



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

RENATA MONTARROYOS LEITE

**INFLUÊNCIA DOS LINFÓCITOS TUMORAIS INFILTRANTES NO PROGNÓSTICO
E NA SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDAS A
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE**

**ARACAJU
2024**

RENATA MONTARROYOS LEITE

**INFLUÊNCIA DOS LINFÓCITOS TUMORAIS INFILTRANTES NO PROGNÓSTICO
E NA SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDAS A
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof Dr. Carlos Anselmo Lima

Co-Orientador: Prof Dr. Hugo Leite de Farias Brito

**ARACAJU
2024**

RENATA MONTARROYOS LEITE

**INFLUÊNCIA DOS LINFÓCITOS TUMORAIS INFILTRANTES NO PROGNÓSTICO
E NA SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA SUBMETIDAS A
QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: __20__ / __02__ / 2024__

Orientador: Prof. Dr. Carlos Anselmo Lima
Universidade Federal de Sergipe

1º Examinador:
Universidade Federal de Sergipe

2º Examinador:
Universidade Federal de Sergipe

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

L533i	Leite, Renata Montarroyos Influência dos linfócitos tumorais infiltrantes no prognóstico e na sobrevida de pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante / Renata Montarroyos Leite ; orientador Carlos Anselmo Lima ; coorientador Hugo Leite de Farias Brito. – Aracaju, 2024. 54 f. : il. Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2024. 1. Ciências da saúde. 2. Câncer de mama. 3. Quimioterapia neoadjuvante. 4. Linfócitos infiltrantes de tumor. 5. Sobrevida. I. Lima, Carlos Anselmo, orient. II. Brito, Hugo Leite de Farias, coorient. III. Título. CDU 616-006.6
-------	--

Dedico essa obra à minha avó Nicinha: uma mulher muito à frente de seu tempo, uma inspiração a qualquer forma de empoderamento feminino, que, aos quase 96 anos, se faz presente entre nós, de uma maneira fundamental e impressionantemente bela. A ela, “todo amor que houver nessa vida”.

AGRADECIMENTOS

Escrever essa dissertação foi um dos maiores desafios que enfrentei na vida profissional, não apenas pela completa falta de experiência no campo da pesquisa, mas também pelo período conturbado pelo qual eu estava passando, quando decidi ingressar na pós-graduação. Registrar, nessas linhas, momentos desses últimos dois anos faz parte da formação desses agradecimentos. Com 3 filhos pequenos, a construção de uma casa (e sua demanda interminável), e um esposo completamente mergulhado no cenário de concurso público, eu não me preocupava em conseguir terminar, mas em honrar a confiança que muitas pessoas depositaram nesse projeto.

Em meio a casuísticas e métodos, para tudo eu buscava uma comprovação científica, mas a vida real vai muito além do que o homem consegue provar. É quando não achamos respostas, que nos encontramos com Deus. E Ele esteve o tempo inteiro conduzindo as peças-chave do quebra cabeça que a minha rotina diária se tornou. A minha gratidão é um pedido: que Ele faça de minhas palavras, ações.

E se estamos falando de onipresença, eu não posso esquecer das maiores “notas do boletim” da minha vida: Joaquim, Alberto e Mariana. Por diversas vezes, eu precisei me distanciar, mas eles nunca estiveram longe de mim. E, ao lado deles, eu agradeço a Daniel, por provocar, com o seu exemplo, a minha vontade de crescer. A nossa família trouxe a tranquilidade necessária que eu precisava para não desistir.

A possibilidade de realizar sonhos nos impulsiona a vencer desafios, mas é a sorte de encontrar as pessoas certas, que facilita e torna real esse caminho. O meu primeiro encontro foi com Leonardo Ribeiro, quando ainda sem conhecê-lo, pedi, de forma despretensiosa, ajuda, e ele deu um grande estímulo (e o tema) para que tudo começasse.

Não deve ter sido fácil, mas Carlos Anselmo, com a sua capacidade de ensinar com poucas palavras, arrancou de mim um conteúdo que nem eu sabia que existia. Levarei uma imensa gratidão e admiração a esse magnífico pesquisador. A humildade que esconde o seu conhecimento me impressiona em todas as reuniões.

Minha gratidão se estende a Hugo, pela ajuda constante, e a Erika, por ter facilitado tanto o acesso aos dados. Esse casal, que também auxiliou na leitura das lâminas, foi o pilar necessário para que o trabalho acontecesse. Estende-se também a Íkaro, que conduziu brilhantemente os cálculos necessários, e que me mostrou que,

na estatística, um pouco pode virar muito, a Erinaldo e Cecília, pela companhia dos sábados, e pelo suporte nas horas de maior “desespero investigativo”, durante parte da coleta, e a Érica Exaltação, secretária da nossa pós-graduação, pela grande disponibilidade, apoio e torcida. Além disso, eu agradeço a cada colega e professor do curso de mestrado que, na pausa de um tempo que é tão corrido, prestou atenção em mim, e me fez melhor.

E se independência é o objetivo de muitos, interdependência foi o que me guiou nesse processo. Eu tive tempo para atingir o objetivo ao qual me propus, porque Natali e Cris cuidaram dos meus filhos, e porque Patrícia e Verena conduziram as minhas pacientes, na minha ausência. Elas foram o meu corpo fora de mim.

A conclusão desse sonho envolveu todas essas pessoas, mas apenas duas delas estiveram presentes desde o seu início: Carmem e Alberto, os meus pais. Foram eles os grandes idealizadores de todas as minhas conquistas profissionais, quando me fizeram acreditar que dar o melhor de mim seria suficiente para chegar em qualquer lugar.

Dessa forma, essa obra tem muitos autores. Por permitirem que o meu nome figure como o principal, deixo aqui a minha gratidão.

RESUMO

Introdução: Esse estudo fornece uma visão abrangente sobre o câncer de mama, destacando sua natureza heterogênea e os desafios no seu tratamento, com ênfase na avaliação do prognóstico de pacientes de alto risco. A quimioterapia neoadjuvante (QNA) fornece um modelo de validação *in vivo*, capaz de testar a eficiência dos medicamentos, através da resposta patológica do tumor, vista na cirurgia. Identificar fatores tumorais que estejam associados a essa resposta e a melhores desfechos clínicos tem sido um desafio. Diante disso, tem se destacado nos últimos anos a avaliação dos linfócitos tumorais infiltrantes (TILs) como marcadores de resposta à QNA no câncer de mama. Este estudo pretende avaliar os efeitos preditivo e prognóstico dos TILs, de acordo com a sua quantificação nas amostras de biópsia de pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante, de forma a contribuir para condutas terapêuticas mais individualizadas na prática clínica da mastologia. **Objetivos:** Avaliar se há influência dos TILs na sobrevida global e em 5 anos de pacientes com câncer de mama submetidas a QNA, bem como sua relação com a resposta patológica tumoral ao tratamento, estratificando entre os diversos subtipos moleculares. **Casuística e Métodos:** Trata-se de um estudo de sobrevida, com análises uni e multivariadas, utilizando uma coorte retrospectiva de casos tratados entre 2011 e 2017 em Hospital Universitário de Sergipe, cujas lâminas de biópsia foram reanalisadas em relação à quantidade de TILs. Foram utilizados os modelos de riscos proporcionais de Cox, para análise independente entre cada variável clínica e anatomopatológica e a sobrevida e, para a análise da sobrevida, o método de Kaplan-Meier, relacionando quantidade de TILs do tumor inicial, com a resposta patológica completa e sobrevida em 5 anos. **Resultados:** Houve diferenças nos parâmetros anatomopatológicos entre os pacientes vivos e os que evoluíram para óbito. Não houve diferença significativa em relação à expressão de TILs entre os subtipos moleculares. A mediana calculada foi de 5, e mais da metade (63%) da população apresentava TILs < 5%. Não foi demonstrada relação entre TILs e sobrevida global (SVG), porém, na análise de sobrevida (SV) em 5 anos, os pacientes que apresentaram TILs abaixo de 5% evoluíram melhor em todos os subtipos moleculares, de forma estatisticamente significativa. **Conclusão:** Pacientes que apresentaram TILs < 5% em amostras de biópsia apresentaram melhor SV em 5 anos.

Palavras-chave: Biomarcadores tumorais; Linfócitos Infiltrantes do tumor; Neoplasia da Mama; Sobrevida; Terapia neoadjuvante.

ABSTRACT

Introduction: This study provides a comprehensive overview of breast cancer, highlighting its heterogeneous aspects and challenges in treatment, with a focus on assessing the prognosis of high-risk patients. Neoadjuvant chemotherapy (NAC) provides an in vivo validation model capable of testing the efficiency of drugs through the pathological response of the tumor, observed during surgery. Identifying tumor factors associated with this response, and better clinical outcomes has been a challenge. Consequently, the assessment of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer has gained prominence in recent years. This study aims to evaluate the predictive and prognostic effects of TILs, based on their quantification in biopsy samples from patients undergoing neoadjuvant chemotherapy, contributing to more individualized therapeutic approaches in clinical mastology practice. **Objectives:** Evaluate if there is influence of TILs on the overall survival and 5-year survival of breast cancer patients undergoing NAC, as well as their relationship with pathological tumor response to treatment, stratifying among various molecular subtypes. **Patients and Methods:** This is a survival study with uni-and multivariate analyses, using a retrospective cohort of cases treated between 2011 and 2017 at the University Hospital of Sergipe. Biopsy slides were reanalyzed for TILs quantity. Cox proportional hazards models were used for independent analysis of each clinical and pathological variable with survival, and for survival analysis, the Kaplan-Meier method was employed, relating the quantity of TILs in the initial tumor to complete pathological response and 5-year survival. **Results:** There were differences in pathological parameters between patients who were alive and those who deceased. No significant difference was observed in TILs expression among molecular subtypes. The calculated median was 5, and over half (63%) of the population had TILs < 5%. No relationship between TILs and overall survival (OS) was demonstrated. However, in the 5-year survival analysis (5YS), patients with TILs below 5% showed better outcomes in all molecular subtypes ($p < 0,05$). **Conclusion:** Patients with TILs < 5% in biopsy samples exhibited improved 5-year survival.

Descriptors: Tumor Biomarkers. Tumor-Infiltrating Lymphocytes. Breast Neoplasms. Neoadjuvant Therapy. Survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microfotografia em HE exemplificando os padrões de TILs.....	25
Figura 2 - Organograma do Fluxo de Casos do Estudo.....	31
Figura 3 - Quantidade de TILs de acordo com os diversos subtipos moleculares...	33
Figura 4 - Relação entre TILs e pCR.....	34
Figura 5 - Gráfico de dispersão, relacionando TILs e SV global.....	35
Figura 6 - Gráfico de dispersão, relacionando sobrevida global com o tempo entre última quimio e cirurgia.....	35
Figura 7 - Sobrevida em 5 anos de acordo com o TILs.....	36
Figura 8 - Sobrevida em 5 anos de acordo com o TILs em pacientes luminais (puros e híbridos)	37
Figura 9 - Sobrevida em 5 anos de acordo com o TILs em pacientes não luminais (Triplos negativos e Her2 puros)	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos pacientes submetidos a QT neoadjuvante.....	31
Tabela 2 - Análise de sobrevida ajustada para variáveis.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
HER2	Human Epidermal growth factor receptor 2
HR	Hazard ratio
H&E	Hematoxilina e eosina
IHQ	Imunohistoquímica
Ki-67	Antígeno Ki-67 (Kihel 67)
OMS	Organização Mundial de Saúde
pCR	Resposta patológica completa (pathological complete response)
QNA	Quimioterapia neoadjuvante
QT	Quimioterapia
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de Progesterona
SIM	Sistema de informação e mortalidade
SV	Sobrevida
TILs	Linfócitos infiltrantes de tumor
TN	Triplo negativo
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Epidemiologia.....	14
2.2 O Cenário de quimioterapia neoadjuvante no câncer de mama.....	15
2.3 Definição e papel preditivo dos TILs na resposta patológica completa à neoadjuvante e sua associação com prognóstico.....	16
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Amostra.....	22
4.2 Desenho do estudo	22
4.3 Variáveis do estudo.....	22
4.4 Técnicas de coleta de dados e instrumentos	23
4.5 Análise dos TILs.....	24
5 ANÁLISE DOS DADOS	26
5.1 Plano Amostral.....	26
5.2 Análise Estatística	26
6 ASPECTOS ÉTICOS.....	28
7 RESULTADOS	29
7.1 Análise das variáveis clínicas e anatomopatológicas.....	29
7.2 Avaliação de TILs por subtipos moleculares específicos	32
7.3 Correlação entre TILs e pCR	33
7.4 Associação entre TILs e SV global	34
7.5 Associação entre TILs e SV em 5 anos	36
7.6 Ajustada a outras variáveis.....	39
8 DISCUSSÃO	40
9 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS.....	53
Anexo 1- Artigo original (abstract), submetido na <i>Scientific Report</i>	53
Anexo 2- Comprovante de submissão do artigo	54

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é, atualmente, o tumor que mais acomete mulheres no Brasil e no mundo (WHO, 2020). Caracteriza-se como uma doença heterogênea, envolvida por fatores genéticos e ambientais, que apresenta diferentes graus de agressividade e diferentes respostas aos tratamentos para um mesmo tumor (BARZAMAN *et al.*, 2020). Apesar dos avanços das modalidades terapêuticas e diagnósticas, detectar a doença num estágio precoce ainda é um desafio, especialmente em países com piores condições de acesso à saúde (ROSA *et al.*, 2020).

Quimioterapia neoadjuvante (QNA) em câncer de mama refere-se ao tratamento sistêmico antes de uma operação definitiva. Se, no passado, essa modalidade era reservada para pacientes com câncer localmente avançado ou inoperável, atualmente, a função da QNA se expandiu para tumores em estágio inicial, permitindo, nesses casos, melhores resultados cosméticos e menor número de complicações cirúrgicas (ASAOKA *et al.*, 2020).

