



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Daniella Serafin Couto Vieira

**IMPORTÂNCIA DOS BIOMARCADORES RE, RP, HER2, KI67, CK19,  
CD4, CD8, CD45, CTLA-4, PD1 E PD-L1 PARA O DIAGNÓSTICO,  
PROGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASE EM  
PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA**

FLORIANÓPOLIS

2022



Daniella Serafin Couto Vieira

**IMPORTÂNCIA DOS BIOMARCADORES RE, RP, HER2, KI67, CK19,  
CD4, CD8, CD45, CTLA-4, PD1 E PD-L1 PARA O DIAGNÓSTICO,  
PROGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DO RISCO DE METÁSTASE EM  
PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título  
de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr.(a) Maria Cláudia Santos da Silva

FLORIANÓPOLIS

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Serafin Couto Vieira, Daniella

Importância dos biomarcadores RE, RP, HER2, KI67, CK19, CD4, CD8, CD45, CTLA-4, PD1 E PD-L1 para o diagnóstico, prognóstico e avaliação do risco de metástase em pacientes com carcinoma de mama / Daniella Serafin Couto Vieira ; orientador, Maria Cláudia Santos da Silva, 2022.

222 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Carcinoma de Mama. 3. Biomarcadores. 4. Citometria de Fluxo. 5. Imuno-histoquímica. I. Cláudia Santos da Silva, Maria . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Daniella Serafin Couto Vieira

Importância dos Biomarcadores RE, RP, HER2, KI67, CK19, CD4, CD8, CD45, CTLA-4, PD1 E PD-L1 para o Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação do Risco de Metástase em Pacientes com Carcinoma de Mama

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof (a) Gabriella Di Giunta Funchal, Dr(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof (a) Izabella Thais da Silva, Dr(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof (a) Elaine Sobral Costa, Dr(a)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmácia.



Documento assinado digitalmente  
Thais Cristine Marques Sincero  
Data: 17/05/2022 14:30:28-0300  
CPF: 024.292.249-09  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr(a) Thais Cristine Marques Sincero  
Coordenador(a) do Programa



Documento assinado digitalmente  
Maria Claudia Santos da Silva  
Data: 16/05/2022 14:45:45-0300  
CPF: 572.558.579-49  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr(a) Maria Cláudia Santos da Silva  
Orientador(a)

Florianópolis 2022.



## AGRADECIMENTOS

Entre todas as mulheres que eu preciso agradecer, a primeira é você Maria. A Maria que não desistiu, a que enfrentou, a que ensinou, a que foi presente, a que resgatou várias outras mulheres. Devo agradecer por tudo, por tantos ensinamentos, por cada palavra de apoio. – Não precisa agradecer. É minha função. (Disse-me tantas vezes) (Eu respondo) - Sim, eu sei que é a sua função professora. Mas você foi além. Você construiu um caminho da paz e bem. Em um caminho cheio de pedras você as posicionou e me fez seguir em frente. Muito obrigada Maria Claudia. Nunca esquecerei.

A todas as Marias, Orildes, Gladis, Meghes, Reginas, Vicentinas, Gerolivias, Deolindas, Mirians, e tantas outras mulheres com câncer de mama que por mim passaram ao longo de 25 anos de patologia e principalmente as que aceitaram participar do estudo. Eu agradeço e dedico os resultados a vocês. Honro sua força para lutar. Honro sua resiliência em aceitar as provações dos tratamentos. Honro suas perdas físicas de peso, de cabelos, das mamas ou da vida. Reverencio as suas histórias de sobrevivência. Que esse estudo possa ajudar a melhorar a vida e o destino de outras pessoas, homens e mulheres, e que com ele eu possa ensinar muitos discípulos na Patologia Mamária.

Agradeço a Deus e minha família. Tito, Gabriel e Maria (meus amores) obrigada por estarem comigo nessa jornada, não teria conseguido sem vocês. Nina você renunciou a quase tudo e veio cuidar da minha família, nunca esquecerei. Paizinho e mãezinha, sem palavras por tanto amor. Minhas irmãs, Giova, Sophi e Bella, amo mais que tudo. Meu irmão Tasca, cuidou tanto de mim, realizou meus sonhos (love). Menegon, Heitor e Helena, amo vocês. Irmãs de alma, Gabi e Ana que ficaram comigo desde o começo, me apoiando, amo-as. Sem esquecer do Doca e da Lena, vocês são minha família.

Amigos professores do Departamento de Patologia do UFSC e Fabio, obrigada por tudo, pelo apoio e atenção. Especialmente ao meu relator, professor Rogerio Gondak. A você meu amigo, Professor Rodrigo Otavio Alves de Lima (in memoriam) dedico o meu trabalho.

Servidores da Unidade de Anatomia Patológica: os médicos e amigos patologistas (Lee, Péricles, Leandro, Arthur, Priscila, Joao, Mel, Flavia, Gabi e Ana) e os servidores e amigos (Lica, Aline, Jô, Manu, Danuza, Renata, Angel, Selma, Magali, Rita, Lari, Jessica, Edi, Dudu) e todos os residentes que ao longo dos cinco anos passaram por vários momentos comigo (entendendo minha posição de aluna de pós). Muito obrigada amores.

