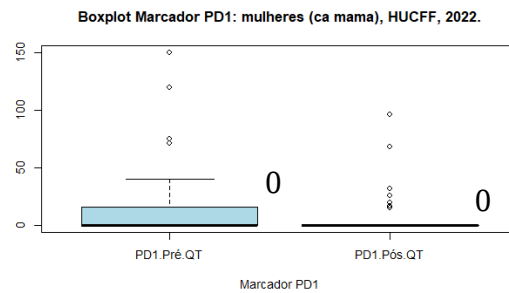
Abreviações: CD3 (linfócitos totais), CD4 (linfócitos auxiliares), CD8 (linfócito citotóxico), PD-1(Proteína de morte celular programada) e FOXP3 (fator de transcrição Foxp3)

Encontramos um aumento significativo da proporção CD8/FOXP3 pré e pós ( $p=0,001$ ) e diminuição significativa de células imuno reguladoras: FOXP3 ( $p=0,027$ ) e PD1 ( $p=0,011$ ) (Figura 11).

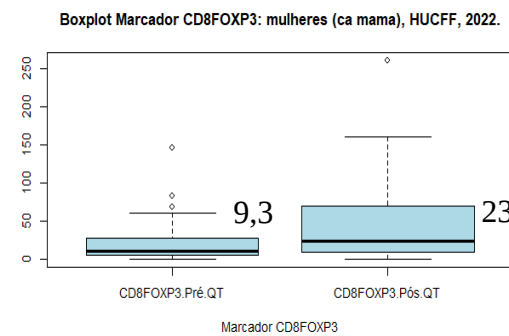
**Figura 14** – Diagrama de caixas comparando as medianas de imunofenótipos em amostras de biópsias pré e pós-quimioterapia: CD3, CD8, CD4, FOXP3 e PD1.



(p=0,027)



(p=0,011)

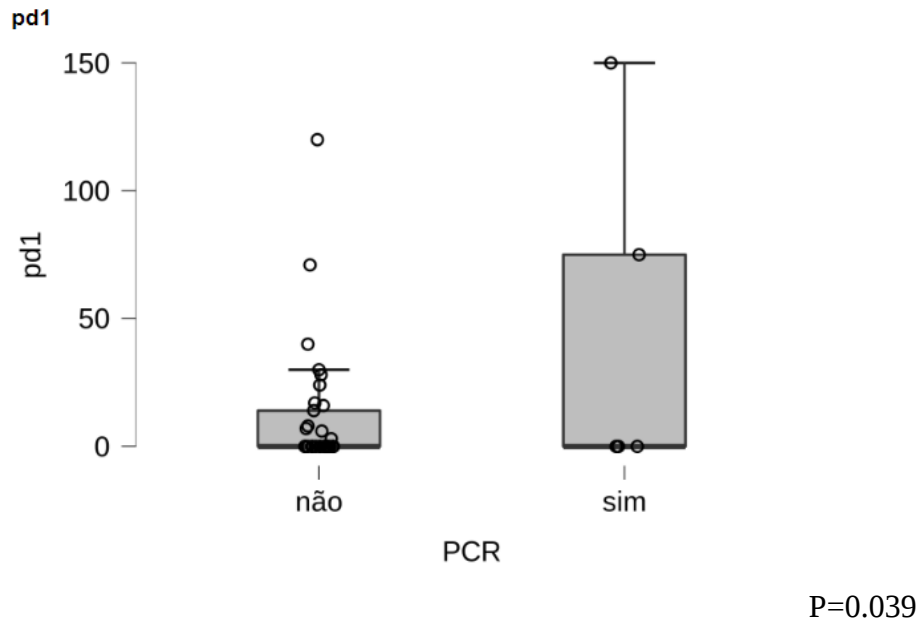


(p=0,001)

Aumento significativo da proporção CD8/FOXP3 pré e pós (p=0,001) e diminuição significativa de células imuno reguladoras: FOXP3 (p=0,027) e PD1 (p=0,011). Abreviações: CD3 (linfócitos totais), CD4 (linfócitos auxiliares), CD8 (linfócito citotóxico), PD-1(Proteína de morte celular programada) e FOXP3 (fator de transcrição Foxp3). HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

As análises de correlação dos imunofenótipos que compõem os sTILs na biópsia pré e a resposta ao tratamento com quimioterapia foram realizadas utilizando, como desfecho final, a resposta patológica completa (pCR), com a intenção de identificar algum possível biomarcador de resposta à quimioterapia. Observamos que apenas a intensidade de PD1 se correlacionou significativamente com pCR. (Figura 12A)

**Figura 15 A** - Correlação de mediana de células imunomarcadas por anticorpo anti-pd1 em amostras de biópsias pré e a obtenção de pCR utilizando o diagrama de caixas.



Abreviações: pCR: ausência de tumor residual na mama e linfonodo; PD1: proteína celular de morte programa (*programmed cell death protein*).

**Figura 12 B** - T-Teste para avaliação de imunofenotipos em amostras independentes de biópsia pré e pós e a obtenção de pCR

|           | t      | df | p                  |
|-----------|--------|----|--------------------|
| CD3       | -0.309 | 36 | 0.759              |
| CD3_pos   | -0.852 | 35 | 0.400              |
| CD4       | 0.484  | 36 | 0.631              |
| CD8       | -0.623 | 35 | 0.537              |
| FOXP3     | -0.662 | 36 | 0.512              |
| pd1       | -2.147 | 36 | 0.039 <sup>a</sup> |
| CD4_pos   | 0.284  | 36 | 0.778              |
| CD8_pos   | -0.446 | 36 | 0.659              |
| FOXP3_pos | -1.326 | 36 | 0.193              |
| Pd1_pos   | -1.583 | 36 | 0.122              |

Abreviações: t: *student's T- test*; df: número de dados comutados. P: p-value <sup>a</sup>:Brown -Forsythe teste de significância (p<0,5)

Ao realizarmos a análise de idade, densidade de sTILs pré ou pós-quimioterapia e composição de imunofenótipos dos sTILs pré ou pós com óbito não encontramos nenhuma

correlação significativa (tabela 8). De forma semelhante a literatura observamos correlação significativa com pCR.

**Tabela 7** – Tabela descritiva de variáveis analisadas ( idade por faixa, densidade de TIL.preQT e composição de sTILs) e sua associação com o desfecho de resposta patológica completa. Associação de pCR com óbito e recidiva do câncer.

| Cancer HUCFF: variáveis clínicas e desfechos |    |                         |                              |              |                      |
|----------------------------------------------|----|-------------------------|------------------------------|--------------|----------------------|
| Variável                                     | N  | N (%) = 38 <sup>1</sup> | Resposta patológica completa |              | p-value <sup>2</sup> |
|                                              |    |                         | Não, N = 32                  | sim, N = 6   |                      |
| <b>IDADE</b>                                 | 38 | 52.9 (11.7)             | 53.2 (11.9)                  | 51.3 (11.6)  | 0.602                |
| <b>FAIXA ETÁRIA</b>                          | 38 |                         |                              |              | 0.173                |
| < 50 anos                                    |    | 17 (44.7%)              | 13 (40.6%)                   | 4 (66.7%)    |                      |
| 51-70 anos                                   |    | 18 (47.4%)              | 17 (53.1%)                   | 1 (16.7%)    |                      |
| > 70 anos                                    |    | 3 (7.9%)                | 2 (6.2%)                     | 1 (16.7%)    |                      |
| <b>TIL.PRE QT</b>                            | 38 |                         |                              |              | 0.841                |
| LEVE                                         |    | 10.0 (26.3%)            | 8.0 (25.0%)                  | 2.0 (33.3%)  |                      |
| MODERADO                                     |    | 22.0 (57.9%)            | 19.0 (59.4%)                 | 3.0 (50.0%)  |                      |
| ACENTUADO                                    |    | 6.0 (15.8%)             | 5.0 (15.6%)                  | 1.0 (16.7%)  |                      |
| <b>CD3.PRÉ QT</b>                            | 38 | 75.4 (65.6)             | 70.5 (61.3)                  | 101.7 (87.3) | 0.357                |
| <b>CD4.PRÉ QT</b>                            | 38 | 11.9 (32.9)             | 13.2 (35.7)                  | 4.7 (5.4)    | 0.636                |
| <b>CD8.PRÉ QT</b>                            | 37 | 58.3 (51.7)             | 57.4 (51.4)                  | 62.8 (58.3)  | 0.837                |
| (Missing)                                    |    | 1                       | 1                            | 0            |                      |
| <b>FOXP3.PRÉ QT</b>                          | 38 | 5.3 (7.0)               | 5.1 (6.6)                    | 6.0 (9.6)    | 0.792                |
| <b>PD1.PRÉ QT</b>                            | 38 | 16.0 (33.9)             | 11.8 (25.2)                  | 38.5 (62.1)  | 0.011                |
| <b>óbito</b>                                 | 38 |                         |                              |              | 0.030                |
| sim                                          |    | 16.0 (42.1%)            | 16.0 (50.0%)                 | 0.0 (0.0%)   |                      |
| não                                          |    | 22.0 (57.9%)            | 16.0 (50.0%)                 | 6.0 (100.0%) |                      |
| <b>recidiva</b>                              | 34 |                         |                              |              | 0.078                |
| sim                                          |    | 18 (52.9)               | 17 (60.7)                    | 1 (16.7)     |                      |
| não                                          |    | 16 (47.1)               | 11 (39.3)                    | 5 (83.3)     |                      |
| Sem informação                               |    | 3                       | 3                            | 0            |                      |

Abreviações:<sup>1</sup> N: media (pd) ou frequência (% ); TIL.PRE QT: infiltrados linfocitários estromais na biópsia pré-quimioterapia; sTILs. Sim: presença de resposta patológica completa (ypT0N0M0) e Não: ausência de resposta patológica completa (doença residual presente). CD3 (linfócitos totais), CD4 (linfócitos auxiliares), CD8 (linfócito citotóxico), PD-1(Proteína de morte celular programada) e FOXP3 (fator de transcrição Foxp3).Óbito: número de pacientes que evoluíram para óbito e recidiva: número de pacientes que evoluíram para recidiva

## 5.5 IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS DE METÁSTASES

Foi realizado o seguimento dos 38 pacientes deste estudo e identificados os locais, datas de recidivas e óbitos. Com a data de recidiva e último seguimento foi calculado o tempo de sobrevida livre de recidiva e o com o óbito e data do seguimento, o tempo de sobrevida global. Na **tabela 9** descrevemos os locais de metástases mais frequentes ao longo do seguimento,

através de exame clínico e imagem. Devendo ser observado, que alguns pacientes tiveram mais de um sítio de metástases.