Embora os estudos não tenham mostrado qualquer diferença de sobrevida entre os esquemas de neoadjuvância *versus* adjuvância, o tratamento neoadjuvante fornece uma modelo de validação capaz de testar a eficácia dos medicamentos, mediante a análise da resposta do tumor à terapia empregada, visualizado no leito cirúrgico. Usa-se o termo resposta patológica completa (pCR) ao tratamento quando essa carga residual tumoral é ausente no momento da cirurgia. Este é um forte marcador para risco de recorrência e desfecho clínico positivo, especialmente em câncer de mama triplo negativo e *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* (Her 2) positivo (CORTAZAR *et al.*, 2014). No entanto, nem sempre a quantidade de doença residual é compatível com a evolução clínica posterior. Por essa razão, a identificação de outros biomarcadores prognósticos ganhou espaço na literatura, dentre eles, os linfócitos tumorais infiltrantes (TILs) (ZHAO-HUA, 2020).

O acesso a informações preditivas do tumor é de grande auxílio na tomada da conduta terapêutica adequada, visto que, por ser uma doença de tanta heterogeneidade, a neoplasia de mama exige uma abordagem cada vez mais individualizada. A utilidade clínica da avaliação dos TILs se encontra exatamente na identificação de tumores que possam responder melhor à imunoterapia, possibilitando

o descalonamento de terapias mais citotóxicas e que gerem maiores efeitos colaterais para os pacientes (EL BAIRI *et al.*, 2021).

Sendo assim, é possível mensurar a quantidade de linfócitos infiltrantes tumorais em lâminas de biópsia de agulha grossa de pacientes submetidas a QT neoadjuvante e relacioná-las com sobrevida global e em 5 anos? Entende-se que, quantificando, em porcentagem, os TILs, nesses exames, pode-se avaliar sua associação com resposta clínica ao tratamento quimioterápico, e sua sobrevida.

Desta forma, este estudo pretendeu, através da análise de diferentes amostras de biópsia de agulha grossa coradas com hematoxilina e eosina (H&E), relacionar a quantidade inicial de TILs com o desfecho clínico de pacientes submetidas a quimioterapia neoadjuvante, buscando avaliar a sobrevida, bem como identificar se houve diferença nessa relação entre os diversos subtipos moleculares tumorais. Na prática clínica, isso pode auxiliar na decisão de quais pacientes têm maior benefício ao uso de quimioterapia antes da cirurgia, e em quais deles se pode descalonar o tratamento, além de se tornar mais uma ferramenta para avaliação prognóstica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

Considerado um problema de saúde pública mundial, o câncer de mama é o mais prevalente e o de maior mortalidade entre mulheres no Brasil e no mundo. Em 2020, com um aumento de 20%, ele se tornou o mais incidente, superando o câncer de pulmão, sendo registrados aproximadamente 2,3 milhões de casos novos e 685 mil óbitos em todo o planeta (WHO,2020). No Brasil, após o câncer de pele não melanoma, essa é a neoplasia mais comum nas mulheres, e em algumas regiões, chega a ser três vezes maior que a segunda mais frequente. Para cada ano do triênio 2023-2025, são esperados 73 610 novos casos (SANTOS, 2023).

Em Sergipe, com 570 novos casos estimados para 2023, essa taxa é de 46 para cada 100mil mulheres (INCA, 2022). Baixas taxas de rastreamento, estágio clínico avançado no diagnóstico, e falta de acesso a tratamento adequado são causas que contribuem para a alta mortalidade da doença (ROSA *et al.*, 2020), e, apesar dos avanços das modalidades terapêuticas e diagnósticas, detectar a doença num estágio precoce ainda é um desafio, especialmente em países com piores condições de acesso à saúde (COSTA, 2019).

A neoplasia de mama é uma doença heterogênea, que apresenta ampla variedade de fatores clínicos e patológicos, prognósticos e histórias naturais distintos, envolvidos por fatores genéticos e ambientais, de modo que um mesmo tumor pode ter diferentes comportamentos, traduzindo-se em variadas manifestações clínicas e respostas a uma mesma terapia, o que torna o seu tratamento bastante desafiador (BARZAMAN *et al.*, 2020).

Nesse contexto, uma abordagem individualizada do paciente tem sido cada vez mais necessária, e diferentes classes de drogas vêm sendo estudadas nesta era, de forma que, embora a classificação histológica do tumor ainda seja comum e importante para definição terapêutica, tem sido crucial a estratificação de subtipos distintos da doença até nível celular, a fim de que sejam desenvolvidas terapias cada vez mais direcionadas e precisas (YEO; GUAN, 2017).

2.2 O cenário de Quimioterapia Neoadjuvante no Câncer de Mama

Quimioterapia neoadjuvante (QNA) consiste no tratamento sistêmico do câncer de mama que precede a terapia loco-regional do tumor primário. Em um primeiro momento, ela era reservada para casos de tumores inoperáveis, com o objetivo principal de reduzir o tamanho da lesão, facilitando o procedimento cirúrgico. Com o passar dos anos, passou a ser estudada em diversos cenários, e, atualmente, além de ser parte essencial na abordagem do paciente com câncer de mama localmente avançado, é indicada para alguns subgrupos de pacientes que se encontram estágio inicial da doença (ASAOKA *et al.*, 2020).

Os primeiros ensaios clínicos envolvendo QNA datam da década de 70, onde foi visto que o câncer de mama localmente avançado, tratado apenas com cirurgia e radioterapia, apresentava um alto índice de recidiva, inclusive à distância, e que esquemas quimioterápicos demonstravam uma tendência prognóstica favorável em relação a taxas de sobrevida (DE LENA *et al.*, 1978). Estudos não randomizados analisaram a QNA com uma variedade de regime de drogas, e observaram que a resposta patológica completa (pCR), ou ausência completa de tumor em sítio cirúrgico, observada na cirurgia realizada após a terapia neoadjuvante, estava associada a maiores taxas de sobrevida (HEYS, 2001).

O ensaio B-18 do grupo NSABP, realizado em 1997, comparou o uso neoadjuvante e adjuvante de um mesmo regime de quimioterapia. A hipótese era avaliar a diferença de sobrevida global e livre de doença entre os dois esquemas, e, de forma secundária, a redução do tumor inicial. Não houve diferença estatística nos índices de sobrevida, mas foi demonstrada uma melhor resposta à QNA nas pacientes mais jovens, gerando, posteriormente, evidências de que esse subgrupo de mulheres, cuja maioria apresentava receptores hormonais negativos em seus tumores, poderia se beneficiar da quimioterapia precoce, em detrimento daquelas mais velhas, que, em sua maioria apresentavam receptores positivos (COLLEONI *et al.*, 2000).

Estudos seguintes se sucederam, onde foram analisadas outras variáveis que sofriam interferência da QNA, como o EORTC-10902, que evidenciou a eficácia da cirurgia conservadora após a redução tumoral, com iguais taxas de recorrência local e sobrevida que as mastectomias realizadas em tumores ressecáveis num primeiro momento. Embora esse trabalho não tenha mostrado qualquer diferença entre os esquemas de neoadjuvância *versus* adjuvância em termos de desfechos de

sobrevida, algumas vantagens foram vistas na adoção da QNA, entre elas a monitoração de resposta *in vivo* e a possibilidade de mudanças estratégicas em caso de quimiorresistência (fornecendo assim um modelo de validação), bem como a possibilidade de tornar o paciente, anteriormente candidato a mastectomia total, elegível a uma cirurgia conservadora, nos casos de redução do tumor (VAN NES *et al.*, 2009).

Novas estratégias no manejo de drogas quimioterápicas no esquema neoadjuvante foram se somando na evolução dos estudos, dentre eles o NSABP- 27 (MAMOUNAS, 1997) e o Gepar Duo (VON MINCKWITZ, 2005), e foi se tornando cada vez mais evidente que pCR poderia servir como um marcador para a sobrevida. Nesse cenário, após a publicação de uma metanálise, em 2014 (CORTAZAR *et al.*, 2014), as agências regulamentadoras Européia de medicamentos e norte-americana Food and Drug Administration (FDA) passaram a apoiar o uso da resposta patológica completa, em ensaios clínicos randomizados neoadjuvantes, como um marcador substituto para o desfecho clínico de longo prazo (sobrevida livre de doença e sobrevida global), no processo de aprovação dos medicamentos. Análises de estudos posteriores não acompanharam esses resultados (CONFORTI *et al.*, 2021), de forma que a validação desse método como fator prognóstico de sobrevida manteve-se limitada.

2.3 Linfócitos Tumoraes Infiltrantes (TILs): definição, significado biológico e seu papel no câncer de mama

Por muito tempo, a rotina diagnóstica da patologia do câncer de mama se baseou na análise imuno-histoquímica de marcadores, que classificou o carcinoma em subtipos moleculares intrínsecos, de acordo com a expressão de receptores, em luminais, que expressam receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP), e, portanto, são sensíveis a hormonioterapia, Her-2 positivos ou superexpressos, que expressam o receptor do fator de crescimento epidérmico (Her-2), e são responsivos a terapias alvo de anticorpo conjugados contra esse receptor, e triplo negativos, que não expressam receptores e são, portanto, insensíveis às terapias acima descritas (HU, 2006). Com isso, a prática clínica se concentrou principalmente na administração de terapia endócrina, anti Her-2 e/ou citotóxica, baseada nos subtipos de câncer de mama previamente definidos (EMENS, 2012).

Nas últimas décadas, entretanto, os mecanismos imunológicos envolvidos no microambiente tumoral foram extensivamente estudados, e o conceito de “imunoeedição”, que se baseia no princípio de eliminação do reconhecimento de células T de antígenos tumorais, passou a intrigar pesquisadores na busca de novas formas de tratar a doença (DUNN, 2004).

Baseado nesse conceito, a interação entre células imunes e tumor passam por um processo de 3 fases (eliminação, equilíbrio e escape), onde linfócitos relacionados com a vigilância imunológica (células TCD8+, T CD4+ e Th1 e células NK) reconhecem e eliminam as células malignas num primeiro momento. Estas, por sua vez, passam por uma seleção natural e se proliferam em clones malignos mais propensos a escapar do sistema imunológico (reduzindo a expressão de antígenos de superfície, tornando-se invisíveis às células imunes, e promovendo a proliferação de células imunossupressoras, como FOXP3+, Tregs, e célula supressora mieloide), além de expressar moléculas de “*checkpoints*”, que também causam esse bloqueio imunológico. A consequência disso é uma supressão deletéria de todo esse sistema de defesa (DUNN, 2004).

A percepção de que há uma interação imunológica entre o infiltrado linfocitário e as células tumorais, com evidências crescentes que indicam que o microambiente tumoral desempenha um papel importante na formação, crescimento, invasão e metástase do tumor, ajudou a reconhecer o efeito prognóstico dos linfócitos tumorais infiltrantes e da sua associação com resposta à quimioterapia (MCALLISTER, 2010).

Inicialmente relatada para carcinoma colorretal e melanoma (ORGINO, 2009; AZIMI, 2012), a presença de TILs foi associada a melhores desfechos e sua relação com a atividade de imunoterápicos foi explorada nessas patologias (THOMAS, 2013). Com o sucesso do controle imunológico nesses tumores, tornou-se necessária a clareza sobre o papel prognóstico e preditivo do infiltrado imunológico do câncer de mama (BIANCHINI, 2021).

Em 2010, Denkert *et al.* (2010) analisaram em mais de 1000 amostras de dois estudos prospectivos prévios, a presença de TILs no estroma e dentro do tumor de pacientes com câncer de mama submetidas à QNA, mostrando uma associação forte entre infiltrado linfocítico e resposta patológica completa (pCR) à quimioterapia, independentemente do regime de droga aplicado. A metodologia de avaliação utilizada nesse estudo serviu de base para a construção das recomendações de avaliação de TILs, propostas pelo *International TILS Working Group*, que descreveu,

de forma detalhada e ilustrativa, as recomendações da análise dessas células (disponível, gratuitamente, no website www.tilsinbreastcancer.org), no intuito de padronizar e tornar essa metodologia mais reprodutível (SALGADO, 2015).

Esse mesmo grupo de autores apresentaram resultados de desfechos semelhantes em 2015, quando, novamente avaliando de forma prospectiva 580 amostras de tumores Her2 e triplo negativos (TN) de pacientes do estudo GeparSixto, correlacionaram a presença de TILs e pCR nesses subtipos tumorais, e validaram a relevância dos TILs como preditores de resposta à QNA (DENKERT, 2015.).

Uma larga análise multivariada de dados de expressão gênica de 996 pacientes evidenciou a presença de alta resposta imune associada a pCR em tumores hormonais negativos, especialmente o Her 2 (IGNATIADIS, 2012).

LOI *et al.*, (2013) analisaram a relação da quantidade de TILs em amostras de pacientes de um estudo fase III e sua associação com a sobrevida livre de doença e sobrevida global em resposta à quimioterapia. Em pacientes TN, para cada 10% de incremento no TILs intratumoral, foi observado uma redução de risco de recidiva de 17%, enquanto no componente estromal, para o mesmo acréscimo, foi observada uma queda de 15% do índice de recidiva, mostrando uma excelente associação prognóstica nesses subtipos tumorais.

Baseado nesses estudos, com nível 1B de evidência, a presença de TILs passou a ser considerada como marcador prognóstico em tumores triplo negativos e Her2 positivos em alguns consensos (TAN, 2020; CARDOSO, 2019). Apesar disso, não há, atualmente, orientação consensual de descalonamento terapêutico baseado na presença desse achado (BURNSTEIN, 2019).