Agradeço todos os servidores da Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do HU, (Sara, Vado, Luciano, Luciana e Cida) pelo apoio, palavras de carinho e incentivo, olhares carinhosos e sorrisos. Muito obrigada. Em especial ao Sandro Wopereis, por permitir o início de tudo. As meninas da citometria e a todos os estagiários, agradeço a paciência, os ensinamentos, de maneira especial a Helo, minha amadinha, companheira de muitos dias, muito obrigada amor. Todos da hematologia, em especial Gustavo, Bruno, Vera e a Angela, por me ajudarem tanto.

Às mulheres maravilhosas do US do 2 andar, Juliana, Erica, Patrícia e Mariza, tenho profunda gratidão a vocês.

Agradeço a equipe da radiologia do HU, em especial a Lisi pelo carinho e atenção.

Estimado Professor Getulio, sem palavras. O senhor é muito precioso. Cuide-se sempre. Muito obrigada por tudo.

Professor Alfeo, muito obrigada pelo apoio. Nunca esquecerei.

Amigos e pesquisadores do grupo LOEH vocês são sensacionais, obrigada em especial Bruna, Lisandra e Laura, por tanto e por estarem comigo desde o começo, me ajudando, ensinando e apoiando.

Aos meus queridos amigos do Porto e, IPATIMUP/ i3s, sem vocês, não teria tido essa história. Obrigada Professor Fernando Schmitt, Professor Sobrinho Simões, Professora Catarina Eloi e Dr Antonio Polonia.

Por fim agradeço aos programas de Pós-graduação da UFSC, por manterem a ciência acima de tudo, em especial ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.



## RESUMO

O carcinoma de mama (CDI) apresenta elevada incidência entre as mulheres no mundo, com um forte impacto financeiro sobre os sistemas de saúde pública. O diagnóstico é realizado por biópsias de nódulos suspeitos rastreados mamograficamente. No entanto, muitas mulheres não fazem parte do grupo idade para rastreio populacional, e, por isso, apresentam doenças avançadas ao diagnóstico, causando impacto na sobrevivência. A doença metastática é a principal causa de morte, e, uma das principais causas da metástase são células dormentes na circulação. Há indícios que essas células desenvolvam mecanismos para evitar a resposta imune do hospedeiro, por isso, estão associadas com imunofenótipos mais agressivos da doença. Além disso, subtipos de pior prognóstico também expressam algumas proteínas relacionadas à resposta imune, como o PD-L1. Assim, compreender as associações entre parâmetros e produtos de expressão proteica são determinantes para estabelecer alternativas que auxiliem no diagnóstico e tratamento do CDI. Estudos pioneiros do grupo de Stanford mostraram um perfil molecular do câncer de mama pela expressão de genes, associando a comportamentos biológicos e imunofenótipos distintos. Recentemente outros produtos de expressão proteica, como PDL1, PD1, CTLA-4, CK19, vem tendo destaque nas pesquisas com CDI, mas associações entre esses biomarcadores ainda não foram investigadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a importância da análise conjunta dos biomarcadores RE, RP, HER2, Ki67, CK19, CD8, PD1, CTLA-4 e PD-L1 para o diagnóstico, prognóstico e avaliação do risco de metástase em pacientes com CDI. O estudo foi dividido em fase retrospectiva, que investigou o perfil epidemiológico, variáveis anatomopatológicas e imuno- histoquímicas (IHQ) da população atendida no HU/UFSC entre 1994 e 2018 e estudo prospectivo, no qual foram estudados os biomarcadores RE, RP, HER2, Ki-67, CK19, CD8, CTLA4, PD1 e PD-L1 pelas metodologias de citometria de fluxo (CF) e/ou IHQ. No estudo retrospectivo, foi observada alta concordância ao agrupar casos utilizando RE e HER2 ou quatro biomarcadores (RE, RP, HER2 e Ki67) mostrando que é possível aplicar ferramentas economicamente acessíveis no diagnóstico do câncer de mama. Os resultados do estudo prospectivo mostram que: o PDL1 por IHQ está associado a subtipos de pior prognóstico; de todos os leucócitos presentes no sangue periférico, os linfócitos T GamaDelta apresentaram-se reduzidos nas amostras com CDI; nas amostras histológicas foi observado diminuição das células NKT e diminuição da relação de linfócitos TCD4/CD8; a população de linfócitos T DuploNegativo está ligeiramente aumentada no subtipo luminal A e aumenta nos subtipos HER2 e TBNC; os linfócitos TCD4 e TCD8 no sangue periférico de pacientes com CDI apresentaram aumento de expressão dos biomarcadores CTLA4 e PD1 quando comparadas ao controle. Em relação a investigação de células tumorais circulantes (CTC), elas foram detectadas em 6.38% do CDI. Os resultados dessa investigação mostram a importância da avaliação conjunta dos biomarcadores para avaliar a resposta imune e a capacidade da CF para detectar com segurança e agilidade CTC, para acompanhamento do CDI.