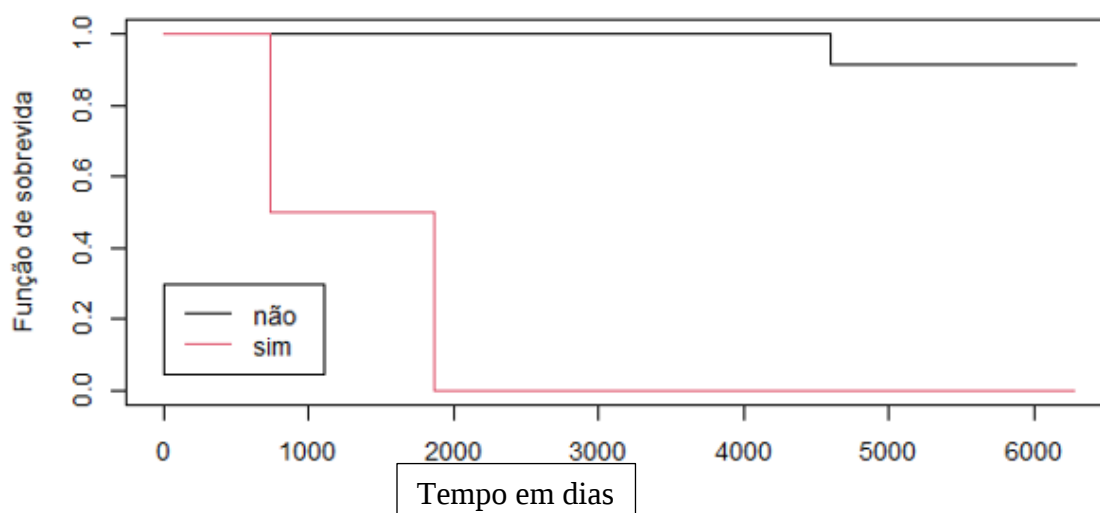
**Tabela 8** - Descrição dos sítios de metástases mais frequentes nos 38 pacientes incluídos. Estatística descritiva dos locais de metástases descritos ao longo do seguimento (tempo de acompanhamento).

|          | Sítio metástase | Pulmão  | Osso    | SNC     | Fígado | Local   | Pleura | Peritônio |
|----------|-----------------|---------|---------|---------|--------|---------|--------|-----------|
| Válidos  | 38              | 9       | 7       | 6       | 3      | 12      | 3      | 1         |
| Ausentes | 0               | 29(24%) | 31(18%) | 32(16%) | 35(8%) | 26(32%) | 35(%)  | 37 (2%)   |

Abreviações: SNC – sistema nervoso Central

A sobrevida livre de recidiva se correlaciona com a sobrevida neste estudo assim como na literatura (figura 13). Pacientes que apresentaram recidiva (53%), evoluíram a óbito em 5 anos (sobrevida mediana de 2 anos).

**Figura 16** - Comparação da sobrevida (dias) de pacientes que apresentaram recidiva e os que não apresentaram recidiva. Abreviações: sim (em vermelho): pacientes que apresentaram recidiva; não (em preto): pacientes que não apresentaram recidiva.



Foi avaliado a correlação entre as imuno-histoquímica de composição dos sTILs e os sítios metastáticos, não encontrando nenhuma correlação significativa, mas com uma tendência a significância apenas FOXP3 pré e PD1 pré (biópsia) e o sítio de metástase hepática ( $p=0.062$ )

ilustrado (Tabela 10) e FOXP3 pré (biópsia) e metástase pulmonar ( $p=0.062$ ) conforme (Tabela 11).

**Tabela 9** - Correlação entre sítios de metástases hepáticas e composição dos infiltrados linfocitários estromais (sTILS)

|            | t      | df | p     |
|------------|--------|----|-------|
| CD3.PRE    | -0.158 | 36 | 0.875 |
| CD4.PRE    | 0.724  | 36 | 0.474 |
| CD8.PRE    | -0.797 | 35 | 0.431 |
| FOXP3.PRE  | -1.924 | 36 | 0.062 |
| pd1        | 0.572  | 36 | 0.571 |
| CDE/FOXpre | 1.203  | 36 | 0.237 |
| CD3.POS    | -0.400 | 36 | 0.691 |
| CD8.POS    | -0.599 | 36 | 0.553 |
| FOXP3.POS  | -0.727 | 36 | 0.472 |
| pd1_16     | 0.855  | 36 | 0.398 |

Abreviações: t: *student's T- test*; df: número de dados comutados. P: p-value : significância ( $p<0,5$ )

CD3. PRE (linfócitos totais pré QT), CD4.PRE (linfócitos auxiliares pré QT), CD8. PRÉ (linfócito citotóxico pré QT), pd1-(Proteína de morte celular programada pré QT), pd1-16 -(Proteína de morte celular programada pós QT), e FOXP3 PRE. (fator de transcrição Foxp3 pré QT)

**Tabela 10** - Correlação entre sítios de metástases pulmonares e composição dos infiltrados linfocitários estromais (sTILS)

|            | t      | df | p     |
|------------|--------|----|-------|
| CD3.PRE    | -0.158 | 36 | 0.875 |
| CD4.PRE    | 0.724  | 36 | 0.474 |
| CD8.PRE    | -0.797 | 35 | 0.431 |
| FOXP3.PRE  | -1.924 | 36 | 0.062 |
| pd1        | 0.572  | 36 | 0.571 |
| CDE/FOXpre | 1.203  | 36 | 0.237 |
| CD3.POS    | -0.400 | 36 | 0.691 |
| CD8.POS    | -0.599 | 36 | 0.553 |
| FOXP3.POS  | -0.727 | 36 | 0.472 |
| pd1_16     | 0.855  | 36 | 0.398 |

Abreviações: t: *student's T- test*; df: número de dados comutados. P: p-value : significância ( $p<0,5$ )

CD3. PRE (linfócitos totais pré QT), CD4.PRE (linfócitos auxiliares pré QT), CD8. PRÉ (linfócito citotóxico pré QT), pd1-(Proteína de morte celular programada pré QT), pd1-16 -(Proteína de morte celular programada pós QT), e FOXP3 PRE. (fator de transcrição Foxp3 pré QT)

## 6. DISCUSSÃO

A importância da interação do microambiente tumoral e as células do sistema imune no comportamento das células neoplásicas é inquestionável, especialmente em câncer de mama triplo negativo. Entretanto, a literatura ainda é bastante controversa existindo inúmeras lacunas de conhecimento a esse respeito.

Neste estudo retrospectivo avaliamos os sTILs em biópsias e peças cirúrgicas pós-quimioterapia de pacientes com diagnóstico de TNBC tratadas em uma única instituição pública por vários anos, com o objetivo de descrever e quantificar a composição do pré-tratamento (subpopulações), identificar as mudanças no padrão imunológico decorrentes da quimioterapia e correlacionar com resposta patológica completa (pCR) e sobrevida Global (SG). Apesar do longo período, um pequeno número de pacientes foi incluído devido principalmente a dificuldade de obtenção de material anátomo patológico, especialmente material pré-tratamento, pois várias pacientes realizaram punção aspirativa (PAAF) no momento do diagnóstico, e outras possuíam material insuficiente para realizar todas as IHQ. Outros motivos para exclusão do estudo foram perda de seguimento, interrupção de tratamento ou realização de cirurgia fora do HUCFF, impossibilitando o acesso ao material pós-cirúrgico.

As 38 pacientes incluídas com TNBC, apresentavam o perfil clínico patológico descrito na literatura nacional e internacional, com mediana de idade de 54 anos, a maioria com diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal infiltrante sem especificação (SOE) e ki 67 elevados. A única diferença foi no volume tumoral, pois em nossa amostra as pacientes apresentavam ao diagnóstico estádios mais avançados, cerca de 84% delas apresentavam tumores maiores que 5cm e/ou linfonodos positivos, enquanto na literatura tumores maiores que 1cm eram incluídos. Esses achados provavelmente se devem ao retardo no diagnóstico e início de tratamento. Os protocolos de quimioterapias QTNEO para TNBC não sofreram grandes modificações neste período, nem no cenário público, nem no privado, ao contrário do que aconteceu para outros subtipos moleculares de câncer de mama. O tratamento padrão para pacientes com TNBC continua sendo as antraciclinas e os taxanes. A única mudança no protocolo se deve a indicação precoce de quimioterapia nos TNBC, sendo indicado a QTNEO a partir de 1 cm de tumor ou axila positiva. O grande volume tumoral provavelmente justifica a inferioridade de resposta à quimioterapia obtida por estes pacientes quando comparados à literatura mundial e a hospitais privados nacionais, pois sabemos que quanto maior o tamanho do tumor menor a chance de regressão total. Apenas 5 pacientes obtiveram pCR

correspondendo a 13% dos casos, enquanto em estudo semelhante publicado pela mesma autora em clínica privada do Rio de Janeiro a pCR foi de 37.8% (SERMOUD, GAUI et al, 2021). O pequeno número de pCR obtido, associado ao pequeno número de pacientes incluídos, pode ter sido responsável pela dificuldade de correlação entre a pCR e algumas variáveis patológicas.

Entretanto, mesmo com um pequeno número de pCR conseguimos demonstrar, assim como a literatura, que pacientes com pCR apresentaram maior sobrevida como demonstrado no gráfico 2 e tabela 8. A resposta anatomopatológica completa (pCR) é considerada o melhor indicador de resposta ao tratamento especialmente no subtipo de TNBC, podendo ser considerado um indicador de desfecho intermediário para sobrevida. Esse achado foi descrito em diversos estudos, porém consagrado com o estudo do *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*, NSABP B18 (FISCHER et al. 2018). No entanto, a observação apenas de pCR, não possibilita a distinção entre volumes de doenças residuais e, consequentemente graus de respostas, que também tem valores prognósticos distintos. Desta forma, diversos autores vem propondo diferentes classificações que possam adicionar informações prognósticas quando a pCR não é alcançada. A classificação mais empregada e fortemente validada é a *residual tumor burden* (RBC), proposta pelo grupo do hospital M.D.Anderson, uma abordagem metodológica padronizada, cujo objetivo é avaliar e quantificar a extensão da doença residual na mama e linfonodos axilares após quimioterapia neoadjuvante. Seis variáveis são incluídas no cálculo da fórmula e 4 categorias de respostas são possíveis: pCR, RCB-I (*minimal residual disease*), RCB-II (*moderate residual disease*) e RCB-III (*extensive residual disease*). O escore RCB foi prognóstico dentro de cada subtipo de câncer de mama, com maior escore de RCB significativamente associado a pior sobrevida livre de eventos (SYMMANS et al, 2007). Este seria o método mais adequado para avaliarmos a doença residual em nosso estudo, considerando a baixa taxa de pCR alcançada. Porém, por se tratar de um estudo retrospectivo de longa data, não foi possível a análise das variáveis demandadas para o cálculo de RBC.