Com relação a dados em tumores residuais, um estudo japonês comparou, retrospectivamente, níveis de TILs antes e após QNA, encontrando uma relação direta e significativa entre a quantidade de TILs pré QT e pCR em todos os subtipos moleculares. Ainda nesse estudo, pacientes com subtipos moleculares Her 2 e TN apresentaram uma sobrevida livre de doença em 5 anos significativamente maior quando apresentavam níveis de TILs altos antes da QNA (HONG *et al.*, 2021).

No entanto, o significado clínico dos TILs em pacientes com diferentes subtipos moleculares ainda não está claro. Em uma metanálise publicada em 2020, os autores analisaram o valor prognóstico e preditivo de TILs em pacientes com diferentes subtipos moleculares, estimando o impacto na sobrevida livre de doença e na sobrevida global, e concluíram que, para os subtipos Her 2 e triplo negativo, a

presença e a quantificação de TILs estavam relacionadas, significativamente a maiores de taxas de pCR, bem como de melhores desfechos de sobrevida global e livre de doença. Já para o subtipo luminal, não foi observado aumento significativo na taxa de pCR, e a análise conjunta confirmou que os pacientes que apresentaram maiores expressões de TILs nesse subgrupo, tiveram uma taxa de sobrevida global desfavorável (ZHAO-HUA, GAO *et al.*, 2020).

Em relação a sua distribuição, tanto TILs estromais (dispersos em células do estroma, entre as células do carcinoma), quanto TILs intratumorais (que estão em contato direto com a célula do tumor), podem ser consideradas infiltrações linfocíticas, porque essas células não se comportam de forma estática, mas se movimentam dentro do microambiente tumoral (SALGADO, 2015).

A maioria dos artigos analisaram o TILs em estroma, definindo-os com a área contendo os linfócitos (excluídas áreas de necrose, carcinoma in situ e tecido mamário normal) dividida pela área total estromal, com resultado obtido de forma aproximada, em porcentagem. Este é um método mais reprodutível, que requer apenas avaliação pelo método de H&E, enquanto os TILs intratumorais estão presentes em números menores e em menor número de casos, tornando difícil sua avaliação sem o uso de imuno-histoquímica (IHQ) (SALGADO, 2015).

Vale frisar ainda que estudos que avaliaram os subconjuntos de linfócitos por IHQ mostraram resultados prognósticos semelhantes ao que realizaram análise com H&E. O mesmo se deu quando se comparou H&E com o método mais robusto de expressão de mRNA, analisando a informação preditiva de resultados de TILs (DENKERT, 2015).

Considerando que a análise do TILs é uma variável contínua, não existe um corte universal para classificação de tumores “ricos” em linfócitos e nem houve um limite clinicamente relevante nessa avaliação, de forma que os estudos são bastante heterogêneos na classificação. Nas recomendações do grupo internacional, os TILs foram divididos da seguinte forma (SALGADO, 2015):

- Baixo: 1% - 10%
- Intermediário 11% - 59%
- Alto ($\geq 60\%$).

Diante do exposto, existe hoje uma clara associação na literatura entre resposta imunológica ao tumor e desfecho clínico. O nível de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) tem sido considerado um grande marcador, especialmente para alguns

subtipos moleculares, sugerindo que sua avaliação na prática clínica diária seja de extrema relevância. Como eles estão associados, em alguns subtipos tumorais, a uma melhor sobrevida, eles podem ser integrados, por exemplo, em modelos existentes de previsão de risco, a fim de auxiliar na decisão do esquema terapêutico quimioterápico proposto. Da mesma forma, a sua associação com o pCR pode predizer maior ou menor recorrência, por exemplo, acarretando na necessidade ou não de novas intervenções, conforme sugerido por Dushyanthen em 2015.

Ainda são necessários estudos prospectivos para esclarecer a utilidade desses marcadores nos diferentes subtipos moleculares, de forma que possamos entender de forma mais precisa os mecanismos de TILs e obtermos mais evidências para desenvolvimento a imunoterapia no câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se há influência do percentual de TILs na sobrevida global e em 5 anos de pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia neoadjuvante.

3.2 Objetivos Específicos

- Mensurar a resposta patológica tumoral, decorrente da quimioterapia neoadjuvante, em pacientes câncer de mama de acordo com a densidade de TILs presentes nas amostras de biópsia de agulha grossa de tumor antes da quimioterapia.
- Estratificar esses resultados de acordo com o subtipo molecular

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Unidade de Patologia e Morfologia do Hospital Universitário de Sergipe (HU), serviço onde foram analisadas as lâminas de biópsia e revisados os laudos, e que possui toda infraestrutura para a realização da revisão histológica, como bancada e microscópio óptico binocular.

4.1 Amostra (seleção de pacientes)

A população alvo do estudo foi formada por pacientes portadoras de carcinoma da mama, tratadas previamente por quimioterapia neoadjuvante, e que foram submetidas a procedimento cirúrgico com fim de tratamento entre 2011 e 2017, no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Essas pacientes foram selecionadas a partir da amostra de uma coorte retrospectiva (BRITO, 2022).

4.2 Desenho de Estudo

Trata-se de um estudo de sobrevida com análises uni e multivariadas, utilizando uma coorte retrospectiva de pacientes portadoras de carcinoma da mama, submetidas a pelo menos 3 ciclos de quimioterapia neoadjuvante, seguidos de tratamento cirúrgico, cujas lâminas de biópsia foram submetidas a reanálise, para avaliação da quantidade de linfócitos tumorais infiltrantes.

4.3 Variáveis do Estudo

Foram incluídos:

- Pacientes do sexo feminino;
- Maiores que 18 anos;
- Diagnóstico de carcinoma invasivo da mama;
- Estadiamento clínico de I a III pelo 7th American Joint Committee on Cancer-AJCC;
- Mínimo três ciclos de quimioterapia neoadjuvante;

Critérios de exclusão:

- Neoplasia maligna da mama não carcinoma (por exemplo: tumor *phyllodes* maligno, linfoma ou sarcoma);

- Pacientes não submetidas quimioterapia prévia;
- Sexo masculino;
- Estadio IV
- Lâminas de biópsia em mal estado de conservação, que não permitisse a avaliação adequada da quantidade de TILs.

4.4 Técnicas de Coleta de Dados e Instrumentos

A coleta de dados foi realizada em quatro etapas, a seguir:

a) Coleta de dados em prontuários:

Informações clínicas obtidas mediante revisão dos prontuários dos serviços de arquivo médico do HU/UFS, incluindo:

- Idade da paciente,
- Tipo histológico do tumor inicial
- Índice mitótico, grau nuclear e histológico do tumor inicial
- Regime quimioterápico administrado,
- Intervalo entre o último ciclo e a data da cirurgia,
- Estadiamento clínico inicial
- Perfil imunohistoquímico: Receptores de estrógeno, Receptores de progesterona, Her-2, Ki 67 (quando não disponível em prontuário clínico, os laudos originais da imuno-histoquímica das pacientes foram acessados).

b) Coleta de dados dos laudos anatomopatológicos do Serviço de Patologia do Hospital Universitário:

Foi feita uma revisão dos laudos anatomopatológicos do serviço de Patologia do hospital, com avaliação de presença ou ausência de neoplasia residual à avaliação microscópica e características dessa doença quando presente na peça cirúrgica.

Os linfonodos axilares também foram avaliados e considerados na avaliação de resposta patológica após o tratamento.

A avaliação da carga residual do câncer (RCB), quando presente, seguiu o padrão de categoria descrito na literatura de quatro níveis de variável (RCB “classes” 0, 1, 2 e 3). A resposta patológica completa (pCR ou RCB-0), foi definida como nenhum tumor residual viável em mama ou axila (ypT0N0) (NAHLEH Z. *et al.*, 2008). A classificação molecular dos casos foi baseada nas recomendações do St Gallen

International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer (GOLDHIRSCH,2013): Luminal A, Luminal B, HER-2 positivo e Triplo negativo. O diagnóstico histológico foi realizado de acordo com os critérios estabelecidos na classificação da OMS (LAKHANI, 2012).

c) Revisão de lâminas de biópsia de agulha grossa das pacientes operadas no Hospital Universitário

Foram selecionadas, de forma retrospectiva, lâminas de exames diagnósticos de biópsia de agulha grossa, provenientes de serviços de patologia, aos quais as pacientes submetidas a QNA e operadas no HU/UFS no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2017, foram inicialmente atendidas.

As lâminas foram analisadas por dois patologistas, e foi avaliada a concordância entre os mesmos. Os investigadores não tiveram acesso aos dados clínicopatológicos, nem ao seguimento das pacientes.

Foram aferidas as seguintes características tumorais:

- Tipo histológico,
- Graus histológico e nuclear,
- Avaliação dos linfócitos infiltrantes tumorais (TILs), descrita em porcentagem

d) Status vital:

Os dados sobre a sobrevida das pacientes foram obtidos através da análise do sistema de informação de mortalidade (SIM) do estado de Sergipe.

Para a análise de sobrevida, avaliada em sobrevida global e em 5 anos, foi calculado o tempo entre a data do diagnóstico (biópsia) e a data do óbito por câncer de mama ou a data do último registro nos pacientes que sobreviveram.

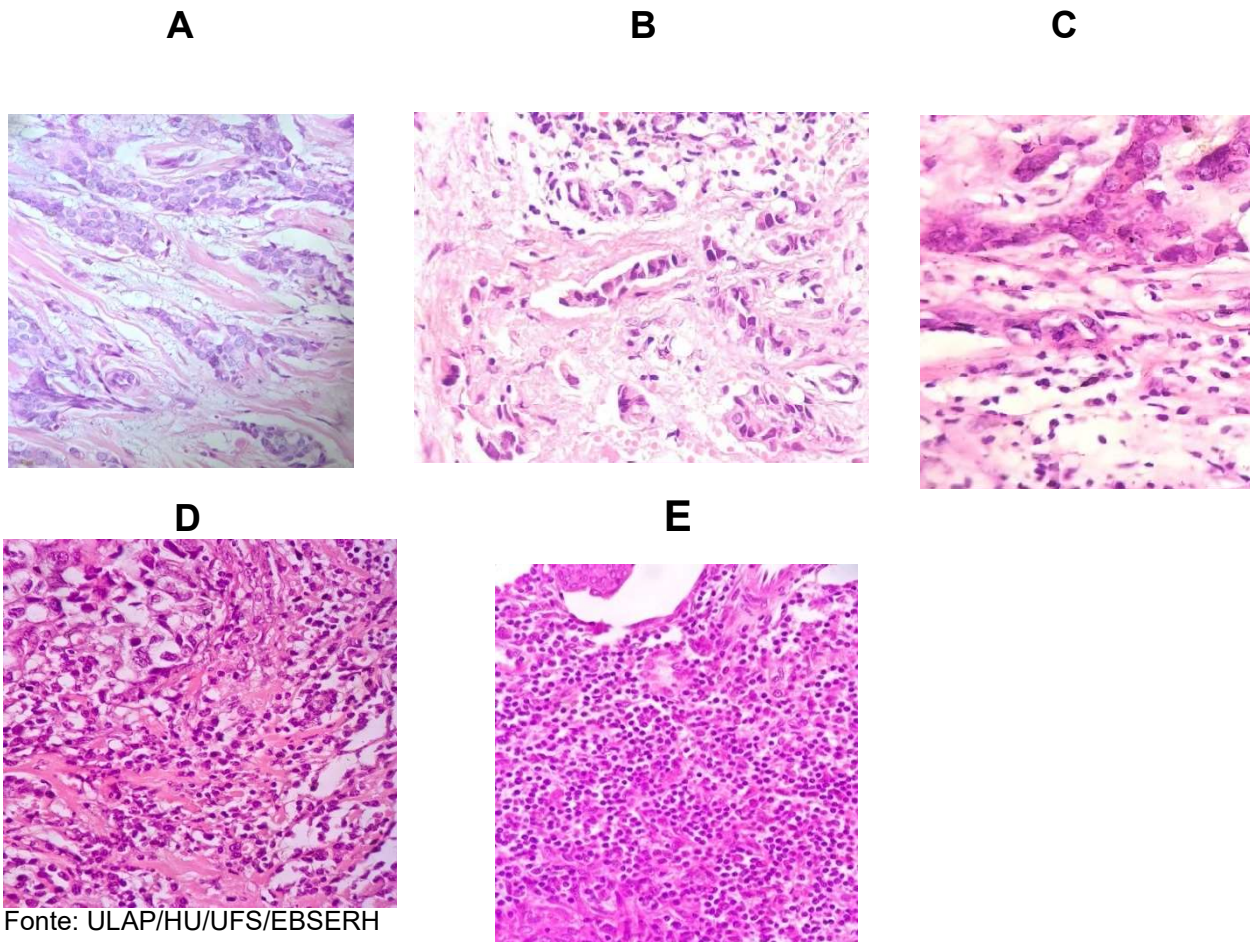
4.5 Análise dos TILs

A análise dos linfócitos infiltrantes foi realizada mediante critérios de padronização propostos pelo *International TILs Working Group* (SALGADO *et al.*, 2015), com adaptações permissíveis dentro desse padrão, conforme descrição detalhada a seguir:

- Seções de 4–7 μ m (visto que a espessura proposta não é crítica), fixados em parafina e embebido em formalina.
- Ampliação $\times 200$ – $400\times$.