**Palavras-chave:** Carcinoma de Mama; Biomarcadores; Citometria de Fluxo; Imuno-histoquímica.



## ABSTRACT

Breast cancer (BC) has a high incidence among women worldwide, with a strong financial impact on public health systems. Biopsies make the diagnosis of suspicious nodules screened by mammography. However, many women are not part of the age group for population screening and, therefore, have advanced diseases at diagnosis, impacting survival. Metastatic disease is the leading cause of death, and one of the main causes of metastasis is dormant cells in the circulation. There is evidence that these cells develop mechanisms to evade the host's immune response; therefore, they are associated with more aggressive immunophenotypes of the disease. In addition, subtypes with a worse prognosis also express some proteins related to the immune response, such as PD-L1. Thus, understanding the associations between parameters and protein expression products is essential to establish alternatives that help diagnose and treat BC. Pioneering studies by the Stanford group showed a molecular profile of breast cancer through gene expression, associating it with different biological behaviours and immunophenotypes. Recently, other protein expression products, such as PDL1, PD1, CTLA-4, CK19 have gained prominence in BC research, but these biomarkers' associations have not yet been investigated. Thus, this study aimed to evaluate the importance of joint analysis of the biomarkers RE, RP, HER2, Ki67, CK19, CD8, PD1, CTLA-4 and PD-L1 for the diagnosis, prognosis, and assessment of the risk of metastasis in patients with breast carcinoma. The study was divided into a retrospective phase, whose population investigated the epidemiological profile, anatomopathological and immunohistochemical variables of those treated at the HU/UFSC between 1994 and 2018, and a prospective study, in which the biomarkers RE, RP, HER2, Ki - 67 CK19, CD8, CTLA4, PD1 and PD-L1 were studied by flow cytometry or immunohistochemistry (IHC) methodologies. In the retrospective study, a high agreement was observed when grouping cases using ER and HER2 or four biomarkers (RE, RP, HER2 and Ki67), showing that it is possible to apply accessible tools in diagnosing breast cancer. The prospective study results show that PDL1 by IHC is associated with subtypes of worse prognosis. Of all the leukocytes present in peripheral blood, GD T lymphocytes were reduced in samples with ICD. There was a decrease in NKT cells and a decrease in the ratio of TCD4/CD8 lymphocytes in the histological samples. The population of DN T lymphocytes is slightly increased in the luminal A subtype and increases in the HER2 and TBNC subtypes. TCD4 and TCD8 lymphocytes in peripheral blood of patients with BC showed increased expression of biomarkers CTLA4 and PD1 compared to control. Regarding the investigation of circulant cell tumour (CTC), they were detected in 6.38% of cases with BC. This investigation shows the importance of joint assessment of biomarkers and the ability of flow cytometry to detect CTC safely and quickly for monitoring BC.

**Keywords:** Breast Carcinoma; Biomarker; Flow Cytometry; Immunohistochemistry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento das glândulas mamárias.....	30
Figura 2. Fotomicrografia de cortes histológicos de estrutura ducto lobular da mama .....	32
Figura 4. Desenvolvimento fisiológico dos ductos mamários.....	34
Figura 5. Desenho da macro e micro estrutura da glândula mamária humana .....	35
Figura 6. Desenho esquemático e a relação ducto-lobular .....	36
Figura 8. Figura esquemática mamilo e ductos principais.....	39
Figura 10. Imagem histológica de Unidade Ducto Lobular.....	40
Figura 11. Representação de ductos e lóbulos mamários. ....	41
Figura 13. Figura ilustrativa de um corte histológico de ductos e lóbulos. ....	43
Figura 14. Desenho esquemático das lesões benignas e malignas com o parênquima mamário. .....	44
Figura 16. Imagem de exame físico e inpeção das mamas na população de rastreio. ....	53
Figura 17. Imagem de preparo do dispositivo com agulha para coleta de material por core biópsia.....	56
Figura 18. Modelo de diferenciação celular e o carcinoma de mama .....	64
Figura 19. A figura representa o desenho esquemático dos componentes celulares de um ducto normal da glândula mamária. Na camada externa observam-se as células mioepiteliais em vermelho, circundando uma camada celular colunar chamadas de células epiteliais luminais, representadas em azul.....	65
Figura 20. Vias de diferenciação do carcinoma de mama. A figura representa as três principais vias de diferenciação do carcinoma de mama (via Luminal, via HER2 e a via TNBC). ....	66
Figura 21. Imagem do carcinoma invasivo da mama Grau 1, Bem Diferenciado. mostra fotomicrografia da histologia do carcinoma invasivo da mama de duas pacientes diferentes (Painel A e Painel B) com formação tubular score 1 e grau nuclear score 2. Apesar de o mesmo padrão morfológico, em relação a graduação tubular e nuclear, apresentam prognósticos diferentes, devido as assinaturas genicas distintas. ....	67
Figura 22. Imagem de representa imunofenótipo de duas pacientes diferentes.....	68
Figura 23. Representação da classificação molecular do carcinoma de mama .....	69
Figura 24. Gráfico dos perfis de expressão genica .....	71
Figura 25. Imunofenótipos do carcinoma de mama .....	73
Figura 26. Via de ativação do PDL-1. ....	77
Figura 27. Vias CTLA-4 e PD-1.....	80