As ações de quimioterápicos (QT) como estimuladores da resposta imune tem sido descrita por vários autores (BRACCI et al., 2014; SCHIAVONI et al., 2011). Os quimioterápicos promovem a apoptose celular liberando vários antígenos que são detectados por células dendríticas com sua posterior ativação e recrutamento de células T citotóxicas ao leito tumoral, assim como podem modular diretamente o microambiente tumoral. Essa modulação ocorre através da depleção preferencial de células estromais que suprimem e neutralizam respostas imunes antitumorais, como populações de células mieloides e Tregs (OPZOOMER et al, 2019). Os efeitos imunoestimulantes dos QT são dependentes da classe de

quimioterapia, dose e sensibilidade das células tumorais ao agente. Tanto as antraciclinas (MATTAROLLO et al, 2011) como os taxanes (MICHELS et al, 2012), utilizados no esquema de QTNEO das pacientes deste estudo, são quimioterápicos comumente relacionados com a iniciação e promoção deste processo. Para avaliar a ação da QTNEO nos sTILs comparamos os achados de biópsia (pré) com os achados da peça cirúrgica (pós). Os sTILs foram observados em 100% das amostras de biópsias e peças cirúrgicas, sendo acentuado em 6 biópsias (16%) e 12 peças cirúrgicas (32%).

Não encontramos diferença de categorias de sTILs entre faixas etárias e estadiamentos na nossa amostra, diferente do resultado descritos em robusta meta-análise que refere TILs mais baixos entre idosos, tumores maiores, com maior envolvimento linfonodal e menor grau histopatológico (LOTFINEJAD et al, 2020).

O TNBC tem maior chance de recorrência local e visceral como fígado, pulmão e cérebro (SMID et al, 2008), de forma diferente das neoplasias luminais que apresentam metástases ósseas mais frequentemente. Em nossa amostra observamos maior recorrência local (32%), pulmonar (24%) e metástase cerebral (16%), semelhante à descrita na literatura. Não conseguimos encontrar uma correlação significativa entre densidade de sTILs ou seus componentes com sitio de metástases, mas existiu uma tendência de correlação entre positividade de FOXP3 na biópsia e a presença de metástase hepática e pulmonar e PD1 com metástase hepática. O pequeno número de casos pode ter influenciado o resultado negativo, devendo esta correlação ser avaliada em estudo mais robusto.

Houve alteração estatisticamente significativa nas categorias de sTILs pré e pós-quimioterapia (leve 10 para 12, moderado 22 para 14 e acentuado 6 para 12). Cerca de 70% dos sTILs leves não sofreram alteração se mantendo leves. (tabela 4) Entre os moderados, 32% se tornaram acentuados, nos fazendo crer que este grupo de tumores é o que melhor se beneficia da ativação imunogênica da QTNEO e posterior imunoterapia. Em nossa amostra neoplasia com sTILs leves na biópsia (neoplasias pouco antigênicas “frias”) não conseguiram se tornar “quentes” com a indução de quimioterapia (GALON e BRUNI, 2019). Provavelmente sTILs leves não serão bons candidatos a imunoterapia. A Correlação entre sTILs pré-QT e pCR não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 4). A correlação de sTILs pré-QTNEO e sTILs pós-QTNEO e sobrevida Global (figura 8) também não foi significativa. Estes achados foram diferentes da literatura onde o fator prognóstico dos sTILs estão consolidados, podendo este ser considerado um biomarcador para uso clínico. Este resultado pode ter sido influenciado pelo pequeno número de pCR e pequeno número de pacientes incluídos no estudo. Uma análise

de sTILs pós-quimioterapia, nos pacientes que não obtiveram pCR foi também realizada, na tentativa de reproduzir os achados de Luen em 2019, que indicam que o nível de TILs em doença residual de TNBC são significativamente relacionados com aumento de sobrevida podendo adicionar informação principalmente em RBC II (GARCIA-MARTINEZ et al, 2014), mas também não conseguimos encontrar correlação.

Entretanto, ao identificarmos as populações de células que compõem os sTILs e compararmos entre pré e pós-quimioterapia percebemos que existe uma ativação de células a favor da imunidade e atividade anti tumoral (CD3, CD8, Relação CD8/foxp3) e um decréscimo de células inibidoras das atividades tumorais de Foxp3 e Pd1 (Figura 10), existindo uma significância estatística no aumento da razão CD8/FOXP3 ( $p=0,001$ ), e decréscimo de FOXP3 ( $p=0,027$ ) e PD1 ( $p=0,011$ ). A regulação do TME pela quimioterapia tem sido relatada na literatura (HONGMEI et al, 2021) ocasionando aumento de CD8 e diminuição de Foxp33 (LADOIRE et al, 2008). Uma forte relação de CD8/Foxp3 também tem sido relacionado a uma maior pCR (MIYASHITA et al, 2014). Na nossa amostra observamos que apenas o PD1 pré teve uma correlação significativa com pCR (Figura 12 e tabela 8). Apesar de existir um importante aumento numérico da razão CD8/foxp3 este não foi significativo.

Na literatura tem sido bastante explorada a correlação de PD1 com a imunoterapia, principalmente no tratamento de câncer de mama metastático. Os braços controles dos estudos que associaram quimioterapia com ou sem imunoterápicos demonstraram maior benefício da adição de imunoterapia quando PDL1 foi positiva (VON MINCKWITZZ et al, 2014). Entretanto, o PD1/PDL1 não se mostrou um bom biomarcador como preditor de resposta à imunoterapia na neoadjuvancia. Em relação a quimioterapia não existem estudos robustos avaliando a presença de PD1 em TILs e resposta à quimioterapia isolada. Estudo translacional do “ETNA TRIAL” sugere que o PDL1/PD1 positivos na biópsia seja um marcador de resposta à quimioterapia independente de TILs. Outro pequeno estudo italiano (CERBELLI et al, 2017) observa que PDL1 com positividade em mais de 25% das células se correlaciona com pCR após quimioterapia. Ao analisarmos os resultados dos estudos randomizados que comparam a adição de imunoterapia à quimioterapia estratificados por positividade ou não de PDL1, observamos que em todos os estudos o grupo PDL1 positivo apresentou altas taxas de pCR mesmo no braço placebo (apenas com quimioterapia), sendo igual ou melhor ao grupo com PDL1 negativo no braço controle (de imunoterapia e quimioterapia), sugerindo que os tumores pDL1 positivos apresentam melhor resposta à quimioterapia independente de imunoterapia, sugerindo que talvez seja um fator prognóstico (Tabela 1). Nossos resultados mostram que a boa resposta à

quimioterapia neoadjuvante se relaciona a presença de sTILs expressando PD1. Isto pode ser indicativo da presença de células antitumorais, que estão suprimidas na fase pré-neoadjuvância. No entanto, com a quimioterapia, a indução de morte imunogênica parece reverter este fenótipo e levar a resposta completa.

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo, observamos alteração estatisticamente significativa nas categorias de sTILs pré e pós-quimioterapia. Entre os moderados, 32% se tornaram acentuados, nos fazendo crer que este grupo de tumores é o que melhor se beneficia da ativação imunogênica da QT. Encontramos um aumento numérico de células a favor da imunidade e atividade antitumoral (CD3, CD8), significativo da relação CD8/foxp3 e diminuição de linfócitos reguladores da atividade antitumoral como o FOXP3 e PD1. Esses achados sugerem, de acordo com o descrito na literatura, que a quimioterapia pode restaurar o ambiente de imunovigilância e promover a morte de células imunossupressoras.

Diferente da literatura, a associação entre sTILs pré QT e pCR não se mostrou estatisticamente significativa assim como a associação entre sTILs pré e pós QTNEO com sobrevida Global não mostrou significância estatística. Estes resultados podem ser decorrentes do pequeno número de pacientes incluídos e na baixa taxa de resposta patológica completa encontrada.

Na nossa amostra observamos que apenas o PD1 pré teve uma correlação significativa com pCR. Sugerindo que este possa ser um biomarcador para quimioterapia

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação morfológica dos sTILs em câncer de mama está ganhando relevância clínica, principalmente em tumores triplo negativos. A incorporação do TIL como biomarcador na classificação do TNM, 8th edição da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) foi sugerida por diversos pesquisadores na área de câncer de mama (LOI et al, 2022). Entretanto, inúmeros desafios se apresentam aos patologistas para incorporação do TIL na prática clínica como descrito por Zuzana Kos e colaboradores (KOS et al, 2020) mesmo entre patologistas experientes. O câncer de mama mostra grande variação na morfologia, particularmente na celularidade tumoral e quantidade de estroma tumoral. Tumores de alto grau podem ter extensa necrose central com uma borda fina de estroma. A presença de outras células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos no estroma resultam numa aparência de maior celularidade podendo dificultar a leitura dos sTILs, além dos artefatos de técnica ocasionados por má fixação.

A importância do microambiente tumoral no desenvolvimento e comportamento das neoplasias é inquestionável. A interação do sistema imunitário e o câncer é extremamente dinâmico. Desta forma, mudanças no perfil imunológico acontecem dependendo da fase em que observamos. Novas abordagens com múltiplas análises de imuno-histoquímica, capazes de identificar anticorpos e quantificar proteínas (IHQ *multiplexed NanoString® Counter®*) (CESANO et al, 2016), assim como análises de perfil imuno genômico (GENTLES et al, 2015) tem sido testadas e validadas, para melhor caracterização de células mononucleares relacionadas à resposta antitumoral. Recentemente, análises sanguíneas e biopsias líquidas, têm sido estudadas (REMON et al, 2019; LI et al, 2018). Acreditamos que novas tecnologias possam descrever com maior precisão este perfil imunológico dinâmico de interação entre tumor, microambiente e hospedeiro.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-REHIM et al. **Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma.** J Pathol. 2004;203(2):661.

ADAMS et al. **Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199.** J Clin Oncol 2014 32(27):2959–2966. 2014

ADAMS et al. **Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer:** cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. Ann Oncol. 2019;30(3):397.

AHN et al. **Current issues and clinical evidence in tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer.** J Pathol Transl Med 2015; 49(5): 355–363.

ALLISON et al. **Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer:** ASCO/CAP Guideline Update. 2020, JCO 38 :12, 1-21.