- Avaliação por H&E.
- Avaliação semiquantitativa, tendo com parâmetro a área do estroma: os TILs foram relatados como uma porcentagem geral da área estromal, dentro dos limites do tumor invasivo (utilizando com denominador da avaliação a área estromal ocupada pelas células inflamatórias, e excluindo qualquer infiltrado linfocítico ao redor de lóbulos normais, ou ao redor de CDIS, ou em áreas de diatermia, ou artefato de esmagamento/ necrose ou em local de biópsia anterior).
- As áreas contendo leucócitos polimorfonucleares e granulócitos foram excluídas da avaliação final, tendo sido quantificadas apenas as células mononucleares.
- A avaliação levou em consideração uma estimativa da ocupação geral do estroma, de modo a avaliar toda a quantidade de TILs do tumor até a borda invasiva.
- A pontuação final foi definida em porcentagens, entre 1 e 100% (Figura 1)

Figura 1 - Microfotografia em HE exemplificando os padrões de TILs: A. 1%; B. 5%; C 20%; D 40%; E 90%.



5 ANÁLISE DOS DADOS

5.1 Plano Amostral

Supondo que queiramos comparar as curvas de sobrevida entre o grupo exposto (E) e não exposto (F) num ensaio clínico com um tempo de seguimento de t anos, o modelo de risco proporcionais de Cox é dado por: $h(t|X) = h_0(t) \exp(\beta_1 X_1)$. Seja n_E o número de participantes no grupo E e n_F o número de participantes no grupo F, nós queremos testar a hipótese de $H_0: HR = 1$ contra $H_1: HR \neq 1$, onde $HR = \exp(\beta_1)$, a razão de risco mínima significativa do grupo E contra o grupo F, considerando α o nível de significância num teste bicaudal, com poder de teste $1 - \beta$. Se a razão entre o número de participantes no grupo E e o grupo F é $k = n_E/n_F$, então: $n_E = m k p_E + p_F$, $n_F = m p_E + p_F$. Onde p_E é a probabilidade de óbito no grupo E, p_F é a probabilidade de óbito no grupo F e m é: $m = \frac{1}{k} \frac{(kHR + 1)HR - 1}{2(z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}$. Onde $z_{1-\alpha/2}$ e $z_{1-\beta}$ são o 100 $(1 - \alpha/2)$ e 100 $(1 - \beta)$ quantis da distribuição normal padrão (ROSNER, 2006).

Sendo assim, assumindo um poder de 80%, um nível de significância de 5%, proporção entre expostos e não expostos de 1:1, probabilidade de óbito em ambos os grupos de 50% e razão de risco de magnitude 3,9, são necessários 23 pacientes em cada grupo, totalizando 46 pacientes.

5.2 Análise Estatística

As variáveis categóricas foram descritas por meio de frequência absoluta e relativa percentual, e as contínuas por meio de média, mediana, o desvio-padrão e intervalo interquartil. A hipótese de independência entre variáveis categóricas foi testada por meio do teste Qui-Quadrado de *Pearson* e Exato de *Fisher*.

A hipótese de aderência das distribuições contínuas e distribuição normal foi testada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Como não foi confirmada, as hipóteses de igualdade de medidas de posição foram testadas por meio dos testes de *Mann-Whitney* (2 grupos independentes) ou *Kruskal-Wallis* (3 ou mais grupos).

As correlações entre variáveis contínuas foram avaliadas utilizando a correlação de *Spearman* (Dancey, Reidy, 2007). A correlação de *Spearman* possui como interpretação: pequena ($R < 0,4$), média ($0,4 < R < 0,7$) e grande ($R > 0,7$).

(DANCEY, 2004). As curvas de sobrevida foram estimadas por meio do método de *KaplanMeier*, e a hipótese de igualdade das curvas de sobrevida, por meios testes *LogRank*. Para avaliar a concordância entre os avaliadores foi aplicado o coeficiente de correlação intraclasse.

Foram estimadas razões de risco (*Hazard Ratio*) brutas e ajustadas por meio da regressão de Cox e o pressuposto de riscos proporcionais de cada modelo foi testada por meio do teste dos resíduos de Schoenfeld. O software adotado em todas as análises foi o R Core Team 2023 (Versão 4.2.3) e o nível de significância adotado, de 5%.

6 ASPECTOS ÉTICOS

Trata-se de estudo realizado por meio da análise de prontuários, de laudos já emitidos, e de lâminas já confeccionadas e previamente analisadas, tendo sido, portanto, dispensado a utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A confidencialidade dos dados e o anonimato das pacientes foram assegurados.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS) segundo recomendações da Resolução CNS 466/12, sob o número de CAAE 629670322.8.0000.5546 conforme parecer de número 5.925.948.

7 RESULTADOS

7.1 Análise das Variáveis Clínicas e Anatomopatológicas

A tabela 1 apresenta um conjunto de dados relacionados ao câncer de mama, fornecendo informações relevantes sobre características histológicas, clínicas e moleculares. O número de pacientes submetidas a QT neoadjuvante no HU/UFS no período designado para o estudo foi de 142.

Foram excluídos 96 casos, por condição inadequada de preparo ou fixação, com prejuízo da análise da lâmina, extravio ou impossibilidade de acesso ao material (seja ele a lâmina inicialmente corada ou o bloco de parafina), de forma que o número amostral final é de 46 pacientes - Figura 2).

Em relação à idade dos participantes, a mediana é de 49,5 anos, com um intervalo interquartil (IIQ) variando entre 42 e 60 anos. O tipo histológico mais prevalente é o ductal, representando 87% dos casos. Os tipos lobular, micropapilar e mucinoso apresentam proporções menores, com 2,2%, 2,2% e 8,7% respectivamente. Quanto ao grau histológico pré-tratamento neoadjuvante, observa-se que o grau 2 é o mais comum, com uma prevalência de 66,7%. Os graus 1 e 3 correspondem a 15,6% e 17,7% dos casos, respectivamente.

Referente ao grau nuclear pré-tratamento neoadjuvante, o grau 2 e o grau 3 são os mais predominantes, com 47,8% dos casos cada. O grau 1 é observado em 4,3%. O índice mitótico pré-tratamento neoadjuvante revela que o índice 1 representa a maioria dos casos, com 80%, enquanto o índice 2 corresponde a 17,8% e o índice 3 apenas 2,2%. A porcentagem de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs %), com uma mediana de 5 e um IIQ de 1 a 15, demonstra que 37% dos casos apresentam valores acima de 5, enquanto 63% têm valores menores ou iguais a 5. A sobrevivência, expressa em meses, tem uma mediana de 60 meses, com um IIQ de 40 a 60. O tempo entre a última QT e a cirurgia, expressa em semanas, tem uma mediana de 21 semanas, com um IIQ de 13 a 31 sendo observado atraso (mais que 6 semanas) em 93,3% das pacientes. A resposta patológica completa (pCR) é observada em 17,4% dos casos.

No que diz respeito ao grau nuclear pós-tratamento neoadjuvante, observa-se a distribuição da seguinte forma: 15,2% no grau 0, 39,1% no grau 1, 30,4% no grau 2 e 15,2% no grau 3. Os resultados dos receptores mostram que 65,2% dos casos

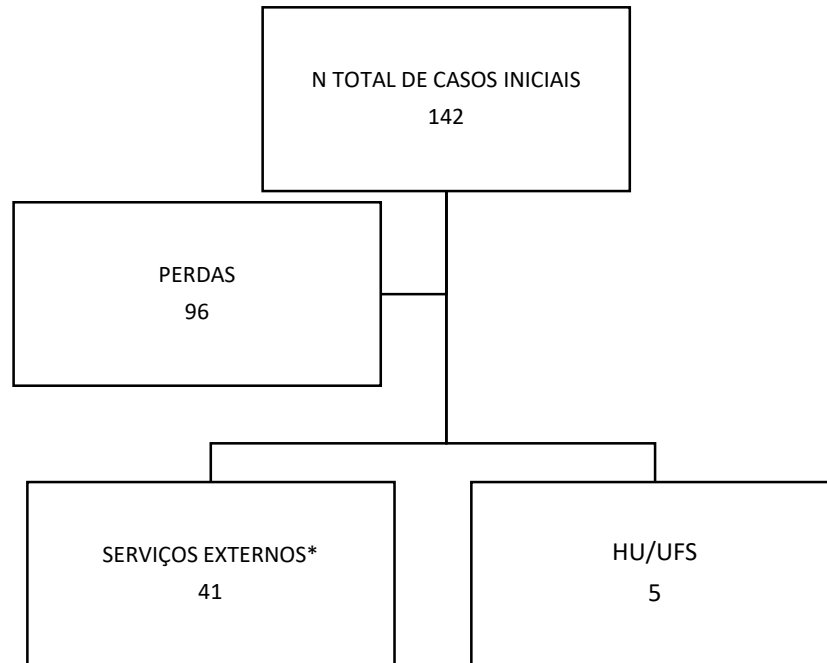
apresentam um status positivo para o receptor de estrogênio (RE), enquanto 34,8% têm status negativo.

Para o receptor de progesterona (RP), 56,5% dos casos são positivos, enquanto 43,5% são negativos. O status do HER2 revela que 23,2% dos casos são positivos, enquanto 76,1% são negativos. O Ki67, que reflete a taxa de proliferação celular, apresenta uma mediana de 0,4 e um IIQ de 0,2 a 0,6. Por fim, os subtipos moleculares são classificados da seguinte maneira: 10,9% dos tumores são do subtipo HER2 puros, 50% são luminais puros, 26,1% são triplo negativos e 13% são triplo positivos.

Ao avaliar o cruzamento entre desfecho do paciente e as demais variáveis foi possível observar alguns resultados significativos. No grupo de pacientes vivos (n=32, representando 69,6% do total), a mediana de sobrevivência foi de 60 meses, com um intervalo interquartil (IIQ) entre 59 e 60 meses. Já no grupo de óbitos (n=14, representando 30,4% do total), a mediana de sobrevivência foi de 31 meses, com um IIQ de 18 a 40 meses. A diferença de sobrevivência entre os dois grupos foi estatisticamente significativa, com um valor-p menor que 0,001.

Quanto ao grau nuclear pós-tratamento neoadjuvante, os resultados mostram que no grupo de pacientes vivos, a distribuição foi a seguinte: 18,8% no grau 0, 43,8% no grau 1, 34,4% no grau 2 e 3,1% no grau 3. No grupo de óbitos, a distribuição foi de 7,1% no grau 0, 28,6% no grau 1, 21,4% no grau 2 e 42,9% no grau 3. Essa diferença também foi estatisticamente significativa, com um valor-p de 0,007. A análise dos receptores hormonais revelou que no grupo de pacientes vivos, 78,1% apresentaram status positivo para o receptor de estrogênio (RE), enquanto no grupo de óbitos, esse percentual foi de 35,7%. Essa diferença foi estatisticamente significativa, com um valor-p de 0,008.

Referente ao receptor de progesterona (RP), 68,8% dos pacientes vivos tiveram status positivo em comparação com 28,6% dos pacientes falecidos. Essa diferença também foi estatisticamente significativa, com um valor-p de 0,022. A taxa de proliferação celular, medida pelo Ki67, mostrou uma diferença significativa entre os grupos. No grupo de pacientes vivos, a mediana de Ki67 foi de 0,3, com um IIQ de 0,1 a 0,4, enquanto no grupo de óbitos, a mediana foi de 0,7, com um IIQ de 0,5 a 0,8. A diferença entre as medianas foi estatisticamente significativa, com um valor-p de 0,013.

Figura 2 - Organograma do Fluxo de Casos do Estudo

Fonte: (Elaborado pela autora, 2023)

Legenda: * SOLIM LABORATÓRIOS: Anatomia Patológica. Aracaju-SE; LAPMA - Laboratório de Anatomia Patológica Dra. Mônica de Araújo. Aracaju-SE; PATOLOGIKA. Aracaju-SE; LabPac- Laboratório de Citologia e Patologia. Aracaju- SE; Laboratório de Patologia Dra Maria do Carmo. Aracaju- SE

Tabela 1 - Características clínico - patológicas dos pacientes submetidos a QT neoadjuvante