Figura 28. Representação de células tumorais circulantes. O desenho esquemático mostra diferentes estágios das células tumorais circulantes intravasculares e sua relação com as metástases. ....	82
Figura 29. Amostra de tecido mamário em formol a 10% tamponado. ....	113
Figura 30. Preparo da amostra de tecido para citometria de fluxo. ....	114
Figura 31. Armazenamento da amostra tecidual de nódulos de mama ....	115
Figura 32. Tubos de venopunção. Tubos de coleta sangue periferico, K2 EDTA “BD vacutainer®. ....	116
Figura 33. Descreve os passos para coleta da amostra de sangue.....	116
Figura 34. Processo de maceração manual, representa o processo de maceração manual, com uso de lâmina de bisturi e soro fisiológico refrigerado em placa de gelo, para manter o material viável. ....	117
Figura 35. Transferência do material macerado para tubo de citômetro. ....	117
Figura 36. Processos de maceração e filtragem representa a sequência de maceração (Painel A) e transferência de tubo com uso de filtro (Painel B).....	118
Figura 37. Sequência dos três tubos da análise do tecido para citometria de fluxo retrada os três tubos de preparo para a análise das variáveis na amostra tecidual por citometria de fluxo. Tubo célula (TC), Tubo 1 - biópsia (BX1) e Tubo 2 - biópsia (BX2) ....	119
Figura 38. Figura esquemática da metodologia desenvolvida para amostras de mama para citometria de fluxo. No desenho 38 observa-se a sequência de eventos metodológicos relacionados ao preparo da amostra tecidual do nódulo de mama, para citometria de fluxo, passando dos estágios de maceração, com dissociação celular, filtragem até a distribuição nos tubos de análise.....	119
Figura 39. Preparo do Bulki Lysis (BL) ....	120
Figura 40. Mapa de anticorpos monoclonais das amostras sangue ....	123
Figura 41. Identificação dos leucócitos presentes na biópsia core ....	124
Figura 42. Expressão de CD152 e CD279 nos linfócitos intra tumorais ....	124
Figura 43. Expressão de CD152 e CD279 nos linfócitos do sangue periférico.....	125
Figura 44. Identificação de células CK19 circulantes no sangue periférico. ....	126
Figura 45. Fotomicrografia dos Biomarcadores PDL1; PD1 e CTLA4. ....	127
Figura 46. Fotomicrografia dos Biomarcadores RH, HER2 e KI67 ....	128
Figura 47. Validação do anticorpo anti-PDL-1 em células MDA-MB-231 ....	132
Figura 48. Validação e titulação do anticorpo anti-CK19 nas células SiHa (controle negativo) e MCF-7.....	133

Figura 49. Detecção de Células MDA-MB-231 pela expressão de PDL-1 suspensas em PBS 0,9% e Sangue Periférico .....	135
Figura 50. Detecção de Células MDA-MB-231 pela expressão de PDL-1 suspensas em PBS 0,9% e separadas por Ficoll-Hypaque .....	136
Figura 51. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T sangue periférico das pacientes com CDI, comparada de acordo com o subtipo de neoplasia.....	157
Figura 52. Avaliação da expressão de PDL-1 em linfócitos totais infiltrados no tecido tumoral.....	159
Figura 53. Êmbolos vasculares e o ciclo celular.....	161





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de categoria BI-RADS®, interpretação, risco de malignosidade e conduta..	55
Tabela 2. Sistema de Classificação de Nottingham .....	58
Tabela 3. Fatores Prognósticos em carcinoma de mama –nível de evidência AJCC .....	63
Tabela 4. Distribuição dos biomarcadores baseado na conferência de St. Gallen.....	72
Tabela 5. Distribuição de quatro biomarcadores para caracterização de subtipos IHQ com base na Conferência de St. Gallen. ....	89
Tabela 6. Distribuição de Subtipos com base no status do RE e HER2. ....	89
Tabela 7. Dados demográficos da amostra .....	90
Tabela 8. Frequência de características morfológicas .....	91
Tabela 9. Frequência dos biomarcadores nas amostras de carcinoma invasivo da mama.....	91
Tabela 10. Prevalência dos subtipos IHQ de acordo com a Conferência de St Gallen .....	92
Tabela 11. Distribuição dos Subtipos IHQ pelos biomarcadores RE/HER2 (Grupo 2) .....	92
Tabela 12. Frequência de subtipos do Grupo 1 e os tipo histológico, faixas etárias e características morfológicas.....	94
Tabela 13. Frequência dos biomarcadores RE e HER2 nos CDI NST e CLI, nos grupos etários e nas características morfológicas relacionadas ao grau histológico e ao grau nuclear .....	95
Tabela 14. Padrão de associação entre a prevalência de subtipos pelo Consenso de St Gallen e os biomarcadores RE/HER2 por faixas etárias.....	96
Tabela 15. Padrão de associação entre a prevalência de subtipos pelo Consenso de St Gallen e os biomarcadores ER/HER2 pelo grau histológico. ....	97
Tabela 16. Padrão de associação entre a prevalência de subtipos pelo Consenso de St Gallen e os biomarcadores ER/HER2 com o grau nuclear. ....	98
Tabela 17. Concordância entre os subtipos do Grupo 1 e os subtipos do Grupo 2 pelo Kappa de Cohen. ....	99
Tabela 18. Painel de anticorpos com clones e concentração para amostras de tecido por Citometria de Fluxo:.....	122
Tabela 19. Painel de anticorpos com clones e concentração para amostras de sangue periférico por citometria de fluxo: .....	122
Tabela 20. Painel de anticorpos com clones e concentração para amostras de tecido por imuno-histoquímica.....	129
Tabela 21. Dados demográficos da amostra .....	139