AMIN et al (eds). AJCC (American Joint Committee on Cancer) **Cancer Staging Manual**; 8th edition, 3rd printing. Springer, Chicago 2018.

BACHELOT et al. **Durvalumab compared to maintenance chemotherapy in metastatic breast cancer:** The randomized phase II SAFIRO02\_BREAST IMMUNO trial. Nat. Med 2021,27,250-255.

BATES 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 24: 5373-80,2006.

BERTUCCI et al. **Identification and validation of an ERBB2 gene expression.** Signature in breast cancers. Oncogene 2004; 23:2564-75

BIANCHINI et al. **Modulation by treatment of tumor infiltrating lymphocytes (TILS) and PDL1 expression in triple-negative breast cancer in the ETNA trial.** J. Clin. Oncol 2020, 38, 555.

BRACCI et al. **Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy:** implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. Cell Death Differ. (2014) 21:15–25

BURSTEIN et al. **Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-Negative Breast Cancer.** Clin Cancer Res; 21(7) April 1; 1688-98. 2015

BURSTEIN et al. **Estimating the benefits of therapy for early stage breast cancer The St Gallen International Consensus Guidelines for the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019.** Ann. Oncol. 30, 1541–1557

CARDOSO et al. **Early Breast Cancer:** Esmo Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol (2019); 30: 1194-1220.

CERBELLI et al. **PD-L1 Expression in TNBC: A Predictive Biomarker of Response to Neoadjuvant Chemotherapy?** Bio Med Research International (2017) ; Article ID 1750925,1-7.

CESANO et al. **Spatially-resolved, multiplexed digital characterization of protein distribution and abundance in FFPE tissue sections.** [abstract]. Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016. Abstract nr 1371.

CHEANG et al. **Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression.** Oncologist. 2015;20(5):474

COLLETT et al. **A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14(5):1108.

CORTES et al. **Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355):** a randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. Lancet. 2020;396(10265):1817.

DENDULURI et al. **Selection of Optimal Adjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy for early Breast Cancer:** ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol 2018; May 22 (36) 1-1.

DEVITA, LAWRENCE, ROSENBERG. **Cancer principles practice of Oncology 9th edition.** 2011 1401.

DIECI et al. **Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer:** a retrospective multicenter study. Ann Oncol. 25 (3) 2014; 611-618.

DIECI et al. **Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ:** A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. Seminars in Cancer Biology. 2017

DIRIX et al. **Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study.** Breast Cancer Res Treat 2018 Feb;167(3):671-686

DUNN, OLD, SCHREIBER. **The three ES of Cancer Immuno editing.** Immunity, Vol. 21, 137–148, August, 2004.

DU TOIT et al. **Invasive lobular carcinomas of the breast -the prognosis of the histopathological subtypes.** Br J Cancer 1989; 60:605-9.

EMENS et al. **IMpassion130:** Final OS analysis from the pivotal phase III study of atezolizumab plus nabpaclitaxel versus placebo plus nabpaclitaxel in previously untreated locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. Ann Oncol. 2020;31S: ESMO #LBA16.

FARMER et al. **Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis.** Oncogene 2005, 24:4660- 4671.

FISCHER et al. **Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer.** J. Clin. Oncol. 16: 2672-2685,1998.

FOULKES, SMITH, REIS-FILHO. **Triple-negative breast cancer.** N Engl J Med 2010, 363:1938-1948.

GALON et al. **Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.** Science ; 313:1960–1964, 2006

GALON et al. **The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures.** Immunity 39: 11-26, 2013.

GALON, BRUNI. **Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies.** Nat Rev Drug Discov 2019; 18:197–218.

GARCIA-MARTINEZ et al. **Tumor-infiltration immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer.** Breast Cancer Research 16: 488, 2014.

GENTLES et al. **The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers.** Nat Med. 2015; 21:938–945.

GEYER et al. **Genetic analysis of microglandular adenosis and acinic cell carcinomas of the breast provides evidence for the existence of a low-grade triple negative breast neoplasia family.** Mod Pathol 2017a, 30:69- 84.

GEYER et al. **The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease High- and Low-Grade Lesions**. The American Journal of Pathology, 2017b, vol 187, No. 10: 2139-2151.

GIANNI et al. **Pathologic complete response (pCR) to neoadjuvant treatment with or without atezolizumab in triple negative, early high-risk and locally advanced breast cancer**. NeoTRIPaPDL Michelangelo randomized. Annals of Oncology; Published online 16 February 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.02.004>

GRANDAL et al. **PD-L1 Expression after Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancers Is Associated with Aggressive Residual Disease, Suggesting a Potential for Immunotherapy**. Cancers 2021, 13, 746 :1-16

GU-TRANTIEN et al. **CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival**. J Clin Invest 2013; 123(7): 2873–2892.

HAHAN, WEINBERG. **Rules for making human tumor cells**. New England Journal of Medicine 347(20): 1593-1603, 2002

HAMMOND et al. **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer**. J Clin Oncol. 2010;28(16):2784.

HANAHAN, WEINBERG. **The hallmarks of cancer**. Cell 100: 57-100, 2000.

HEPPNER, LOIBL, DENKERT. **Tumor-infiltrating lymphocytes: a promising biomarker in breast cancer**. Breast Care (Basel) 2016; 11:96–100.

HONGMEI et al. **Tumor Microenvironment: Key Players in Triple Negative Breast Cancer Immunomodulation**. Cancers 2021, 13, 3357.

HUANG et al. **Prognostic and clinicopathological value of PD-L1 expression in primary breast cancer: a meta-analysis**. Breast Cancer Res Treat .2019 Nov;178(1):17-33

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Atlas de mortalidade por câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. base de dados. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Dados e números sobre câncer de mama- Relatório Anual 2022**. <https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-de-mama-relatorio-anual-2022>

ISHIDA et al. **Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death**. EMBO J 1992; 11: 3887-3895.

IWA et al. **Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.** Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99:12293-12297.

JEMAL et al. Global Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin** vol 61 (2): 69-90, 2011.

KARN et al. **Tumor mutational burden and immune infiltration as independent predictors of response to neoadjuvant immune checkpoint inhibition in early TNC in GeparNuevo.** Ann Oncol 31(9), 2020, 1216-1222.

LACTCHMAN et al. **PD-L2 is a second ligand for PD1 and inhibits T cell activation.** Nat Immunol 2011; 2: 261-268.

LADOIRE et al. **Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3 regulatory T cells.** Clin Cancer Res 2008, 14:2413–2420.

LEHMANN et al. **Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.** J Clin Invest. 2011 Jul; 121:2750–67.

LI et al. **Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer.** Cancer Biol. Ther. 2018 19(8), 695–705.

LI et al. **Prevalence Study of PD-L1SP142 Assay in Metastatic triple -negative Breast Cancer.** Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2020, 29, 258-264.

LOI et al. **Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers.** J Clin Oncol 37:559-569. 2019.

LOI et al. **Tumor infiltrating lymphocyte stratification of prognostic staging of early-stage triple negative breast cancer.** NPJ breast Cancer 2022; 8:3

LOIBL et al. **A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study.** Ann Oncol. 2019;30(8):1279.

LOTFINEJAD et al. **Prognostic Role and Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): A Systematic Review and Meta-Analysis Study.** Diagnostics 2020, 10, 704. 2-13.

LUEN et al. **Prognostic implications of residual disease tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden in triple-negative breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy.** *Annals of Oncology* 30: 236–242, 2019

MAHMOUD et al. **Tumor infiltrating CD8+lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer.** *J Clin Oncol* 29: 1949-195, 2011.

MAO et al. **The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILS) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis.** *PLOS ONE* 10 (3) e 0119243, 2015.

MASUDA et al. **Adjuvant Capecitabine for Breast Cancer after Preoperative Chemotherapy.** *N Engl J Med.* 2017;376(22):2147

MATTAROLLO et al. **Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors.** *Cancer Res* 2011; 71:4809–20.

MICHELS et al. **Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner.** *J Immunotoxicol* 2012; 9:292–300.

MILES et al. **Primary results from IMpassion131, a double-blind placebo-controlled randomized phase III trial of first-line paclitaxel (PAC) with or without atezolizumab (atezo) for unresectable locally advanced/metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC).** *Ann Oncol.* 2020;31S: ESMO #LBA15.

MITTAL et al. **New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape.** *Curr Opin Immunol* 27: 16-25, 2014.

MITTENDORF et al. **Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomized, double-blind, phase 3 trial.** *Lancet.* 2020;396(10257):1090. Epub 2020 Sep.

MIYASHITA et al. **Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triplenegative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy.** *Breast Cancer Res Treat* (2014) 148:525–534.

National Cancer Institute: **Surveillance, Epidemiology, and End results program (SEER) Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer.** Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>

ONER et al. **Clinical impact of PD-L1 expression in triple-negative breast cancer patients with residual tumor burden after neoadjuvant chemotherapy.** World J Surg Oncol. 2021; 19: 264

OPZOOMER et al. **Cytotoxic Chemotherapy as an Immune Stimulus: A Molecular Perspective on Turning Up the Immunological Heat on Cancer.** Front. Immunol 2019, vol 10 art 1654 :1-9

PARKER et al. **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.** J Clin Oncol 2009, 27:1160- 1167.

PELEKANOU et al. **Tumor infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in pre- and post-treatment breast cancers in the SWOG S0800 Phase II neoadjuvant chemotherapy trial.** Mol Cancer Ther. 2018 June; 17(6): 1324–1331.

PEROU et al. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature.** 406: 747-52, 2000.

PERREARD et al. **Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay.** Breast Cancer Res. 2006;8(2): R23. Epub 2006 Apr 20

PERSSON et al. **Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck.** Proc Natl Acad Sci U SA 2009, 106:18740-18744.

POSTOW, CALLAHAN, WOLCHOK. **Immune checkpoint blockade in cancer therapy.** J Clin Oncol 33: 1974-198, 2015.

PRAT et al. **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** Breast Cancer Res. 2010;12(5):R68.

PRAT et al. **Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer.** Oncologist 2013; 18:123–33.

PUAY et al. **The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast.** Histopathology 2020,77,181–185.

RATHORE et al. **Is the tumor infiltrating natural killer cell (NK-TILs) count in infiltrating ductal carcinoma of breast prognostically significant?** Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15(8): 3757–3761.

RAVELLI et al. **Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility.** Tumor Biology. 2017;39(4)

REDDY et al. **Atezolizumab for the treatment of breast cancer**. Expert review of anticancer Expert Review of Anticancer Therapy Volume 20, issue 3, 2020.

REMON et al. **Liquid biopsy in oncology**: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. Clin. Transl. Oncol. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02211-x> (2019)

ROBBINS. **Pathologic Basis of Disease**. Tenth edition /2018.