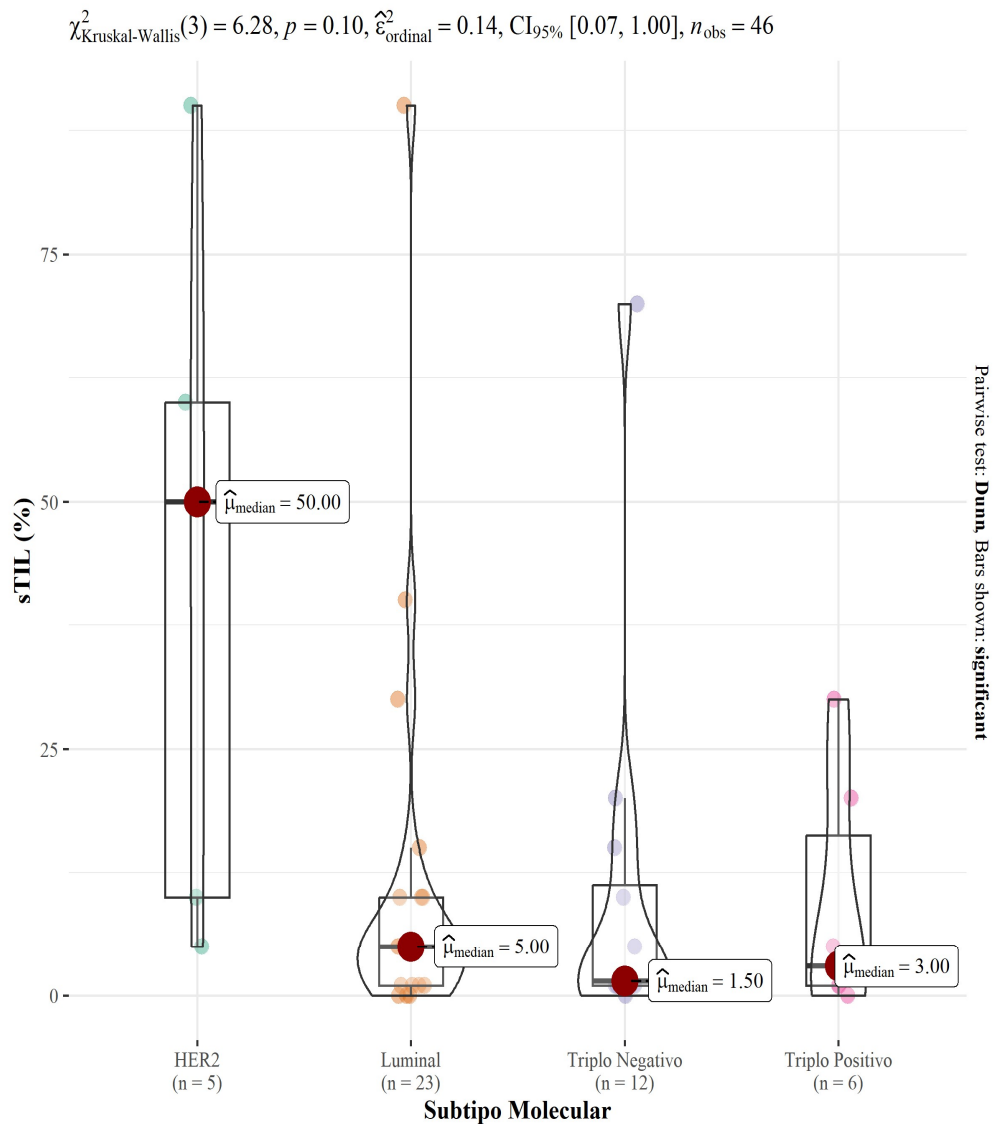
	Total (n=46)	Vivo (n=32/69,6 %)	Óbito (n=14/30,4 %)	valor-p
IDADE (anos), Mediana [IIQ]	49,5 [42-60]	51,5 [42-60]	47,5 [42-56]	0,747 ^M
Tipo Histológico, n (%)				
Ductal	40 (87)	28 (87,5)	12 (85,7)	0,661 ^Q
Lobular	1 (2,2)	0 (0)	1 (7,1)	
Micropapilar	1 (2,2)	1 (3,1)	0 (0)	
Mucinoso	4 (8,7)	3 (9,4)	1 (7,1)	
Grau histológico pré-tratamento neoadjuvante, n (%)				
1	7 (15,6)	6 (19,4)	1 (7,1)	0,085 ^Q
2	30 (66,7)	22 (71)	8 (57,1)	
3	8 (17,7)	3 (9,7)	5 (35,7)	
Grau nuclear pré-tratamento neoadjuvante, n (%)				
1	2 (4,3)	1 (3,1)	1 (7,1)	0,058 ^Q
2	22 (47,8)	19 (59,4)	3 (21,4)	
3	22 (47,8)	12 (37,5)	10 (71,4)	
Índice mitótico pré-tratamento neoadjuvante, n (%)				
1	36 (80)	27 (87,1)	9 (64,3)	0,085 ^F
2	8 (17,8)	3 (9,7)	5 (35,7)	
3	1 (2,2)	1 (3,2)	0 (0)	
sTIL %, Mediana [IIQ]	5 [1-15]	5 [1-12,5]	10 [2-15]	0,229 ^M

	Total (n=46)	Vivo (n=32/69,6 %)	Óbito (n=14/30,4 %)	valor-p
sTIL %, n (%)				
>5	17 (37)	9 (28,1)	8 (57,1)	0,097 ^F
<=5	29 (63)	23 (71,9)	6 (42,9)	<0,001 ^M
Sobrevivência (meses), Mediana [IIQ]	60 [40-60]	60 [59-60]	31 [18-40]	
Tempo entre última quimio e cirurgia (semanas), Mediana [IIQ]	21 [13-31]	23 [13-35]	21 [16-25]	0,249 ^M
Atraso na cirurgia (>6 semanas)				
Sim	42 (93,3)	31 (96,9)	11 (84,6)	0,196 ^F
Não	3 (6,7)	1 (3,1)	2 (15,4)	
pCR, n (%)				
Sim	8 (17,4)	6 (18,8)	2 (14,3)	1,000 ^F
Não	38 (82,6)	26 (81,3)	12 (85,7)	
Tipo histológico pré-tratamento neoadjuvante, n (%)				
Ductal	43 (93,5)	29 (90,6)	14 (100)	0,543 ^F
Mucinoso	3 (6,5)	3 (9,4)	0 (0)	
Grau nuclear pós-tratamento neoadjuvante, n (%)				
0	7 (15,2)	6 (18,8)	1 (7,1)	0,007 ^Q
1	18 (39,1)	14 (43,8)	4 (28,6)	
2	14 (30,4)	11 (34,4)	3 (21,4)	
3	7 (15,2)	1 (3,1)	6 (42,9)	
RE, n (%)				
Positivo	30 (65,2)	25 (78,1)	5 (35,7)	0,008 ^F
Negativo	16 (34,8)	7 (21,9)	9 (64,3)	
RP, n (%)				
Positivo	26 (56,5)	22 (68,8)	4 (28,6)	0,022 ^F
Negativo	20 (43,5)	10 (31,3)	10 (71,4)	
HER 2, n (%)				
Positivo	11 (23,9)	7 (21,9)	4 (28,6)	0,713 ^F
Negativo	35 (76,1)	25 (78,1)	10 (71,4)	
KI67, Mediana [IIQ]	0,4 [0,2-0,6]	0,3 [0,1-0,4]	0,7 [0,5-0,8]	0,013 ^M
SUBTIPO MOLECULAR, n (%)				
HER2	5 (10,9)	2 (6,3)	3 (21,4)	0,076 ^Q
Luminal	23 (50)	19 (59,4)	4 (28,6)	
Triplo Negativo	12 (26,1)	6 (18,8)	6 (42,9)	
Triplo Positivo	6 (13)	5 (15,6)	1 (7,1)	

Legenda: n – frequência absoluta. % – frequência relativa percentual. IIQ – Intervalo Interquartil. F – Teste Exato de Fisher. Q – Teste Qui-quadrado de Pearson. M – Teste de Mann-Whitney.

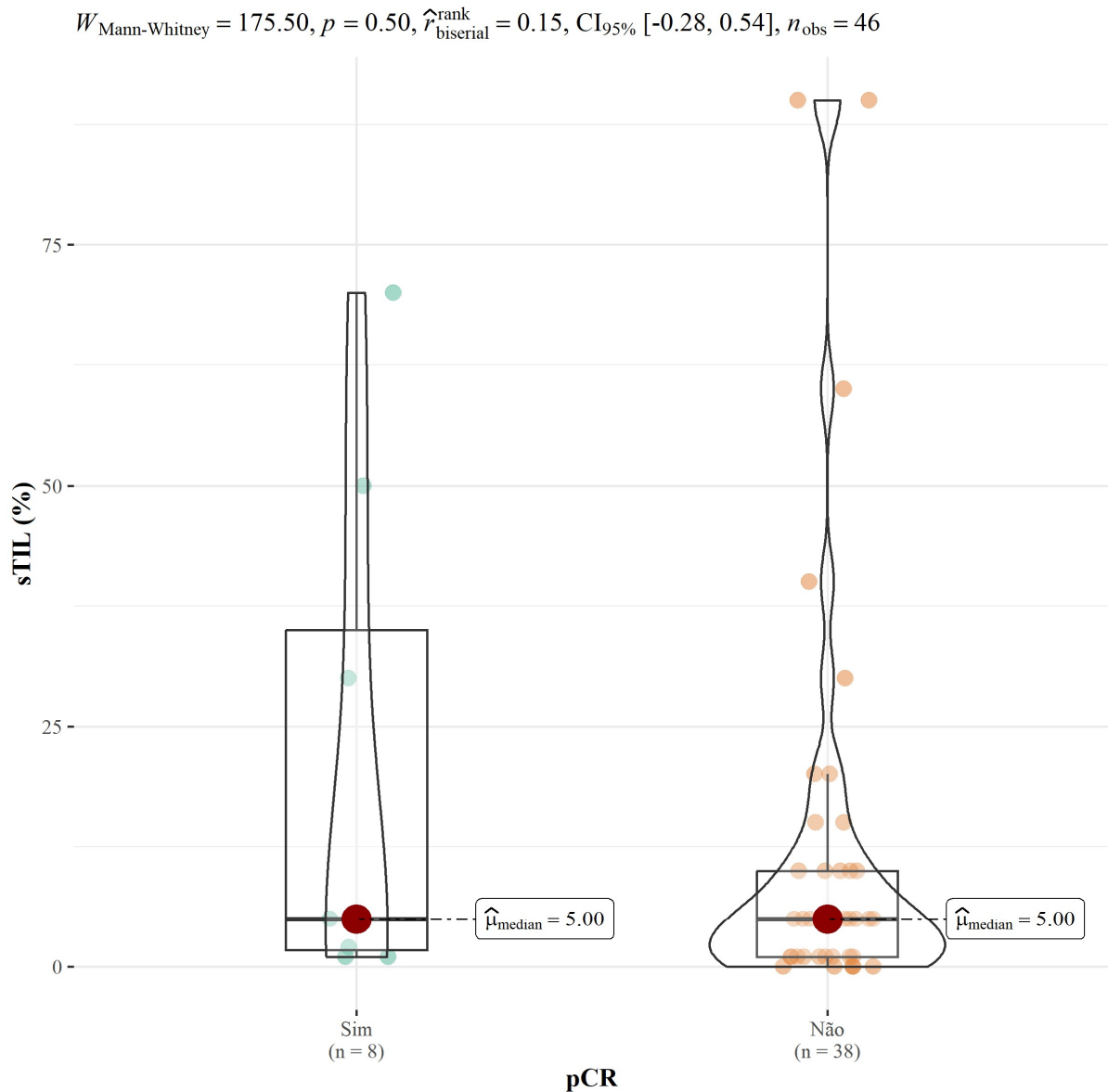
7.2. Avaliação de TILs por Subtipos Moleculares Específicos

A comparação dos TILs entre os diferentes subtipos moleculares é apresentada na figura 3. A análise estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis revelou um valor-p de 0,1, indicando que não há diferenças significativas entre os subtipos. Os avaliadores obtiveram a concordância de 0,985 na distribuição dos TILs por porcentagem (IC: 0,973- 0,992). O ponto de corte utilizado nesse estudo, que maximizou estatística do teste long-rank foi de 5%.

Figura 3 - Quantidade de TILs de acordo com os diversos subtipos moleculares

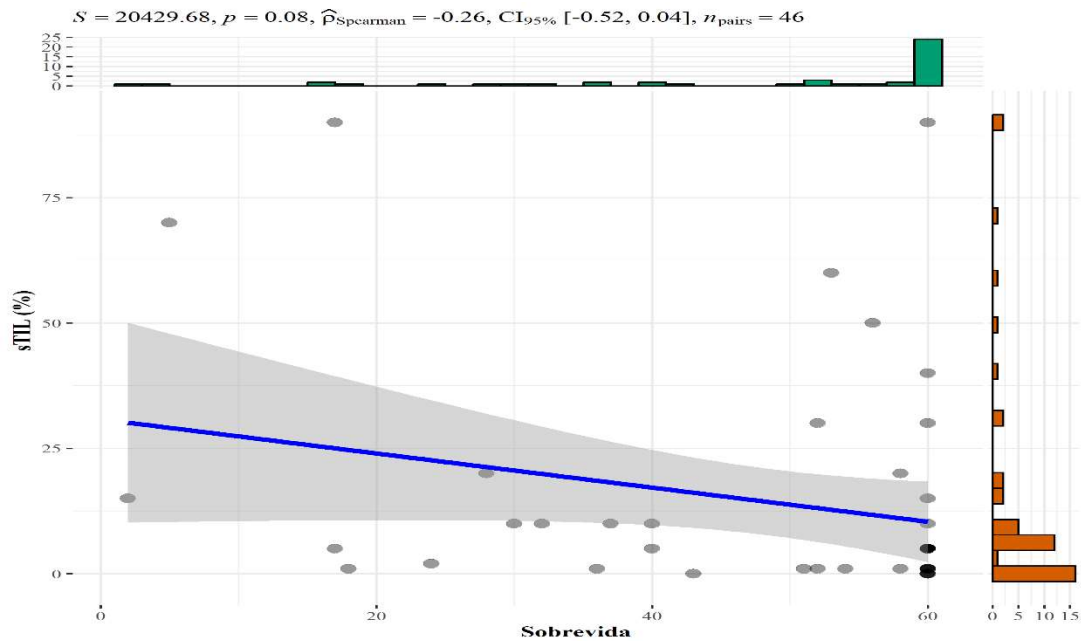
7.3 Relação entre TILs e pCR

De acordo com a figura 4, e utilizando o teste de Mann-Whitney para análise estatística, foi revelado um valor-p de 0,50, indicando que não há diferença significativa entre os pacientes com e sem resposta patológica completa em comparação com os TILs. Assim, observou-se que as medianas de ambos os grupos são iguais a 5%, evidenciando que não há uma diferença entre esses dois.