Tabela 22. Frequência das variantes clínicas pelos grupos idade.....	140
Tabela 23. Distribuição da doença benigna e maligna pelo BI-RADS <sup>®</sup> .....	141
Tabela 24. Frequência entre grau histológico e nuclear .....	142
Tabela 25. Frequência dos biomarcadores RE, RP e HER2 nas amostras de carcinoma invasivo da mama .....	143
Tabela 26. Prevalência dos subtipos RE, RP, HER2 e Ki67 nas amostras de carcinoma invasivo da mama de acordo com a Conferência de St Gallen.....	144
Tabela 27. Distribuição do PDL-1 por subtipos tumorais por IHQ.....	145
Tabela 28. Aspectos clínicos e laboratoriais das pacientes com PDL-1 positivo.....	146
Tabela 29. Descrição dos grupos de associação de pior prognóstico e a expressão do PDL1. ....	147
Tabela 30. Leucócitos presentes no sangue periférico das pacientes com CDI, comparados de acordo com a malignidade .....	148
Tabela 31. Leucócitos presentes no sangue periférico das pacientes com CDI, comparados de acordo com o subtipo de neoplasia.....	150
Tabela 32. Leucócitos presentes nas amostras de tecido das pacientes com nódulos de mama, comparados de acordo com a malignidade.....	152
Tabela 33. Leucócitos presentes nas amostras de teciduais das pacientes com CDI, comparados de acordo com o subtipo de neoplasia.....	154
Tabela 34. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T do sangue periférico das pacientes com CDI, comparadas de acordo com a malignidade .....	155
Tabela 35. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T sangue periférico das pacientes com CDI, comparada de acordo com o subtipo de neoplasia.....	156
Tabela 36. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T infiltrados no tecido tumoral das pacientes com CDI, comparada de acordo com a malignidade .....	158
Tabela 37. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T infiltrados no tecido tumoral das pacientes com CDI, comparada de acordo com o subtipo de neoplasia.....	158
Tabela 38. Desempenho do teste de avaliação de CTC com variáveis clínicas e anatomopatológicas. ....	163

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7AAD – 7-aminoactinomicina D

A – Acurácia

AJCC – *American Joint Committee on Carcinoma*

APC – *Allophycocyanin*

BC – Carcinoma de mama

BRCA1 – *Breast Cancer type 1 susceptibility gene*

BRCA2 – *Breast Cancer type 2 susceptibility gene*

CAP – *College of American Pathologists*

CD – *Cluster of differentiation*

CDI – carcinoma invasivo da mama

cDNA – DNA complementar

CF – Citometria de Fluxo

CK – Citoqueratina

CLI – carcinoma lobular invasivo

CTLA4 – proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico

DAB – diaminobenzidina

DC – célula dendrítica

DN – Linfócito T duplo Negativo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – Especificidade

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

ER – Receptor de estrogênio

FBS – soro bovino fetal

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FSC – *A forward scatter area*

FSC – *H forward scatter height*

HER2 – *human epidermal growth factor receptor 2*

HLA-DR – Antígeno leucócito humano-antígeno D relacionado

HU-UFSC/EBSERH – Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina/ Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

IHQ – Imuno-histoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar

*ISH – In situ hybridization*

KI67 – marcador de proliferação

LN – linfonodo

LOEH – Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

NK – célula natural killer

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – tampão salina fosfato

PD-1 – Proteína da morte celular programada 1

PD-L1 – ligante da morte programada 1

PE – Ficoeritrina

PerCP – proteína clorofila peridina

PR – Receptor de Progesterona

RH - Receptor Hormonal

RM – ressonância magnética

RNA – Ácido Ribonucleico

RVN – Razão de Verossimilhança Negativa

RVP – Razão de Verossimilhança Positiva

S – Sensibilidade

SSC-A – *Side scatter area*

SSC-H – *Side scatter height*

SUS – Sistema Único de Saúde

TC – tomografia computadorizada

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNBC – carcinoma de mama triplo negativo

TNM – Sistema de estadiamento do câncer baseado em Tumor, Linfonodo e Metástase.

ULAP – Unidade Laboratório de Anatomia Patológica

US – Ultrassonografia

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

WHO – World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
2.1. A MAMA .....	29
2.1.1. Mamogênese .....	29
2.1.2. Desenvolvimento da Mama Adulta .....	31
2.1.3. Lactogênese .....	34
2.1.4. Estrutura da Glândula Mamária Humana Adulta.....	36
2.2. CARCINOMA DE MAMA .....	45
2.2.1. Doença Epitelial Maligna da Mama.....	45
2.2.2. Epidemiologia do Carcinoma de Mama .....	45
2.2.3. Fatores de Risco para o Carcinoma de Mama .....	46
2.2.4. Diagnóstico do Carcinoma de Mama .....	51
2.2.5. Classificação Histopatológica do Carcinoma de Mama .....	56
2.2.6. Exame Imunohistoquímico .....	58
2.2.7. Marcadores Prognósticos e Preditivos do Carcinoma de Mama.....	62
2.2.8. Carcinogênese Mamária .....	63
2.2.9. Hierarquia da Diferenciação celular Correlação com Subtipos Intrínsecos      66	
2.2.10. Heterogeneidade Tumoral .....	67
2.2.11. Padrões Moleculares do Carcinoma de Mama .....	68
2.2.12. Imunofenótipos Baseados no Retrato Molecular do Carcinoma de Mama              70	
2.2.13. Classificação Imuno-Histoquímico Carcinoma de Mama com Base no Padrão Molecular .....	73
2.2.14. Rearranjo dos Imunofenótipos e Relação com Marcadores Prognósticos      74	
2.2.15. Imunofenótipos de Carcinoma de Mama e Comportamento	