ROCHÉ et al. **Sequential Adjuvant Epirubicin-Based and Docetaxel Chemotherapy for Node-Positive Breast Cancer Patients**: The FNCLCC PACS 01 Trial. JCO 2006;24(36):5664-5671.

RUGO et al. **Adaptive randomization of veliparib-carboplatin treatment in breast cancer**. N Engl J Med 2016; 375:23.

SALGADO et al. **The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer**: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol 2015; 26(2): 259–271.

SCHENTEN, MEDZHITON. **Advances in Immunology**. vol 109 pag 87-124 2011.

SCHIAVONI et al. **Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis**. Cancer Res 2011; 71:768–78

SCHMID et al. **Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer**. N Engl J Med. 2018;379(22):2108. Epub 2018 Oct 20.

SCHMID et al. **Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer**. N Engl J Med. 2020;382(9):810.

SCHMID et al. **Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer**. N Engl. J. Med 2022 386, 556-567.

SCHUTZ et al. **PD1/PD-L1 Pathway in breast**. Cancer Oncol Res Treat 2017; 40: 294-297.

SEO et al. **Tumor-infiltrating CD<sup>+</sup> lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer**. Br J Cancer 109: 2705-13, 2013.

SERMOUD et al. **Análise da resposta patológica completa e sobrevida estimada em pacientes com câncer de mama em quimioterapia neoadjuvante em instituição privada do estado do Rio de Janeiro.** Brazilian Journal of Oncology | VOL 17:e-20210026 | January-December 2021.

SINN; KREIPE. **A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition.** Breast Care (Basel). 2013 May; 8(2): 149–154

SHAH et al. **The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers.** Nature 2012, 486:395

SMID et al. **Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse.** Cancer Res. 2008;68(9):3108.

SØRLIE et al. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(19): 10869–74

SOTIRIOU et al. **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(18):10393

STANTON et al. **Variation in the incidence and magnitude of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer subtypes: a systematic review.** JAMA Oncol 2016; 2 (10): 1354–1360.

SUNG et al. **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** CA CANCER J CLIN 2021; 71:209–249.

SYMMANS et al. **Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy.** JCO, 25 (28) (2007), pp. 4414-4422.

SZEKELY et al. **Immunological differences between primary and metastatic breast cancer.** Ann Oncol. 2018, 29,2232-2239

TESCHENDORFF et al. **An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer.** Genome Biol 2007;8: R157.

THOMSSENA et al. **St. Gallen/Vienna 2021: A Brief Summary of the Consensus Discussion on Customizing Therapies for Women with Early Breast Cancer.** Breast Care 2021; 16:135–143.

TRIVERS et al. **The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race.** Cancer Causes Control. 2009 Sep;20(7):1071-82.

TUTT et al. **Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1- or BRCA2-Mutated Breast Cancer**. N Engl J Med. 2021 Jun 24;384(25):2394-2405. doi: 10.1056/NEJMoa2105215. Epub 2021 Jun 3. PMID: 34081848; PMCID: PMC9126186.

VAN ROOIJEN et al. **Immunotherapeutic options on the horizon in breast cancer treatment**. Pharmacol Ther 2015; 156: 90–101.

VIOLA, TEIXEIRA, WERNECK. **Imunologia Tumoral em Carlos GF, José CR**. Oncologia Molecular. primeira edição, Editora Atheneu, Capítulo 10 pag 105-112, 2005.

VON MINCKWITZ et al. **Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes**. J Clin Oncol. 2012 May;30(15):1796-804

VON MINCKWITZZ et al. **Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): A randomised phase 2 trial**. Lancet Oncol 2014; 15:747.

WEIGELT et al. **The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade**. J Pathol. 2010; 220: 263-280.

WEIGELT et al. **Metaplastic breast carcinoma: more than a special type**. Nat Rev Cancer 2014, 14:147-148.

WEISMAN et al. **Genetic alterations of triple negative breast cancer by targeted next-generation sequencing and correlation with tumor morphology**. Mod Pathol 2016, 29:476-488.

WILSON et al. **Lobular Breast Cancer: A Review**. Front Oncol. 2020; 10: 591399.

WOLFF et al. **Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer**: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. J Clin Oncol. 2013;31(31):3997.

XING, CHENQI. **Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy**. Cell Research (2020) 30:660–669.

YERUSHALMI et al. **Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential**. The Lancet Oncol 2010; 11: 174-83.

YU et al. **Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer:** a systematic review and meta-analysis. Clin Transl Oncol 2016; 18: 497–506.

KOS et al. **Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes(sTILs) in breast cancer.** npj Breast Cancer (2020) 6:17; <https://doi.org/10.1038/s41523-020-0156-0>.

## ANEXOS

### ANEXO 1- COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Correlação de infiltrados linfocitários no tumor primário de mama e o desenvolvimento de metástases ósseas em pacientes atendidas no HU no período de 2000 a 2018.

**Pesquisador:** maria de fatima dias gauí

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 28003420.1.0000.5257

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina - UFRJ

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal Do Rio de Janeiro

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.899.479

UFRJ - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO CLEMENTINO  
FRAGA FILHO DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO DE JANEIRO / HUCFF-  
UFRJ



Continuação do Parecer: 3.899.479

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 05 de Março de 2020

---

**Assinado por:**

**Carlos Alberto Guimarães**  
**(Coordenador(a))**

## ANEXO 2 – METODOLOGIA UTILIZADA NA IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DE STILS POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

- 1) Protocolo de imuno-histoquímica:
- 2) Cortes histológicos de 3 micrômetros de material parafinado foram acondicionados em lâminas silanizadas;
- 3) Levadas a estufa por aproximadamente duas horas;
- 4) Desparafinizadas;
- 5) As lâminas foram submetidas a recuperação antigênica em tampão citrato pH 6.0, por 30 minutos em banho maria a 95° C;
- 6) Ao atingirem temperatura ambiente foram lavadas em água corrente e destiladas por cinco minutos;
- 7) Acondicionadas em tampão de lavagem (TTBS pH 7.4);
- 8) Os cortes foram isolados;
- 9) Submetidos a bloqueio de peroxidase endógena (kit *novolink* – Leica Biosystem) por dez minutos;
- 10) Posteriormente foram lavados em água corrente e destilados por cinco minutos;
- 11) As lâminas foram condicionadas em tampão de lavagem (TTBS pH 7.4) por dez minutos;
- 12) Os cortes foram submetidos a bloqueio de proteína (kit *novolink* – Leica Biosystem) por dez minutos;
- 13) Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente e destiladas por cinco minutos;
- 14) Acondicionadas em tampão de lavagem (TTBS pH 7.4) por dez minutos;
- 15) Os cortes foram incubados com anticorpo primário em câmara úmida a 4°C por 24 h;
- 16) No dia seguinte as lâminas foram retiradas da geladeira;
- 17) Ao atingirem temperatura ambiente foram lavadas em água corrente e destiladas por cinco minutos;
- 18) Acondicionadas em tampão de lavagem por dez minutos;
- 19) Os cortes foram incubados com pós-primário (kit *novolink* – Leica Biosystem) por trinta minutos;
- 20) As lâminas foram lavadas em água corrente destilada por cinco minutos;
- 21) Acondicionadas em tampão de lavagem por dez minutos;
- 22) Os cortes foram incubados com polímero (kit *novolink* – Leica Biosystem) por trinta minutos;
- 23) Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e destiladas por cinco minutos;
- 24) Acondicionadas em tampão de lavagem (TTBS pH 7.4) por dez minutos;
- 25) Os cortes foram revelados com *Dab* (50:1000 µL kit *novolink* – Leica Biosystem) cromógeno/substrato;
- 26) Contra corados com hematoxilina de Harris por um minuto;
- 27) As lâminas foram lavadas em água corrente por dez minutos;
- 28) Desidratadas em álcool;
- 29) Clarificadas em xilol; 29 - Montadas com goma de Dama.

## ANEXO 3- ARTIGO PUBLICADO

ORIGINAL ARTICLE  
<https://doi.org/10.29289/2594539420200076>

## Clinicopathologic profile of breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy at HUCFF/UFRJ

Luís Claudio Belo Amendola<sup>1,2\*</sup>, Maria de Fatima Dias Gaudi<sup>1</sup>,  
 Ana Helena Pereira Correia Carneiro<sup>1</sup>, Nathalie Henriques Silva Canedo<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Introduction:** The objective of this study is to describe the profile of patients from a public institution, submitted to neoadjuvant chemotherapy (NACT), comparing the verified pathological response with literature data. **Methods:** Observational retrospective cohort study on breast cancer patients diagnosed between September 2001 and October 2018 and treated with NACT at Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), located in Rio de Janeiro, Brazil. The adopted neoadjuvant chemotherapy regimen was based on anthracycline and docetaxel. **Results:** A total of 133 patients were evaluated. The average age in this group was 54 years (28-86), 49 women (37%) were under 50 years old. The following distribution by molecular subtype was observed: overexpression or amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2+) (13 women, 26.6%), Luminal (19 women, 38.8%), and Triple-negative (TN) (17 women, 34.6%). The HER2+ and TN subtypes had a higher incidence of cases between 40-49 years and 50-59 years. As for the initial staging, 34% were IIIA; 26%, IIB; and 19%, IIIB. Only one patient did not undergo surgery after NACT, 33 (24.8%) underwent conservative surgery, and 99 patients (74.4%) underwent mastectomy. Regarding the axillary approach, 41 (31%) underwent sentinel lymph node biopsy and 88 (66%) had an indication for lymphadenectomy. In the anatomopathological evaluation of the surgery, 12 (9.1%) patients obtained a pathologic complete response (pCR) and 113 (84.9%), partial or no response to chemotherapy. **Conclusion:** This research enabled the identification of clinicopathologic characteristics and outcome of patients who received neoadjuvant chemotherapy in a public university service. The predominance of advanced tumors was observed, stressing the need for public health policies for the screening of breast cancer as well as the guarantee of timely treatment for diagnosed cases. The data somewhat reflect the difficulty that the public sector encounters to carry out the most appropriate treatment. The authors expect that this article, by analyzing the profile and the adopted treatment in real-life cases and in a public university institution, can contribute to the improvement of breast cancer treatment in Brazil.

**KEYWORDS:** locally advanced breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, pathological response.

### INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignancy among women worldwide. In Brazil, 66,280 new cases of breast cancer are expected per year for the 2020-2022 triennium. This value corresponds to an estimated risk of 61.61 new cases per 100 thousand women<sup>1</sup>.