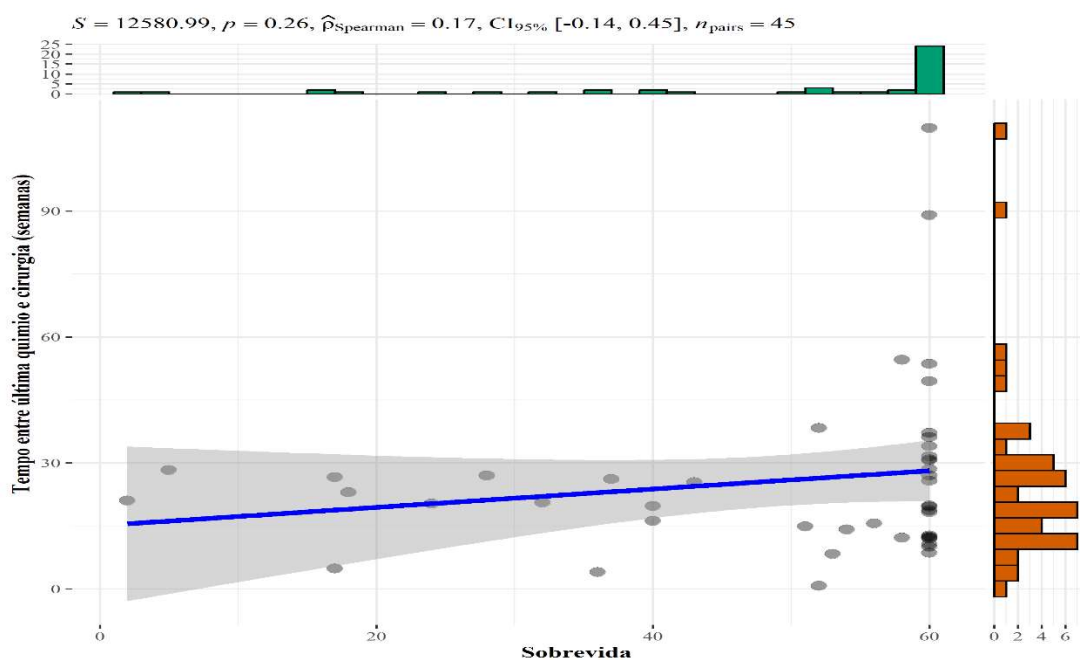
Figura 4 - Relação entre TILs e pCR.

7.4 Associação entre TILs e Sobrevida Global

A figura 5 exibe o gráfico de dispersão que relaciona a sobrevida global com o TILs (%). Após a análise estatística, constatamos que não há uma relação significativa entre essas variáveis. A correlação de Spearman calculada foi de -0,26, com um valor-p de 0,08, indicando uma ausência de associação entre a sobrevida global e o TILs (%).

Figura 5 - Gráfico de dispersão, correlacionando TILs e SV global

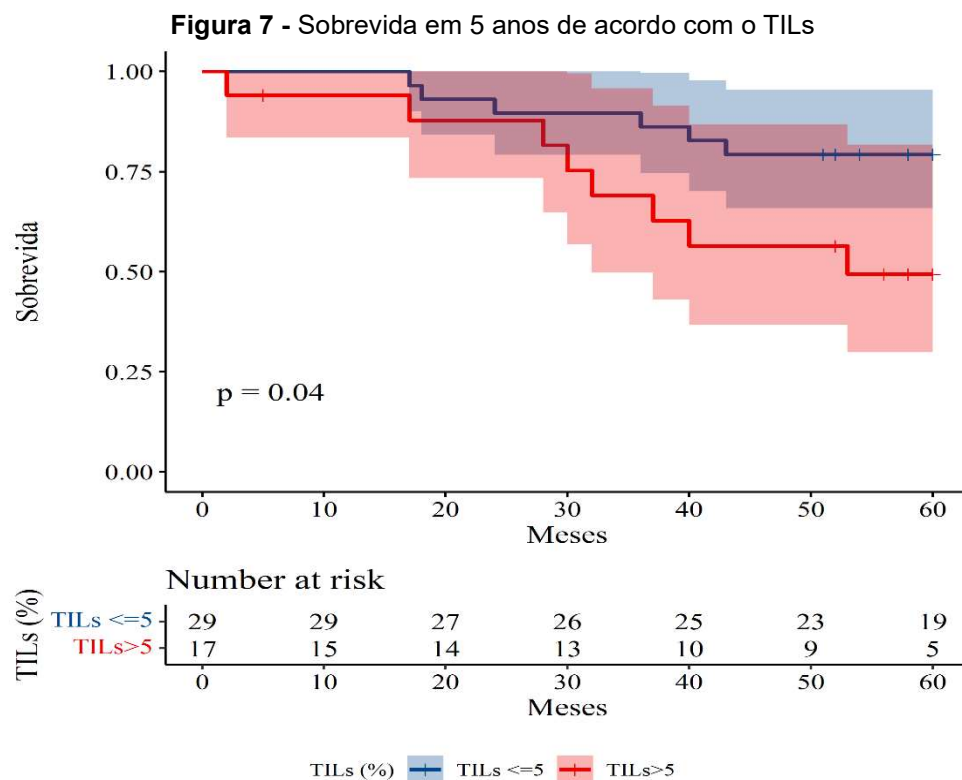
A figura 6 exibe o gráfico de dispersão que relaciona a sobrevida global com o tempo entre última quimio e cirurgia. Após a análise estatística, constatou-se que não há uma correlação significativa entre essas variáveis. A correlação de Spearman calculada foi de 0,17, com um valor-p de 0,26, indicando uma ausência de associação entre a sobrevida global e o tempo entre última quimio e cirurgia.

Figura 6 - Gráfico de dispersão, correlacionando sobrevida global com o tempo entre última quimio e cirurgia

7.5 Associação entre TILs e Sobrevida em 5 anos

A curva de sobrevida em 5 anos, estimada pelo estimador de Kaplan-Meier, comparando pacientes com níveis de TILs inferiores e superiores a 5% foi apresentada na figura 6. Observa-se que os pacientes com TILs superior a 5% apresentam uma estabilização na sobrevida somente após 53 meses, com uma taxa de sobrevida de 49,4%.

Por outro lado, os pacientes com TILs inferior a 5% alcançam uma estabilização na sobrevida em 43 meses, com uma taxa de sobrevida de 79,3%. Ao analisar o número de pessoas-ano global, observamos um total de 229,17 pessoas-ano, sendo 72,49 pessoas-ano para pacientes com TILs superior a 5% e 156,68 pessoas-ano para pacientes com TILs inferior a 5%. Para avaliar a diferença entre as curvas de sobrevida, foi aplicado o teste de Log-Rank, e foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre elas, com um valor-p de 0,04. Isso indica que, com base na análise estatística realizada, há evidências suficientes para afirmar que existe uma diferença significativa na sobrevida entre os dois grupos com base no critério de TILs.

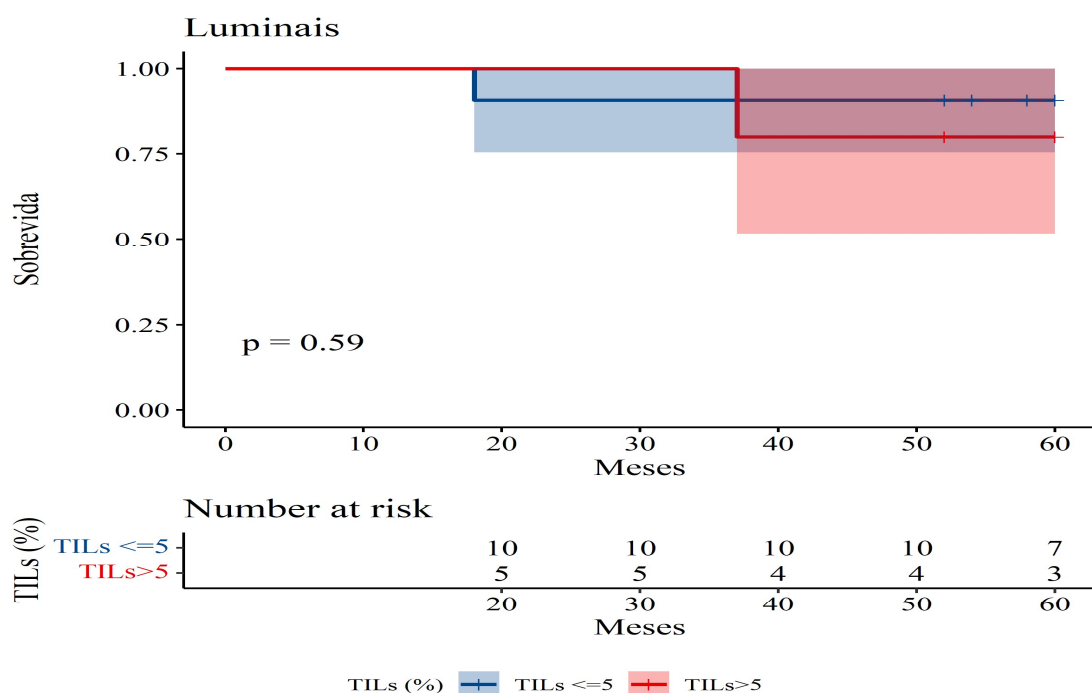


a) Por subtipo molecular

Quando avaliada a curva de sobrevida em 5 anos, apresentado na figura 7 e estimada pelo Método de Kaplan-Meier, comparando pacientes com níveis de TILs inferior e superior a 5% nos pacientes Luminais e Triplo Positivos (ou luminais híbridos), aqui denominados apenas de luminais, observou-se que os pacientes com TILs inferior a 5% apresentam uma estabilização na sobrevida somente após 18 meses, com uma taxa de sobrevida de 90,9%. Por outro lado, os pacientes com TILs superior a 5% alcançam uma estabilização na sobrevida em 37 meses, com uma taxa de sobrevida de 80%.

Ao analisar o número de pessoas-ano global, foi visto um total de 96,77 pessoas-ano, sendo 31,70 pessoas-ano para pacientes com TILs superior a 5% e 65,07 pessoas-ano para pacientes com TILs inferior a 5%. Para avaliar a diferença entre as curvas de sobrevida, foi aplicado o teste de Log-Rank, e não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre elas, com um valor-p de 0,59. Isso indica que, com base na análise estatística realizada, não há evidências suficientes para afirmar que existe uma diferença significativa na sobrevida entre os dois grupos com base no critério de TILs entre pacientes luminais.

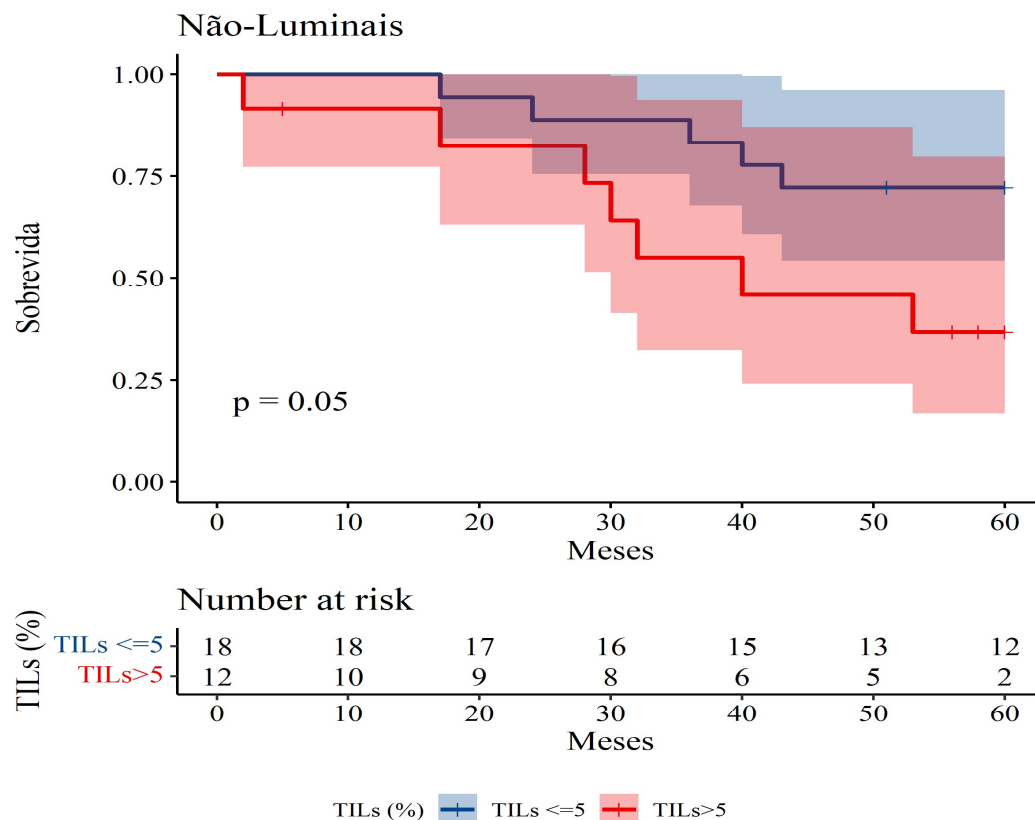
Figura 8 - Sobrevida em 5 anos de acordo com o TILs em pacientes luminais (puros e híbridos).



A comparação da curva de sobrevida em 5 anos estimada pelo Kaplan-Meier, nos pacientes Her2 e Triplo Negativos (denominados de Não-Luminais) é apresentada na figura 6 e compara pacientes com níveis de TILs inferiores e superiores a 5%. Observa-se que os pacientes com TILs superior a 5% apresentam uma estabilização na sobrevida somente após 53 meses, com uma taxa de sobrevida de 36,7%.

Por outro lado, os pacientes com TILs inferior a 5% alcançam uma estabilização na sobrevida em 43 meses, com uma taxa de sobrevida de 72,2%. Ao analisar o número de pessoas-ano global, observamos um total de 132,41 pessoas-ano, sendo 40,80 pessoas-ano para pacientes com TILs superior a 5% e 91,61 pessoas-ano para pacientes com TILs inferior a 5%. Para avaliar a diferença entre as curvas de sobrevida, foi aplicado o teste de Log-Rank, e foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre elas, com um valor-p de 0,05. Isso indica que, com base na análise estatística realizada, há evidências suficientes para afirmar que existe uma diferença significativa na sobrevida entre os dois grupos com base no critério de TILs entre pacientes não-luminais.