<b>Biologico Tumoral</b> .....	75
2.3.    IMUNIDADE ANTI-TUMORAL .....	76
<b>2.3.1. Expressão do PDL-1 e o Carcinoma da Mama</b> .....	77
<b>2.3.2. Expressões de PD1 e CTLA-4 e o Carcinoma da Mama</b> .....	79
2.4.    DOENÇA METASTÁTICA .....	80
<b>2.4.1. Células Dormentes</b> .....	81
<b>2.4.2. Células Circulantes</b> .....	82
2.5.    JUSTIFICATIVA .....	83
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>85</b>
3.1.    OBJETIVO GERAL .....	85
3.2.    OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	85
<b>3.2.1. Estudo Retrospectivo</b> .....	85
<b>3.2.2. Estudo Prospectivo</b> .....	85
<b>4. ESTUDO RETROSPECTIVO:</b> .....	<b>87</b>
4.1.    METODOLOGIA .....	87
<b>4.1.1. Caracterização da população de estudo</b> .....	87
<b>4.1.2. Características clínicas e morfológicas</b> .....	87
<b>4.1.3. Critérios Imuno-Histoquímicos</b> .....	88
<b>4.1.4. Definição De Subtipos Do Carcinoma De Mama Por Imuno-</b> <b>Histoquímica</b> 89	
<b>4.1.5. Análise Estatística</b> .....	90
4.2.    RESULTADOS .....	90
<b>4.2.1. Descrição da Amostra</b> .....	90
<b>4.2.2. Associações Univariadas</b> .....	96
<b>4.2.3. Concordância entre as Classificações</b> .....	99
4.3.    DISCUSSÃO .....	100
4.4.    CONSIDERAÇÕES FINAIS DO ESTUDO RETROSPECTIVO .....	
<b>5. ESTUDO PROSPECTIVO</b> .....	<b>107</b>



5.1.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	107
	5.1.1. Delineamento do estudo.....	107
	5.1.2. Cultura Celular e Validação de Anticorpos .....	107
	5.1.3. Caracterização da população do estudo .....	109
	5.1.4. Seleção das pacientes .....	110
	5.1.5. Coleta da amostra de tecido e de sangue para análise em citômetro de fluxo	112
	5.1.6. Maceração e preparo de amostra tecidual para análise em citômetro de fluxo	117
	5.1.7. Preparo de amostra sangue para análise de CTC em citometro de fluxo	120
	5.1.8. Definição dos painéis de anticorpos para investigação dos biomarcadores por citometria de fluxo.....	120
	5.1.9. Estratégia de identificação de leucócitos nas amostras teciduais e de sangue periférico.....	123
	5.1.10. Avaliação dos biomarcadores por imuno-histoquímica .....	126
5.2.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	130
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>131</b>
6.1.	VALIDAÇÃO DOS BIOMARCADORES CK19, PDL-1, PD1 E -CTLA4 PARA CITOMETRIA DE FLUXO .....	131
6.2.	PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES DO ESTUDO.....	137
6.3.	PERFIL HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO .....	141
6.4.	ANÁLISE CONJUNTA DOS BIOMARCADORES RE, RP, HER2, KI67 E PDLL1 NO TECIDO MAMÁRIO .....	142
6.5.	CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTC) NO SANGUE PERIFÉRICO VENOSO PELA EXPRESSÃO DA CK19 POR CF .....	160
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>165</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>167</b>
	<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	

<b>(TCLE).....</b>	<b>197</b>
<b>APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DA PESQUISA .....</b>	<b>199</b>
<b>APÊNDICE C - TÉCNICA PARA REALIZAÇÃO DE CITOMETRIA DE FLUXO NO SANGUE E TECIDO .....</b>	<b>201</b>
<b>APÊNDICE D - DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRAS HUMANAS .....</b>	<b>205</b>
<b>APÊNDICE E - PAINEL DE ANTICORPOS PARA EXAME POR CITOMETRIA DE FLUXO .....</b>	<b>215</b>
<b>APÊNDICE F – INFORMAÇÕES DE PADRONIZAÇÃO .....</b>	<b>217</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama é a forma mais incidente de câncer em mulheres em todo o mundo (WHO, acesso em 05/03/2022). Em 2018, foram relatados 2,1 milhões de novos casos com 627.000 mortes relacionadas (WHO; 2019) e em 2020 foram relatados 2,3 milhões, com 685 mil mortes no mundo e prevalência de 7,8 milhões de casos nos últimos 5 anos (WHO, acesso em 05/03/2022). Avanços nos programas de rastreamento de lesões de mama e nos diagnósticos em biologia molecular, associados a descobertas de novos fármacos, têm contribuído para a recente melhora da taxa de sobrevivência em países desenvolvidos (EBCTCG, 2005; TRUDEAU M, et al 2005; WHO, 2019). Outro grande passo para melhorar a expectativa de cura foi o estudo do genoma do câncer, que explicou os subtipos intrínsecos dos carcinomas invasivos da mama, aumentando a chance de sucesso na indicação de terapias mais direcionadas, melhorando a qualidade de vida e morbimortalidade das pacientes (AHN SG, et al., 2016; WHO, 2019).