The prognosis of breast cancer depends, among other data, on its extension (staging) and the molecular subtype. TNM (T – tumor; N – nearby lymph nodes; M – metastasis) is the international system for assessing the extent of neoplasia, whose last systematic review was carried out in January 2018 by the American Joint Committee On Cancer (AJCC); this is the

8<sup>th</sup> edition, incorporating biological factors into the anatomico-clinical data<sup>2</sup>. Pathological staging (pTNM) is determined after surgery or neoadjuvant treatment (ypTNM), with greater accuracy than the clinical one (cTNM).

Neoadjuvant chemotherapy (NACT) was initially adopted for locally advanced tumors aiming at cytoreduction, in order to provide conservative surgeries to patients who are candidates for mastectomy or to make it operable. However, lately, NACT has been adopted with the purpose of evaluating the response to a new protocol or medication, taking advantage of the pathological response as an intermediate outcome, identifying predictive and

<sup>1</sup>Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

<sup>2</sup>Instituto Nacional da Saúde da mulher, da criança e do adolescente Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

\*Corresponding author: [lcamendola@globo.com](mailto:lcamendola@globo.com)

Conflict of interests: nothing to declare.

Received on: 11/10/2020. Accepted on: 01/04/2021

prognostic factors or indicating complementary adjuvant treatment according to the residual disease. The effectiveness of the NACT regimen can be assessed by the rate of objective clinical response, tumor reduction and operability or, preferably, by the pathologic complete response (pCR – absence of residual invasive tumor in the surgical specimen in the breast and axilla). The first studies based on anthracyclines showed rates of clinical responses (60% to 80%) and pCR (10% to 20%)<sup>3,4</sup>. In the early 2000s, taxanes were incorporated into neoadjuvant breast cancer treatment regimens, either alone or combined with anthracyclines, doubling the rate of clinical and pathological response<sup>5-9</sup>. Randomized studies on amplified HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) patients have shown a significant increase in pCR when combining chemotherapy with anti-HER2 therapy<sup>10-12</sup>. pCR is the best indicator of response to neoadjuvant treatment, indicating an increase in survival (overall survival and disease-free survival), as initially demonstrated in the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) Protocol B-18 study<sup>3</sup>. This correlation is especially true for triple-negative (TN) and HER2-positive<sup>14</sup> (HER2+) tumors.

The indications and protocols for neoadjuvant therapy in breast cancer are well established in the literature. Nevertheless, in Brazil, we find barriers, mainly in the public sector, due to the delay in diagnosis, the difficulty of infrastructure, and the incorporation of medicines. This study aims to analyze the profile and clinicopathological outcome (pathological response) of patients treated with neoadjuvant therapy, in a clinical oncology service at a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

### Methodology

This is a retrospective observational cohort study, whose unit of analysis consisted in breast cancer cases diagnosed between 2001 and 2018 and treated with NACT at Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), located in the city of Rio de Janeiro, state of Rio de Janeiro, Brazil. The patients included in the study were selected from the HUCFF/UFRJ hospital-based cancer registries. Clinical and pathological data were obtained by consulting physical and electronic medical records.

To assess tumor characteristics, we used the TNM Classification of the Union for International Cancer Control (UICC), 8<sup>th</sup> edition, considering the size of the tumor – T, the presence of axillary metastasis – N, and the presence of metastasis – M (locoregional or systemic), at the time of diagnosis (cTNM).

The subclassification of breast tumors by immunohistochemistry was performed based on results presented by the Pathological Anatomy of HUCFF/UFRJ based on the evaluation of hormone receptors for estrogen (ER) and progesterone (PR),

overexpression of c-erb2, or amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and cell proliferation index (Ki67). According to these results, three immunohistochemical subgroups were defined: Luminal subtypes (ER+ and/or PR+/- and HER2-), HER2+ (c-erb2 3+ or 2+, confirmed by FISH [Fluorescence *in situ* hybridization] amplification test), and hormone receptor-positive or negative (HR+/-) and TN or basal-like (ER-, PR-, and HER2-). There is some controversy on the evaluation of Ki67 in the literature due to the difficulty in standardizing its results in different services. The 2011 St. Gallen Consensus considers values below 14% as low or negative and values above 15% as high. However, due to lack of inputs, some patients did not perform the Ki67 evaluation, and they cannot be properly classified into Luminal A and B. Ki67 was described, when possible, to demonstrate tumor aggressiveness.

All patients underwent routine exams for staging and exclusion of metastases before primary chemotherapy. The adopted chemotherapy treatment was the PACS 01 regimen<sup>15</sup>, which uses three cycles of FEC (5 fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup>, epirubicin 100 mg/m<sup>2</sup>, and cyclophosphamide 500 mg/m<sup>2</sup> with an interval of 21 days) followed by three cycles of docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> every 21 days. Trastuzumab, despite being incorporated into the Brazilian Unified Health System (SUS) since 2013, has not been associated with neoadjuvant chemotherapy in amplified HER2 patients due to logistical difficulties, delay in carrying out the FISH test, and unavailability of the drug to start the treatment (distribution centralized by the Brazilian Ministry of Health with delivery around three months after scheduling the patient). Trastuzumab was administered to these patients in adjuvant therapy for 12 months.

Data from surgical treatment on the breast (conservative or radical procedure) and axilla (lymphadenectomy or sentinel lymph node biopsy) were analyzed. The response to NACT was described as: pathologic complete response (pCR), in the absence of invasive neoplasia in the breast and lymph nodes, in which there may be ductal carcinoma *in situ* (DCIS) in the specimen or partial response in the existence of residual invasive tumor in the breast or lymph node.

### Inclusion criteria

Female patients with infiltrating breast carcinoma treated at HUCFF/UFRJ between 2001 and 2018, with neoadjuvant chemotherapy based on anthracyclines and/or taxanes, were eligible for this study.

### Exclusion criteria

Patients who abandoned chemotherapy treatment were excluded.

### Statistical analysis

The results of this study are exploratory and descriptive. Analyses of quantitative variables are presented with the mean and standard

deviation; the qualitative variables are presented with their absolute and relative frequency. No statistical analysis was performed between the variables due to the small number of cases.

## RESULTS

A total of 133 patients treated at HUCFF/UFRJ, diagnosed with breast cancer, and who underwent NACT followed by surgery from September 2001 to October 2018 were evaluated. The distribution of clinical characteristics according to breast cancer subtypes classified by immunohistochemistry is demonstrated in Table 1.

Regarding the age distribution at diagnosis, the average age in this group was 54 years (28–86), with no significant difference between the subgroups HER2+ 54 years old (32–86), Luminal 54 years old (28–86), and TN 52 years old (33–81). In this sample, 49 women (37%) were under 50 years old with the following distribution by molecular subtype: HER2+ (13 women, 26.6%), Luminal subtypes (19 women, 38.8%), and TN (17 women, 34.6%). The distribution by molecular subtype for 10 patients aged 70 years or older was: 5 (50%) Luminal subtypes; 4 (40%), HER2+; and 1 (10%), TN.

As for the HER2+ subgroup, 25 cases were diagnosed with 3+ in immunohistochemistry, whereas eight cases needed to perform the FISH test to confirm the diagnosis. When evaluating the Ki67 cell proliferation marker, a large percentage (69.6%) was found, which is deemed a high cell proliferation index (>14), and 10 cases did not perform the test.

In the Luminal subgroup, 52 cases were classified as HER2 negative (0 and 1+), whereas six cases were c-erbB-2 2+ and required FISH test to be performed. In the evaluation of ER and PR, the following were verified: ER+/PR+=45, ER+/PR=10, and Rpx=3.

Concerning TN, 40 cases were classified as HER2 negative (c-erbB-2 0 and 1+), whereas two cases were c-erbB-2 2+ and required FISH test to be performed. In this population, no cases of low Ki67 were found.

At the time of diagnosis, 71% of the cases had a >5-cm tumor, and in 70% of the cases the armpits were clinically compromised. Almost half of the cases (43%) were classified as staging IIIA; 26%, as IIB; and 19%, as IIB. Fifteen patients were classified into stage I and IIA, stages in which patients are not usually submitted to neoadjuvant therapy. However, all these patients were initially evaluated by the services of mastology and clinical oncology, and opted for starting treatment with chemotherapy due to the rapid clinical evolution and structural difficulties. Subsequently, it was verified that 10 of these patients had subtypes TN and amplified HER2. See Table 1.

After receiving NACT, patients were referred to surgical evaluation, with only one patient considered inoperable. Table 2 shows that conservative surgery was an infrequent practice, and only 33 patients (25%) underwent such a procedure. Other 99

**Table 1.** Distribution of clinical characteristics according to breast cancer subtypes.

|                       | Total (%) | HER2 (%) | Luminal subtypes (%) | TN (%)  |
|-----------------------|-----------|----------|----------------------|---------|
| Age at diagnosis      |           |          |                      |         |
| 20–29                 | 1 (1)     | 0 (0)    | 1 (100)              | 0 (0)   |
| 30–39                 | 14 (10)   | 3 (21)   | 6 (42)               | 5 (37)  |
| 40–49                 | 34 (26)   | 10 (30)  | 12 (35)              | 12 (35) |
| 50–59                 | 43 (32)   | 9 (21)   | 19 (44)              | 15 (35) |
| 60–69                 | 28 (21)   | 6 (21)   | 14 (50)              | 8 (29)  |
| 70–79                 | 10 (7)    | 4 (40)   | 5 (50)               | 1 (10)  |
| 80–89                 | 3 (3)     | 1 (33)   | 1 (33)               | 1 (33)  |
| Tumor size            |           |          |                      |         |
| cT1                   | 2 (1)     | 1 (50)   | 1 (50)               | 0       |
| cT2                   | 37 (28)   | 12 (32)  | 16 (43)              | 9 (25)  |
| cT3                   | 66 (50)   | 15 (23)  | 24 (36)              | 27 (41) |
| cT4                   | 28 (21)   | 5 (18)   | 17 (61)              | 6 (21)  |
| Lymph node evaluation |           |          |                      |         |
| cN0                   | 40 (30)   | 12 (30)  | 17 (42)              | 11 (28) |
| cN1                   | 62 (47)   | 13 (21)  | 25 (40)              | 24 (39) |
| cN2                   | 29 (22)   | 7 (24)   | 15 (52)              | 7 (24)  |
| cN3                   | 2 (1)     | 1 (50)   | 1 (50)               | 0 (0)   |
| Distant metastasis    |           |          |                      |         |
| M0                    | 133 (97)  | 33 (25)  | 58 (43)              | 42 (32) |
| M1                    | 0 (0)     | 0 (0)    | 0 (0)                | 0 (0)   |
| Clinical Staging      |           |          |                      |         |
| I                     | 2 (1)     | 1 (50)   | 1 (50)               | 0 (0)   |
| IIA                   | 13 (10)   | 8 (62)   | 3 (23)               | 2 (15)  |
| IIB                   | 34 (26)   | 4 (12)   | 19 (56)              | 11 (32) |
| IIIA                  | 57 (43)   | 15 (26)  | 17 (30)              | 25 (44) |
| IIIB                  | 25 (19)   | 4 (16)   | 17 (68)              | 4 (16)  |
| IIIC                  | 2 (1)     | 1 (50)   | 1 (50)               | 0 (0)   |
| TOTAL                 | 133       | 33       | 58                   | 42      |

HER2: human epidermal growth factor receptor 2; TN: triple-negative; cT: clinical stage of the tumor; cN: clinical stage of nearby lymph nodes; M: metastasis.

patients (74%) had an indication for radical surgery. Concerning axillary surgery, a total of 41 patients (31%) underwent sentinel lymph node biopsy (11 HER2 women, 17 Luminal, and 13 TN) and 88 patients (66%) had an indication for lymphadenectomy (21 HER2 women, 39 Luminal, and 28 TN). In this sample, seven cases (5%) did not undergo an axillary evaluation.