Figura 9 - Sobrevida em 5 anos de acordo com o TILs em pacientes não luminais (Her 2 e TN).



7.6 Análise dos TILs Ajustada às Outras Variáveis de Desfecho

A tabela 2 apresenta as razões de risco (Hazard Ratio) de TILs maior do que 5 contra menor ou igual a 5 para sobrevida das pacientes. Quanto ao pressuposto de riscos proporcionais, os modelos apresentaram valores-p acima de 0,05 indicando que este não foi violado. Pode-se observar que de maneira bruta, uma paciente com TILs maior do que 5 tem 2,89 (IC95%: 1,00-8,34; $p=0,05$) vezes mais risco de óbito ao longo dos 5 anos observados. Contudo, quando se considera os controles subtipo molecular, grau nuclear pré-tratamento neoadjuvante, grau nuclear pós-tratamento neoadjuvante e receptor de progesterona esse risco se eleva para 4,22 (IC95%: 1,05-17,03; $p=0,043$) vezes mais risco de óbito ao longo dos 5 anos observados.

Tabela 2 - Análise de sobrevida ajustada para variáveis

	HR (IC95%)	valor-p	Schoenfeld valor-p
Bruto (TILs >5)	2,89 [1,00-8,34]	0,050	0,790
Ajustado para subtipo molecular	4,06 [1,18-13,88]	0,026	0,700
Ajustado para subtipo molecular e Grau nuclear pré-tratamento neoadjuvante	3,25 [0,86-12,28]	0,082	0,350
Ajustado para subtipo molecular, Grau nuclear pré-tratamento neoadjuvante e Grau nuclear pós-tratamento neoadjuvante	3,58 [0,88-14,59]	0,075	0,064
Ajustado para subtipo molecular, Grau nuclear pré-tratamento neoadjuvante, Grau nuclear pós-tratamento neoadjuvante e Receptor de progesterona	4,22 [1,05-17,03]	0,043	0,111

Fonte:

Legenda: HR – Hazard Ratio. IC95% – Intervalo com 95% de confiança. TILs – linfócitos intratumorais infiltrantes.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo traz uma avaliação da quantidade de linfócitos infiltrantes no estroma do microambiente tumoral de pacientes com câncer de mama, e sua relação com a resposta ao tratamento neoadjuvante, avaliada pela presença ou ausência de lesão residual no leito cirúrgico (efeito preditivo), bem como com a sobrevida global e específica por câncer de mama em 5 anos (prognóstico). Foi feita também uma análise da influência de outros fatores anatomopatológicos e imunohistoquímicos nesses desfechos.

No que diz respeito aos parâmetros anatomopatológicos, foi observada diferença entre os pacientes que se mantiveram vivos até o final do estudo e os que evoluíram para óbito. Maior grau nuclear, menor expressão de receptores hormonais (tanto RE quanto RP) e um maior índice de proliferação celular (Ki67) se apresentaram em maior número neste grupo de pacientes, de forma estatisticamente significativa. A associação desses parâmetros com pior prognóstico já foi extensivamente estudada na literatura e eles foram utilizados em vários modelos de risco desenvolvidos e validados para pacientes submetidos a QNA (HOU, 2021).

A maior parte dos estudos não fez a análise de concordância entre os patologistas e não foi estipulado um valor mínimo aceito para a discordância entre eles, mas sim vinculada essa associação à validade clínica da metodologia aplicada (SALGADO *et al.*, 2015). Os avaliadores incluídos em nosso trabalho apresentam vasta experiência em patologia mamária e obtiveram um alto índice de concordância entre si, tendo atingido boa reprodutibilidade de acordo com a descrição publicada na literatura (LOI, 2021). A Sociedade Brasileira de Patologia segue as recomendações da OMS, de modo que a avaliação de TILs passará brevemente a ser incorporada na prática clínica diária (EL BAIRI, 2021).

Não houve diferença significativa em relação à expressão de TILs nos diversos subtipos moleculares. A mediana calculada foi de 5, e mais da metade (63%) da população apresentava TILs < 5%. Isso pode ser explicado pela maior parte das nossas pacientes apresentarem tumores luminais, que é considerado na literatura o subtipo que apresenta menor incidência de TILs, variando nos diversos estudos entre 3-12% (STANTON, 2016).

Apesar de TILs ser considerado um forte preditivo de pCR, independentemente do regime de droga aplicado (DENKERT, 2010), não foi encontrada associação entre

pCR e TILs na amostra analisada. Numa coorte envolvendo os diversos subtipos moleculares, o aumento do número de TILs foi associado ao aumento de pCR em todos os grupos (DENKERT, 2018). Entretanto, nesse estudo, os autores consideraram como parâmetro de TILs baixo quando menor que 10%, e alto, quando acima de 60%. Tendo em vista que a avaliação de TILs é um parâmetro contínuo, não há, de forma consensual, um limite para um ponto de corte pré-definido, de forma que o número de TILs pode atingir qualquer proporção entre 0 e 100% (SALGADO, 2015).

Na nossa avaliação, o ponto de corte foi calculado em 5%, mas tumores têm sido considerados como ricos em linfócitos quando há > 50% de infiltração estromal (SALGADO, 2015) e isso pode justificar os resultados dessa pesquisa. A importância de se avaliar o efeito da resposta tumoral ao tratamento neoadjuvante, principalmente identificando os fatores que levaram a uma maior taxa de pCR, está no fato que este parâmetro pode ser considerado um fator preditivo isolado de recorrência e sobrevida (CORTAZAR, 2014).

Os pacientes foram incluídos no estudo entre 2011 e 2017, período em que não se disponibilizava no Brasil do arsenal terapêutico de precisão que se dispõe na atualidade, incluindo terapias anti Her (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Embora não se tenham sido feitas subanálises do esquema terapêutico utilizados nesse estudo, sabe-se que a introdução da terapia alvo pode gerar diferentes desfechos, independentemente da quantidade de TILs ou de qualquer outra variável (GIANNI, 2012).

Foi demonstrado que um tempo de até 8 semanas entre a QNA e a realização da cirurgia não impacta em desfecho de sobrevivência de pacientes com câncer de mama, mas que estes resultados podem estar comprometidos após esse tempo (SANFORD, 2016). Apesar de ter sido observado um atraso maior que 6 semanas na maior parte dos casos, não foi comprovada associação entre sobrevida e tempo entre a última quimioterapia e a data da cirurgia neste estudo.

Quando se avaliou a associação entre a quantidade de TILs nas amostras de biópsia e desfechos de sobrevida global, não foi demonstrada relação, porém, na análise de sobrevida em 5 anos, os pacientes que apresentaram TILs abaixo de 5% evoluíram melhor em todos os subtipos moleculares.

Evidências científicas relacionadas aos tumores triplos negativos são vistas em grandes estudos retrospectivos envolvendo pacientes submetidos a QNA. Esses estudos, além de terem comprovado a associação dos TILs com resposta patológica

completa, com pCR atingido até 59,9% dos casos de TILs > 50%, evidenciaram aumento de sobrevida livre de doença e global de acordo com a quantidade desses linfócitos (DENKERT, 2015). Na doença inicial, dois grandes estudos apresentaram aumento de sobrevida livre de doença e global de acordo com o aumento de TILs. Esses estudos validaram clinicamente esses marcadores clínicos como prognósticos e preditivos no cenário da doença triplo negativa (PARK, 2019; LOI, 2019).

No que diz respeito aos tumores Her2 superexpressos, ao passo que foi comprovada associação de resposta completa (pCR) ao tratamento quimioterápico em tumores ricos em linfócitos (LOI, 2013), os resultados dos TILs em relação à terapia anti Her 2 (trastuzumabe) são conflitantes na literatura. Enquanto um estudo não conseguiu comprovar o aumento de sobrevida livre de doença nos pacientes que receberam tratamento combinado QT mais anti Her 2 (PEREZ, 2015), no estudo ShortHer, os TILs foram considerados uma variável independente de fator prognóstico.

O estudo ShortHer foi designado para avaliar a não inferioridade do tratamento do Trastuzumabe por 9 semanas *versus* o tratamento padrão de um ano, e, apesar de ter sido negativo, considerou o TILs como uma ferramenta auxiliar na escolha de pacientes que poderiam se beneficiar do descalonamento da terapia anti Her2 (DIECI, 2019).

O presente estudo encontrou um resultado diferente do que foi visto na literatura, que aponta uma maior sobrevida associada ao aumento de TILs nos subtipos explicitados acima (Her 2 e triplo negativo) (LOI, 2013). Considerando que o estudo foi feito em um hospital universitário, que o câncer de mama se apresenta num estágio mais avançado em pacientes diagnosticadas no serviço público de saúde, e que há uma pior sobrevida em pacientes tratadas no Brasil, quando se compara a países ricos (ROSA, 2020), apesar desse fator não ter sido avaliado, acredita-se que variáveis sociodemográficas (como atraso no início e descontinuidade no tratamento) podem ter influenciado no resultado final.

Além disso, o ponto de corte utilizado no estudo, como já mencionado anteriormente, foi baixo (5%), a mediana de TILs da amostra também foi baixa, visto que a maioria dos pacientes tinham tumores luminais, e isso também pode ter influenciado no resultado final (apesar de não ter sido identificado variação de TILs entre os subtipos moleculares). São necessários estudos prospectivos que validem, do ponto de vista clínico, o ponto de corte de TILs para que ele se torne uma

ferramenta de auxílio na identificação de pacientes de alto e baixo risco, e assim se possa escalonar ou reduzir toxicidade do tratamento (JONG, 2022)

Apesar de não se ter sido encontrada significância estatística no subgrupo de pacientes luminais, os achados confirmam o que se encontra na literatura. O Grupo de Câncer de mama alemão mostrou, em sua análise envolvendo todos os subtipos moleculares, uma associação inversa entre a quantidade de TILs e sobrevida no subtipo luminal (DENKERT, 2018). Esses resultados foram corroborados por um metanálise publicada em seguida (ZHAO-HUA, 2020).

Os tumores que expressam receptores hormonais são menos imunogênicos e, portanto, apresentam menor quantidade de linfócitos, naturalmente. A utilidade dos TILs nesse grupo de pacientes não está bem esclarecida, bem como não está clara uma explicação biológica dessa diferença de comportamento prognóstico dos TILs entre os diversos subtipos no câncer de mama, de forma que não se pode excluir que esses resultados encontrados sejam devido ao acaso (EL BAIRI, 2021; SOBRAL-LEITE, 2019).

Foi feita também uma análise ajustada avaliando os outros critérios anatomopatológicos previamente conhecidos como fatores relacionados a melhor ou pior prognóstico. Essa avaliação mostrou que a presença de TILs se soma a essas variáveis, influenciando resultados de sobrevida. Quando observados, em conjunto com a quantidade de TILs, o grau nuclear pré e pós tratamento, o subtipo molecular e o receptor específico de progesterona, a razão de risco dessa análise de sobrevida quase que dobra, evidenciando como a neoplasia de mama pode sofrer influência de forma isolada ou em associação desses fatores, modificando, de forma heterogênea, o seu prognóstico.

Dados robustos de literatura apontam para o reconhecimento dessas variáveis e sua ação conjunta no prognóstico final (COLZANI, 2011). Em um estudo realizado com mulheres jovens com câncer de mama triplo negativos, foi visto que pacientes com tumores menores que 1 cm, considerados como de baixo risco, quando associados a TILs baixo (<30%) podem ter seu risco modificado, inclusive podendo passar ser consideradas ao tratamento neoadjuvante (DE JONG, 2022). São necessárias melhores evidências para entender essas interações entre o sistema imune e outros critérios prognósticos.

Um estudo americano, observou que a frequência de subtipos pode variar entre raças, de forma que afro-americanas apresentam menos tumores luminais que as

brancas (O' BRIEN, 2010). Considerando a heterogeneidade de resposta imunológica apresentada pelos diferentes subtipos, é interessante avaliar populações diferentes, para que se possa entender o comportamento de câncer de mama nas diversas regiões. Nesse estudo, o subtipo luminal, seja ele puro ou híbrido/ triplo positivo foi o mais comumente visto, corroborando com o que se vê na literatura (PARISE *et al.*, 2009).

O subgrupo de pacientes com tumores triplo negativos teve uma baixa representação na amostra analisada, mas o achado de que a presença de TILs pode estar associada a desfechos de sobrevida nesses subtipos ajuda a identificar subgrupos de pacientes de pior prognóstico desde o momento do diagnóstico, escalonando-os e estratificando-os para tratamentos mais individualizados. Estudos com maiores amostras, e que tragam uma maior robustez estatística em populações brasileiras são necessários, a fim de determinar pacientes que podem ser candidatos a terapias alvo específicas, especialmente nos tumores triplo negativos, que vem sendo objeto de grandes estudos com imunoterapia devido à ausência de receptores (RE, RP e Her2) (SCHMID, 2020).

Considerando que, quanto mais rico em linfócitos, mais imunogênico e mais imunovulnerável é o tumor, considerando o progresso na otimização de estratégias terapêuticas na área da imunoterapia (ROSENBERG, 2001), e que o acesso a marcadores genômicos e por imuno-histoquímica é um método caro, parâmetro extremamente relevante num país como o Brasil, a avaliação de TILs, através de hematoxilina-eosina, método bastante acessível, é uma importante ferramenta na avaliação dos pacientes para tratamento.

O estudo traz uma avaliação de características clínicas e anátomo- patológicas de tumores de mama em uma população de mulheres brasileiras acompanhadas num serviço do SUS do estado de Sergipe, comparando e associando essas características com a quantidade de TILs nas amostras de biópsia dessas pacientes e relacionando com resposta patológica completa, sobrevida geral e sobrevida em 5 anos.