Como o câncer é uma doença multifatorial, existe uma forte relação entre fatores genéticos e não genéticos (WHO, 2019). O acúmulo de inúmeras alterações moleculares leva às instabilidades genéticas, proliferações de células neoplásicas e aquisições de fenótipos resistentes e invasivos (SIMON R, et al., 2003). Quando as alterações nas atividades gênicas atingem o ambiente interno e a vizinhança das células tumorais, a combinação de fatores exógenos e as variações genéticas inatas do indivíduo são a causa da manifestação do tumor por meio de diferentes fenótipos (HANAHAN AND WEINBERG. 2000; HANAHAN AND WEINBERG, 2011)

Um estudo pioneiro utilizou tecnologias aplicadas aos estudos de DNA, RNA e do perfil de proteínas para retratar com maior precisão os fenótipos tumorais, caracterizando de forma sistemática e detalhada os tumores nas escalas genômicas e proteômicas, correlacionando com informações clínicas e melhorando a compreensão das causas e da progressão do carcinoma (SORLIE T. 2004).

Um ponto muito importante a destacar foram as descobertas e a implementação de novos marcadores moleculares que vem trazendo melhorias nas intervenções terapêuticas, o que torna o tratamento mais individualizado e preciso (SORLIE T. 2004; PRAT A AND PEROU CM, 2011).

Inicialmente, cinco subgrupos intrínsecos de carcinoma de mama foram considerados pela avaliação do perfil de expressão gênica baseado em microarranjos (PEROU CM, et al.

2000). Posteriormente esses perfis gênicos foram validados pela imuno-histoquímica (IHQ) pela análise da expressão de proteínas (SORLIE T. 2004; BERTUCCI F, et al. 2006; PRAT A AND PEROU CM, 2011; VUONG D, et al. 2014). Muitos anticorpos utilizados na IHQ têm um papel estabelecido ou presumido e representam proteínas das quais a transcrição foi discriminada em estudos de perfil genético (PEROU, 2000; SORLIE T, 2004, BERTUCCI, 2006). A IHQ permanece como um dos principais métodos para determinar o perfil de expressão proteica em laboratórios de anatomia patológica (MARQUEZ, 2004; AMIN, et al., 2017; PU, et al., 2019). Dessa forma a caracterização dessas proteínas pela IHQ contribui para o diagnóstico e monitoramento do carcinoma de mama invasivo, o que auxilia no desenvolvimento de novos alvos diagnósticos e terapêuticos (BERTUCCI, 2006; GOLDBIRSCHE et al., 2013; AMIN, et al., 2017).

É evidente que muito se tem a estudar em câncer, mas a caracterização de proteínas pode fornecer marcadores úteis para análise, diagnóstico ou monitoramento desta entidade tão específica (BERTUCCI F, et al. 2006). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão de alguns biomarcadores por citometria de fluxo para detectar células tumorais circulantes no sangue periférico e avaliar a resposta imune no microambiente tumoral em pacientes com nódulos de mama que realizaram biópsia por core guiada por ultrassonografia no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU UFSC).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A MAMA

A glândula mamária é um anexo epidérmico especializado, que sofre ação hormonal e tem a função principal de produção de leite (BULL WORLD HEALTH ORGAN, 1989)

#### 2.1.1. Mamogênese

O desenvolvimento fisiológico da glândula mamária começa na fase embrionária (ROSEN, PP AND OBERMAN, HA, 1993).

As glândulas mamárias têm origem ectodérmica e são um tipo modificado de glândula sudorípara altamente especializada que se desenvolvem de forma similar tanto em embriões femininos quanto em embriões masculinos. A primeira evidência da glândula mamária é na fase embrionária, em torno da quarta semana gestacional, com o desenvolvimento das cristas mamárias na superfície ventral do embrião. Essas cristas que se localizam desde a região axilar até a região inguinal (Figura 1 Painel A), geralmente desaparecem com exceção daquelas que se localizam na região das futuras mamas (Figura 1 Painel B). Nesse local surgem como brotos mamários primários, em torno da quinta semana (MOORE, KL, 2016).

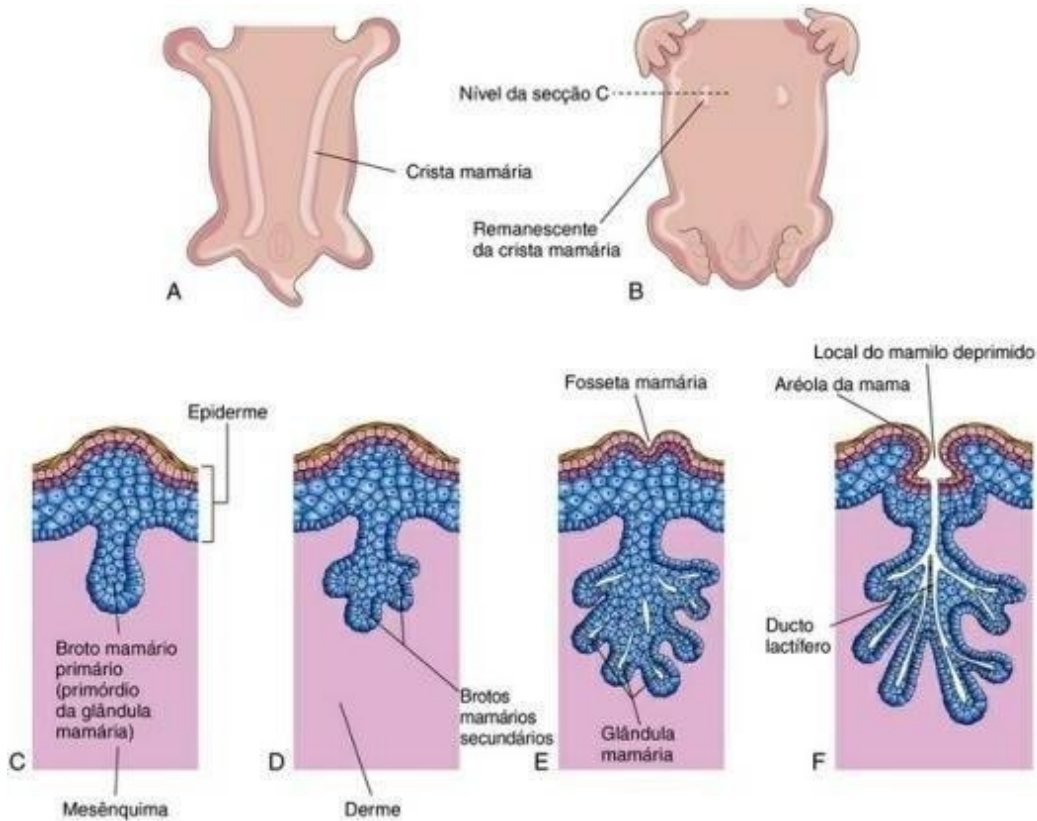
Os brotos mamários primários são invaginações da epiderme, que sofrem influência do mesênquima subjacente (Figura 1 Painel C). Cada broto dá origem a diversos brotos, que com o desenvolvimento evolutivo dão origem a ductos lactíferos ramificados. O tecido conjuntivo e o tecido adiposo peri glândular se desenvolvem a partir do mesênquima (figura 1 Painel D e Painel E) (LEE, K, et al. 2011, MCDERMOTT, KM, et al. 2010).