In the anatomopathological evaluation of post-NACT surgery, 12 patients (9%) obtained pCR (4 HER2 women, 2 Luminal, and 6 TN). In 113 (85%) patients, there was partial or no response to chemotherapy (26 HER2 women, 54 Luminal, and 33 TN).

#### ANEXO 4: ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO

#### PD1 IS A MARKER FOR NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY RESPONSE IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

Maria de Fatima Dias Gai, Luis Claudio Amendola, Nathalie Canedo e Adriana Bonomo.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are detectable in up to 75% of triple-negative breast cancer (TNBC). The composition of these infiltrates, with regulatory lymphocytes or immune stimulators, may influence prognosis. The objectives of this study were to describe and quantify the composition of the TILs before and after chemotherapy (NEOCT) and to evaluate their association with complete pathological (pCR) response and overall survival (OS).

**Methodology:** This was a retrospective observational study. Clinical and pathological data from 38 TNBC treated with NEOCT at the University Hospital (HUCFF/UFRJ), between November 2004 and November 2018 were analyzed. The Stromal TILs (sTIL) have been identified on hematoxylin and eosin (H&E) stained sections accordingly guidelines of the "International TILs Working Group". Immunohistochemistry (IHC) to define T cell immune cell subsets (CD3, CD4 CD8) and some regulatory markers (PD-1 and FOXP3) were performed.

**Results:** Statistically significant changes in sTIL categories were observed before and post-NEOCT, 32% of intermediate cases became high. The correlation between pre-NEOCT sTILs and pCR, pre-NEOCT and post-NEOCT sTILs and OS was not statistically significant. However, we noticed an increase of cells that favor the antitumor activity (CD3, CD8 and CD8/FOXP3 ratio) and decreased levels of cells inhibiting tumor activities (FOXP3 and PD1). Importantly, PD1 expression pre-NEOCT showed an association with pCR.

**Conclusion:** In this study, we observed that chemotherapy significantly increase sTILs, CD8 T cells and decreases the CD8/FoxP3 ratio. Most importantly, PD-1 expression before NEOCT positively correlates with pCR suggesting the use of PD-1 as a prognostic marker before NEOCT.

Key words: Triple negative breast cancer; Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), PD1 markers

## Introduction

Breast cancer is the most frequent neoplasm and the leading cause of mortality among women worldwide<sup>1</sup>. Some prognostic factors, such as tumor extent (TNM), histological type and, especially, molecular subtype are well established in the literature. Recent studies have demonstrated the importance of the tumor microenvironment (TME) and its prognostic implication regarding the behavior of various tumors, including breast cancer. Although breast cancer is not typically an immunogenic disease, tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are detectable in up to 75% of tumors, and approximately 20% of these tumors present particularly dense infiltrate<sup>2</sup>.

There is growing evidence regarding the prognostic values of TILs correlating with survival, especially in triple-negative breast cancer (TNBC) cases and amplified HER2 cases<sup>3</sup>. Randomized studies comparing neoadjuvant treatment protocols in HER2+ and TN tumor cases have demonstrated that there is a significant correlation between TIL intensity in biopsies and the best response to chemotherapy, as measured by the number of cases of complete pathological response obtained<sup>4 5</sup>. Thus, TILs have been shown to be biomarkers for the response to chemotherapy treatment and, consequently, survival<sup>6</sup>.

A recently published meta-analysis that included individual patients from nine large studies confirmed the prognostic role of TILs in TN cases. Thus, it was suggested that TILs could be considered as biomarkers for clinical use<sup>7</sup>. This recommendation was endorsed by the 16<sup>th</sup> International Breast Cancer Conference in St. Gallen and it was proposed that TIL analysis in TN cases should be incorporated into the 8<sup>th</sup> edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging system<sup>8</sup>.

The most abundant cell population in TILs is T lymphocytes (75%). However, depending on the composition of these lymphocytes, i.e. whether they are effectors or regulators, the prognosis of breast cancer may vary. Studies have suggested that the best characterization of the immune infiltrate is obtained through immunohistochemistry, in terms of the levels of CD3 (total T lymphocytes), CD8 cytotoxic cells and FOXP3 expressing Treg. The CD8/FOXP3 ratio in TILs correlates with better response to neoadjuvant chemotherapy (NEOCT) and greater chance of achieving a complete pathological response<sup>9</sup>. Programmed cell death protein 1 (PD-1) can be overexpressed on the TILs and pave the road for suppressing anti-tumoral immune responses<sup>10</sup>.

Here, quantification and immunophenotypic identification of TILs, along with their relationship with the treatment response, was studied in a cohort of TNBC patients.

## **Materials and Methods**

### ***Patients and study design***

This was an observational retrospective cohort study. We evaluated 133 patients who were treated at HUCFF/UFRJ with a diagnosis of initial or locally advanced breast cancer. These individuals underwent neoadjuvant chemotherapy followed by surgery between November 2004 and November 2018. From these, 40 patients with TN breast cancer defined through immunohistochemistry, who were hormone receptor-negative and HER2-negative (0, 1+ or 2+ and FISH-negative) in accordance with the ASCO/CAP criteria, were selected.

The neoadjuvant chemotherapy regimen used was based on anthracycline and docetaxel, usually consisting of the FEC 3 docetaxel regimen (PACS protocol 01) 11. After the end of chemotherapy, the patients were referred for breast surgery (conservative or radical) and axillary surgery (sentinel lymph node biopsy or axillary lymphadenectomy), at the surgeon's discretion. Out of the 40 TN patients, 38 were eligible for this study because sufficient histopathological material from before and after chemotherapy was available. This study was approved by the ethics committee of the UFRJ(CAAE:2800.3420.1.0000.5257)

### ***Quantification and identification of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs)***

TILs were identified in the biopsy material and surgical specimens by pathologists, using sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) at magnifications of 200-400x (10x ocular lens with 20-40x objective lens). Stromal TILs (sTILs) within the edge of the tumor scar were analyzed, after exclusion of areas of ductal carcinoma in situ and tumor zones with necrosis and artifacts. The mean percentage of the stromal area occupied by mononuclear cells was scored, using the guidelines of the "International TILs Working Group", for evaluation of TILs within the pre-treatment and post-chemotherapy scenarios. The quantity of sTILs was analyzed as a continuous measurement, using three predefined categories: low sTILs (0–10%), intermediate sTILs (10–40%) and high sTILs (40-90%) 12. The sTILs were quantified blindly by two experienced pathologists at UFRJ.

The composition of the sTILs was identified by means of immunohistochemistry. Counting of immunostained cells was performed in 3 fields of the stromal area ((200-400x magnification). To evaluate CD3, CD4 and CD8 expression the following antibodies were used: Dako CD3 antibody (A0452) at dilution of 1:800; CD8 SP clone (M3162) at dilution of 1:100; and Bioscience FOXP3 (14-4777-82) at dilution of 1:100.

### ***Statistical analysis***

The statistical assessment on the data was performed using the libraries (dplyr, tidyr, stringr, descr, gtsummary and survival) of R version 4.1.3 (R Development Core Team: <http://www.R-project.com>). For comparisons between strata (categories of variables), log-rank testing was used. P values < 0.05 were considered statistically significant.

The Kaplan-Meier statistical method was used for survival analysis. The start date for counting the length of survival was the time when the diagnosis was recorded. The observations began on the date when the first case included was diagnosed.

## Results

### Cohort Description

Out of the 40 TN breast cancer patients, 38 were eligible for inclusion because histopathological material from before and after chemotherapy was available.

The clinical and pathological features of the patients are described in Table 1.

**Table 1:** Clinical and pathological features of 38 patients.

| <i>All patients N =38</i> |                                   |            |
|---------------------------|-----------------------------------|------------|
| <i>Age</i>                | Mean (range)                      | 54 (33-81) |
|                           |                                   |            |
| <i>Staging</i>            | IIA                               | 1          |
|                           | IIB                               | 10         |
|                           | IIIA                              | 19         |
|                           | IIIB                              | 3          |
|                           | NI                                | 5          |
| <i>Ki67</i>               | <20%                              | 2          |
|                           | >20%                              | 24         |
|                           | NI                                | 13         |
| <i>Histological type</i>  | Medullary                         | 2          |
|                           | Metaplastic                       | 1          |
|                           | Micropapillary                    | 1          |
|                           | Infiltrating ductal carcinoma SOE | 34         |
| <i>Breast surgery</i>     | Mastectomy Patey's                | 31         |
|                           | Conservative surgery              | 7          |
| <i>Axillary surgery</i>   | Lymphadenectomy                   | 30         |
|                           | Sentinel lymph node biopsy        | 8          |

Clinical staging based on the TNM of the International Union Against Cancer (UICC) 7th edition. Ki 67 Considered Low  $\leq 20\%$  and high  $>20\%$ .

Abbreviations: N/I without information. IDC NOS: infiltrating ductal carcinoma not otherwise specified

Regarding the overall survival of the TN patients studied, 50% of the patients were still alive at 60 months. A complete pathological response (pCR) was obtained in five patients

(13%). In accordance with the literature patients who achieved a complete pathological response after neoadjuvant chemotherapy had better survival.

***Quantification of TILs pre- and post-neoadjuvant Chemotherapy and association with outcome***

One hundred percent of the initial biopsy samples studied presented sTILs. Statistically significant changes in sTIL categories from before to after chemotherapy were observed in initially intermediate TILs patients only ( $P=0.016$ ). At biopsy, sTILs were low in 10 (26%) cases, moderate in 22 (58%) and severe in 6 (16%). In the post-chemotherapy surgical specimen, we observed a mild form in 12 (32%) cases, moderate in 14 (36%). 70% of low TIL cases remained low; 66% of high cases remained high, while 32% of intermediate cases became high and low in 12 (32%).