A maior limitação desse estudo é a sua natureza retrospectiva, de forma que parte das informações partiram de revisões de prontuários de laudos, algumas vezes incompletas, podendo assim gerar vieses de confundimento. O estudo foi feito em um hospital público de um país em desenvolvimento, com características sociais e demográficas (dificuldade de acesso a diagnóstico e tratamento, atraso nos

procedimentos), que podem alterar o prognóstico natural do câncer de mama e influenciar nos resultados.

Todos os blocos de peças cirúrgicas foram avaliados dentro do laboratório de patologia do HU-UFS, aos quais pertencia. Entretanto, foi necessário resgatar as lâminas de biópsia das pacientes, que estavam localizadas nos respectivos laboratórios de análise, dispersos pela cidade, onde o material foi encaminhado na ocasião do primeiro diagnóstico. Além da dificuldade geográfica e logística em acessar esse material, não houve um modelo padronizado de processamento e condicionamento, e isso acarretou perda de qualidade de algumas lâminas e também perda de uma parte do material, o que resultou numa diminuição do número de casos intencionados no início dessa pesquisa.

Os pontos fortes desta pesquisa se encontram na avaliação detalhada de TILs em amostras de biópsia de agulha grossa, que não tinham sido previamente analisadas em relação a esse parâmetro, com um alto índice de concordância entre os patologistas, bem como na avaliação prognóstica estatística da associação da quantidade de TILs com outros parâmetros clínicos, e a sua influência na sobrevida de uma população do estado de Sergipe, incluindo a estratificação de resultados entre os diversos subtipos moleculares, sem técnicas robustas e dispendiosas, mas com material comumente utilizado em laboratórios de patologia.

Desta forma, foi possível analisar o impacto (tanto de forma isolada, quanto em conjunto com outras variáveis) de um marcador que vem sendo considerado bastante relevante na literatura mundial. A avaliação foi feita em um número de casos avançados de câncer de mama de um hospital universitário de um estado do nordeste do Brasil, cujas pacientes apresentam uma maior dificuldade de acesso ao diagnóstico precoce e de sequência adequada de tratamento, condições inerentes ao quadro sócio demográfico do país, e diferente das populações anteriormente estudadas nos outros ensaios clínicos que utilizaram esse mesmo parâmetro de desfecho.

9 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a quantidade de TILs tem associação com sobrevida no câncer de mama, especialmente em subtipos TN e Her2 e pode ser um fator determinante no prognóstico e sobrevida desse subgrupo de pacientes.

A avaliação desse tipo de marcador deve ser mais explorada em estudos futuros, especialmente na população do Brasil.

Ainda são necessários estudos com maior tamanho amostral e prospectivos para esclarecer a utilidade desses marcadores nos diferentes subtipos moleculares e obtermos mais evidências para desenvolvimento de drogas alvo-específicas.

REFERÊNCIAS

ASAOKA, M. *et al.* Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Past, Present, and Future. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 14, 16 jan. 2020.

AZIMI, F. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, p. 2678–83, 2012.

BARZAMAN, K. *et al.* Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, jul., 2020.

BIANCHINI, G. *et al.* Treatment Landscape of Triple-Negative Breast Cancer—Expanded Options, Evolving Needs. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v.19, p. 91–113, 2021.

BOSSUYT, V. *et al.* Recommendations for standardized pathological characterization of residual disease for neoadjuvant clinical trials of breast cancer by the BIG-NABCG collaboration. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, jul. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Portaria n 18 de 25 de julho de 2021**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRITO, É. **Resposta patológica do câncer de mama de pacientes tratadas por quimioterapia neoadjuvante e correlação com a sobrevida**. 2022. 107 f. Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2022.

BURSTEIN, H. J. *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. **Annals of Oncology**, v. 30, n.10, p.1541-1557, 2019.

CARDOSO, F, K. *et al.* Early breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 8, p. 1194-1220, 2019.

CONFORTI, F. *et al.* Evaluation of of pathological complete response as surrogate endpoint in neoadjuvant randomised clinical trials of early stage breast cancer: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, 375, 2021.

COLLEONI, M. *et al.* Early Start of Adjuvant Chemotherapy May Improve Treatment Outcome for Premenopausal Breast Cancer Patients With Tumors not Expressing Estrogen Receptors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 3, 1 fev. 2000.

COLZANI, et al. Prognosis of patients with breast cancer: causes of death and effects of time since diagnosis, age, and tumor characteristics. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29. p.4014-21. 2011.

CORTAZAR, P. *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **The Lancet**, v. 384, n. 9938, jul. 2014.

COSTA, L. D. L *et al.* Mortalidade por câncer de mama e condições de desenvolvimento humano no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 65, n. 1, 2019.

DANCEY CP, R. J. **Statistics without math for psychology**. England: Pearson/Prentice Hall, Harlow, 2004.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, 1 abr., 2004.

DA SILVA, J *et al.* Prognostic Influence of Residual Tumor-Infiltrating Lymphocyte Subtype After Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v.11, nov. 2021.

DE JONG, V, *et al.* Prognostic value of stromal tumor-infiltrating lymphocytes in young, node-negative, triple-negative breast cancer patients who did not receive (neo) adjuvant systemic therapy. **Journal of clinical oncology**, v.40, n. 21: 2361, 2022.

DE LENA, M. *et al.* Multimodal treatment for locally advanced breast cancer. Result of chemotherapy-radiotherapy versus chemotherapy-surgery. **Cancer clinical trials**, v. 4, n. 3, 1981.

DENKERT, Carsten *et al.* Tumor-Associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 1, 1 jan. 2010.

_____. 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 9, 20, mar., 2015.

_____. Tumour-infiltrating Lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. **The lancet oncology**, v.19, n.1, p. 40-50, 2018.

DIECI, M. *et al.* Association of tumor-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2+ breast cancer. **Annals of Oncology**, v.30, n. 3, p. 418-423, 2019.

DUSHYANTHEN, Sathana *et al.* Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, dez., 2015.

EL BAIRI, K. *et al.* The Tale of TILs in Breast Cancer: A Report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. **Breast Cancer**, v. 7, n. 2, p.150-8, 2021.

EMENS, L. *et al.* Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 12, n. 12, dez., 2012.

FISHER, B. *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 7, jul. 1997.

GIANNI, L. *et al.* Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. **The lancet oncology**, v 13, n.1, p.25-32, 2012.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v.24, n. 9, p. 2206-2223, 2013.

HENDRY, S. *et al.* Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. **Advances in Anatomic Pathology**. v.24, n.5, set, 2017.

HEYS, S. D. Evolution of breast cancer management: focus on neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer**, v. 8, n. 4, out., 2001.

HONG, J. *et al.* Association of tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy with pathological complete response and prognosis in patients with breast cancer. **Cancer Medicine**, v. 10, n. 22, p. 7921-7933, 2021.

HOU N, W.U. J. *et al.* Development, verification, and comparison of a risk stratification model integrating residual cancer burden to predict individual prognosis in early-stage breast cancer treated with neoadjuvant therapy. **ESMO Open**. v. 6, n. 5, 100269, 2021.

HU, Z., F. C. *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 96, abr., 2006.

IGNATIADIS, Michail *et al.* Gene Modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 16, 1 jun. 2012.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Atlas da mortalidade**. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>>. Acesso em: 12 out. 2023.

LAKHANI, S. R. *et al.* **WHO Classification of Tumors of the Breast**. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2012.

LOI, S. *et al.* Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 7, 1 mar. 2013.

LOI, S. *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis: A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, p. 559–569, 2019.

LOI, S *et al.* The Journey of Tumor-Infiltrating Lymphocytes as a Biomarker in Breast Cancer: Clinical Utility in an Era of Checkpoint Inhibition. **Annals of Oncology**, v. 32, p. 1236–1244, 2021.

MAMOUNAS, E. P. NSABP Protocol B-27. Preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide followed by preoperative or postoperative docetaxel. **Oncology** (Williston Park). v.11, n. 6, (Suppl 6), p. 37-40, 1997.

NAHLEH, Z. *et al.* Residual Cancer Burden in Locally Advanced Breast Cancer: A Superior Tool. **Current Oncology**, v.15, n. 6, dez., 2008.

MCALLISTER, S. S; WEINBERG, R. A. Tumor-host interactions: a far-reaching relationship. **Journal of Clinical Oncology**, v.10, n. 28, p. 4022-8, 2010.

O'BRIEN KM, C. S. R. *et al.* Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Clinical Cancer Research.**, v. 16, n. 2, 6100, 2010.

OGINO, S, *et al.* Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. **Clinical Cancer Research.**, v.15, n. 6, p. 6412–20, 2009.

PARISE CA, *et al.* Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. **Breast Journal**, v.15, n. 7, p.593-61, 2009.

PARK, J. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. **Annals of Oncology**, v.30, p.1941–1949, 2019.

PEREZ, E. *et al.* Abstract S1-06: Stromal tumor-infiltrating lymphocytes (S-TILs): In the alliance N9831 trial S-TILs are associated with chemotherapy benefit but not associated with trastuzumab benefit. **Cancer Research**, v. 75, n. 6, (9 Supplement), 2015.

ROSA, D. *et al.* The impact of sociodemographic factors and health insurance coverage in the diagnosis and clinicopathological characteristics of breast cancer in Brazil: AMAZONA III study (GBECAM 0115). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 183, n. 3, 2020.

ROSENBERG, S *et al.* Progress in human tumour immunology and immunotherapy. **Nature**, v. 4, n.11, p. 380-384, 2001.

SALGADO, R. *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 2, 2015.

SANFORD, R. A. *et al.* Impact of time from completion of neoadjuvant chemotherapy to surgery on survival outcomes in breast cancer patients. **Annals of surgical oncology**. v.23, p 1515-152, 2016.

SANTOS, M.O. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, e-213700, 2023.

SOBRAL-LEITE, M. *et al.* Cancer-Immune Interactions in ER-Positive Breast Cancers: PI3K Pathway Alterations and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 2, n. 4, 2019;

SCHMID, P, *et al.* Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, p. 810-821, 2020.

STANTON SE, A. S; DISIS, M. L. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. **JAMA Oncology**, v. 2, n. 10, p. 1354-1360, 2016.

TAN, P. H *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the breast. **Histopathology**, v. 77, n. 2, p. 181-185, 2020.

THOMAS, N. E, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 4, p. 4252–9, 2013.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Guidance for Industry: **Pathological Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer—Use as an Endpoint to Support Accelerated**. Food and Drug Administration. Clinical/Medical, July, 2020.

VANNES, J. G. H. *et al.* Preoperative chemotherapy is safe in early breast cancer, even after 10 years of follow-up; clinical and translational results from the EORTC trial 10902. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 115, n. 1, maio, 2009.

VON MINCKWITZ, G. *et al.* Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPARUO study of the German Breast Group. **Journal of Clinical Oncology**. v. 23, n. 12, p. 2676-85, 2005.

WHO. **International agency for research on cancer - Cancer today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 9 out. 2023

YEO, S. K; GUAN, J-L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? **Trends in Cancer**, v. 3, n. 11, nov. 2017.

ZHAO-HUA, Gao *et al.* Predictive and prognostic role of tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer patients with different molecular subtypes: a meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 20, 1150, 2020

ANEXOS

ANEXO 1- Artigo original (abstract), submetido em 19.01.24 na *Scientific Reports*

Tumor-Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in a Brazilian Population with Neoadjuvant Chemotherapy-Treated Breast Cancer: A survival study.

Renata Montarroyos Leite^{1,2}✉, Hugo Leite de Farias Brito³, Érika de Abreu Costa Brito^{1,3}, Ikaro Daniel de Carvalho Barreto⁴& Carlos Anselmo Lima^{1,2,5,6}.

1 Health Sciences Graduate Program/Federal University of Sergipe, Aracaju, Brazil.

2 University Hospital/EBSERH/Federal University of Sergipe, Aracaju, SE 49060-108, Brazil.

3. Department of Medicine/Federal University of Sergipe, Aracaju, Brazil.

4. PhD, Brazilian Research Center for Evaluation and Selection of Event Promotion-CEBRASPE, Brasília DF

5 Aracaju Cancer Registry, Aracaju, Brazil.

6 Call MS/CNPq/FAPITEC/SE/SES - No 06/2018, Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado

✉ nataleite@hotmail.com

Breast cancer is recognized as a heterogeneous disease, displaying distinct responses to treatments in different populations. In recent decades, the role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) has been acknowledged as prognostic and predictive of response to neoadjuvant chemotherapy. Our study aimed to assess the association between 5-year overall survival and the percentage of TILs in a state of Brazil. It is a uni and multivariate analyses using a retrospective cohort of breast carcinoma patients who underwent neoadjuvant chemotherapy followed by surgical treatment. Core biopsy slides were reanalyzed to evaluate the quantity of TILs. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method, and adjusted through Cox regression modeling. There was no significant difference between patients exhibiting complete pathological response and those who did not, concerning the quantity of TILs and its influence on overall survival in this study. However, a distinction in 5-year survival was observed, with 79.3% in patients with TILs below 5% compared to 49.9% in those with TILs above 5%. This trend persisted across all subtypes, but reached statistical significance in Her 2-positive and triple-negative subtypes, indicating that TILs might serve as a determinant factor in the prognosis and survival of these patient subgroups.

ANEXO 2- Comprovante de submissão do artigo**Your submission****Title**

Tumor-Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in a Brazilian Population with Neoadjuvant Chemotherapy-Treated Breast Cancer: A survival study.

Type

Article

Journal

Scientific Reports

Submission ID

a348faa6-6811-4a55-bcdc-8c85c21be2ec

Submissão em 19/01/2024 no *Scientific Reports Scientific Reports*, integrante do *Nature Publishing Group (Qualis A1)*