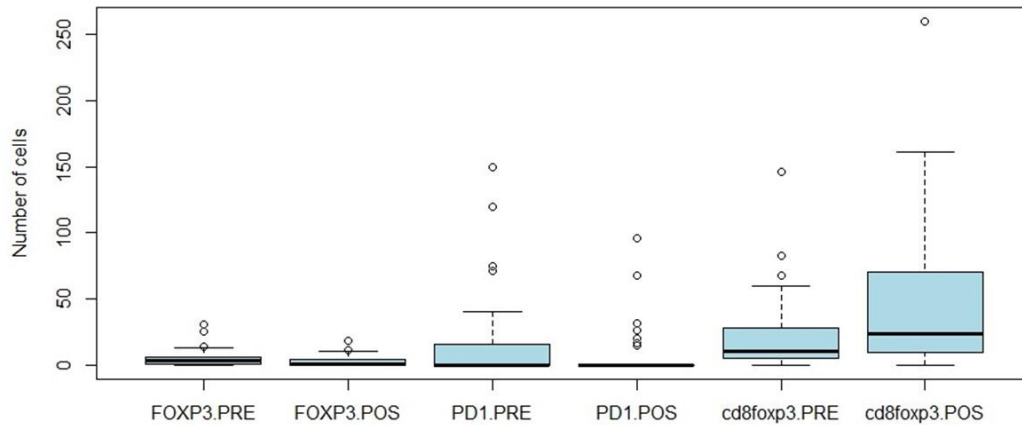
Associations between the intensity of sTILs and clinical criteria of age stratified according to age groups were tested, however, there was no statistically significant difference between the populations under 50 years (45%) and over 50 years (55%) in relation to the intensity of sTILs, either before chemotherapy ( $p=0.38$ ) or after chemotherapy ( $p=0.15$ ). It should be emphasized that only 8% of the sample was over 70 years of age.

There was no statistically significant association between the intensity of sTILs in pre-chemotherapy biopsies and complete pathological response ( $p=0.673$ ). In addition, there was no statically significant association between the intensity of sTILs in pre-chemotherapy biopsies and overall survival (OS), or between post-chemotherapy sTILs and OS.

***Immunophenotypic analysis on sTILs***

Immunophenotype analyses comparing pre-chemotherapy biopsies with post-chemotherapy surgical samples were performed. We observed non-significant increases in total T cell (CD3: 75.4 to 88), in CD8+ T cells (CD8: 58.3 to 71.4) and non-significant decreases PD1+ cells: 16 to 7.2 (figure 1). We also observed a significant decrease in FOXP3+ cell levels leading to significant increase in CD8/FOXP3 (figure 1).

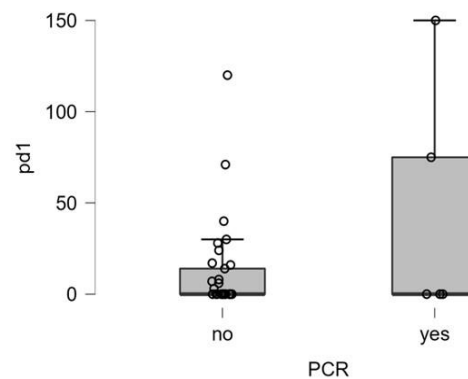
**Figure 1.** A box plot graphic comparing Immunophenotypes in pre- and post-chemotherapy biopsy samples: FOXP3, PD1 and CD8/FOXP3



**FIGURE 1:** A box plot graphic comparing Immunophenotypes in pre- and post-chemotherapy biopsy samples. Significant increase in the pre and post CD8/FOXP3 ratio ( $p=0.001$ ) and significant decrease in regulatory markers: FOXP3 ( $p=0.027$ ) and PD1 ( $P=0.011$ ).

However, when patients are separated according to their pathological response, and PD1 expression quantified, high PD1 expression was clearly correlated with complete response, while low expression pre NEOCT was present in non-responding patients (figure 2).

**Figure 2.** PD1 quantification and complete pathological response (pCR)



**Figure 2.** A box plot graphic comparing PD1 quantification (PD1+ cells) and complete pathological response (pCR). PD1 showed a significant correlation with complete pathological response ( $P=0.039$ )

## Discussion

In this retrospective study, we evaluated 38 patients who had been diagnosed with TN breast cancer and were treated with NEOCT, in a single institution. These female patients had a median age of 54 years, and most of them had histopathological diagnoses of unspecified infiltrating ductal carcinoma (SOE), high ki67 and advanced tumors. Around 84% of them had

tumors larger than 5 cm or positive lymph nodes. These findings were probably due to delayed diagnosis and late start of treatment.

Over the period covered by this study, NEOCT protocols for TN breast cancer did not undergo major changes, unlike what was seen in relation to other molecular subtypes of breast cancer. However, only five patients achieved a complete pathological response (13%), a result much lower than what has been reported internationally 13 and in Brazil 14. The large tumor volumes may explain the poorer response to chemotherapy. However, even with the small number of complete pathological responses, we were able to demonstrate, in accordance to the literature, that patients with a complete pathological response had higher survival rates.

The totality of biopsy samples and surgical specimens had TILs. We did not find any differences in sTIL categories between age groups or staging (This differed from the results described in the literature, which reported that sTIL levels were lower among elderly people and cases of larger tumors, with greater lymph node involvement and lower histopathological degree 7).

The association between pre-chemotherapy sTILs and complete pathological response was not statistically significant. In addition, the correlations between pre-chemotherapy sTILs and overall survival ( $p=0,98$ ) and between post-chemotherapy sTILs and overall survival ( $p=0,24$ ) were not statistically significant, differently from the literature which shows a correlation between TILs and OS. This result, as above may have been influenced by the small number of complete pathological responses which probably relates to the high stage presentation at patient entrance in the study. Also, the small number of patients included in the study is a limitation.

There were statistically significant changes in the categories of sTILs from before to after chemotherapy. About 70% of low TILs remained low; 66% of high cases remained high, while 32% of intermediate cases became high, making us believe that this group of tumors is the one that best benefits from the immunogenic activation of NEOCT and subsequent immunotherapy. In our sample, neoplasms low sTILs in biopsy (low antigenic “cold” neoplasms) failed to become “warm” with chemotherapy induction.

As just the number of TILs, pre or pos- NEOCT, do not correlate with OS, we decided to identify the cell populations that made up the sTILs in each case. We noticed that there were increases profiles of cells favoring immunity and antitumor activity (CD3, CD8 and CD8/FOXP3 ratio) and decreases in the numbers of cells inhibiting tumor activities (FOXP3 and PD1), but significant changes occurred just in FOXP3 and consequently in the CD8/FOXP3

ratio (figure 1). This finding is compatible with the literature, in which chemotherapy is described as stimulating the immune response 15

The presence of a high CD8/FOXP3 ratio in biopsies has been correlated with a higher rate of complete pathological response. Although there was an important numerical increase in the CD8/FOXP3 ratio after NEOCT, we observed that only pre-chemotherapy PD1 showed a significant correlation with complete pathological response (Figure 2). In the literature, the correlation of PD1/PDL1 with immunotherapy has been widely explored, especially with regard to treatment of metastatic breast cancer, but not with chemotherapy alone. Our study suggests that PD-1 levels in TILs could be a candidate for prognostic marker in response of NEOCT, independently of check point inhibitor immunotherapy

### **Conclusion**

In this study, differently from reports in the literature regarding TN breast cancer, we did not find any associations between TILs density and outcomes. This may be explained by the small number of cases and the reduced pathological responses obtained and or the disease stage in which the patients' samples were collected, higher than the averaged found in the literature. However, our findings suggest that PD-1 presence in TILs might be a predictor for pCR. after NEOCT.

### **References**

- 1.Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F.Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 2021 May;71(3):209-249.
- 2.Ravelli A, Roviello G, Cretella D, Cavazzoni A, Biondi A, Cappelletti MR et Al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. Tumor Biology. 2017;39(4)
- 3.Criscitiello C, Esposito A, Trapani D, Curigliano G. Prognostic and predictive value of tumor infiltrating lymphocytes in early breast cancer. Cancer Treat Rev 2016 Nov;50:205-207
- 4.Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R 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: 983–91.

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

6. Heppner B I, Loibl S, Denkert C. Tumor-infiltrating lymphocytes: a promising biomarker in breast cancer. *Breast Care (Basel)* 2016 Apr;11(2):96–100

7. Loi S, Drubay D, Adams S, Pruneri G, Francis AP, Lacroix-Triki M et Al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. *J Clin Oncol* 37:559-569. 2019.

8. Burstein HJ, Curigliano G, Loibl S, Dubsy P, Gnant M, Poortmans P et al. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer The St Gallen International Consensus Guidelines for the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019. *Ann. Oncol.* 30, 1541–1557.

9. Miyashita M, Sasano H, Tamaki K, Chan M, Hirakawa H, Suzuki A et Al. Tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> and FOXP3<sup>+</sup> lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2014 Dec;148(3):525-34.

10. Lotfinejad P, Jafarabadi MA, Shadbad MA, Kazemi T, Pashazadeh F, Shotorbani SS et Al. Prognostic Role and Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): A Systematic Review and Meta-Analysis Study. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Sep; 10(9): 704

11. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon JL, Delozier T, Serinet D et Al. Sequential Adjuvant Epirubicin-Based and Docetaxel Chemotherapy for Node-Positive Breast Cancer Patients: The FNCLCC PACS 01 Trial. *JCO* 2006;24(36):5664-5671.

12. R Salgado, C Denkert, S Demaria, N Sirtaine, F Klauschen, G Pruneri et Al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015 Feb;26(2):259-71
13. Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M et Al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet* 2014 Jun;15(7):747-56.
14. Sermoud L, Gai MF, Ferreira T, Lerner LC, Buscacio G, Pagnoncelli D et Al. Análise da resposta patológica completa e sobrevida estimada em pacientes com câncer de mama em quimioterapia neoadjuvante em instituição privada do estado do Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Oncology* 2021sept VOL 17: e-20210026.
15. Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F et Al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Res* 2011 Feb 1;71(3):768-78.
16. Oner G, Önder S, Karatay H, Ak N, Tükenmez M, Müslümanoğlu M et Al. Clinical impact of PD-L1 expression in triple-negative breast cancer patients with residual tumor burden after neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg Oncol.* 2021; 19: 264