Ao nascimento (Figura 1 Painel F) as glândulas mamárias femininas e masculinas são idênticas (ROSEN, PP AND OBERMAN, HA, 1993; MOORE, KL, 2016). Transitoriamente podem apresentar pouco aumentadas e por vezes secretoras, por ação de hormônio materno transplacentário que atinge a circulação fetal. (OSBORNE, M. P., BOOLBOL, S. K. 2010; MOORE, KL, 2016). Microscopicamente os ductos lactíferos estão dilatados, mas não há formação de ácinos. (ROSEN, PP AND OBERMAN, HA, 1993; MOORE, KL, 2016)

Nas meninas a mama aumenta rapidamente na puberdade, geralmente entre 9 e 13 anos de idade (MOORE, KL, 2016) Neste período há o desenvolvimento das glândulas, que reflete o crescimento do componente epitelial ducto-lobular, do estroma e do tecido adiposo. A

maturação total ocorre em torno dos 19 anos (em média entre 18 e 20 anos). Nos meninos os ductos lactíferos permanecem rudimentares ao longo da vida (MOORE, KL, et al. 2014; MOORE, KL, 2016).

Figura 1. Desenvolvimento das glândulas mamárias.



Painel A mostra a vista ventral de um embrião de aproximadamente 28 dias mostrando as cristas mamárias. Painel B, Vista similar com 6 semanas mostrando os remanescentes dessas cristas. Painel C, Seção transversal de uma crista mamária no ponto de desenvolvimento de uma glândula mamária. Painel D a F, Seções similares mostrando estágios sucessivos de desenvolvimento das mamas entre 12 semanas e o nascimento. Fonte: MOORE, KL. Embriologia clínica. 10. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2016

### 2.1.2. Desenvolvimento da Mama Adulta

O desenvolvimento da mama feminina (telarca) ocorre na puberdade, principalmente por ação do estrogênio (STINGL J. 2011). A telarca é a primeira característica secundária sexual a se desenvolver, e precede o pelos pubianos (pubarca) em até 6 meses (SUSMAN EJ, et al. 2010; SIMMONS PS. 1992).

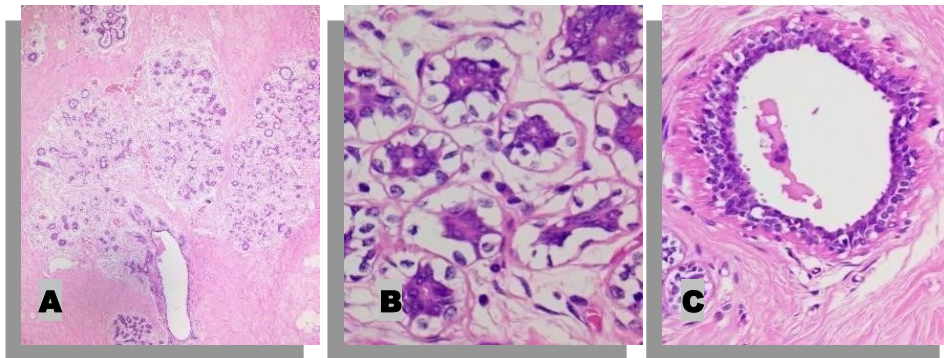
Variações no desenvolvimento da glândula mamária ocorrem em indivíduos da mesma faixa etária, e podem ser atribuídas em nível de maturação puberal, grupo étnico e concentrações hormonais (SUSMAN EJ, et al. 2010).

Junto com a remodelação macroscópica da glândula mamária puberal, células tronco multipotentes e células progenitoras são expostas a alterações hormonais (VAN KEYMEULEN A, et al. 2011; LEE H J AND ORMANDY C J. 2012; SHACKLETON M VF, et al. 2006; STINGL J RA, et al 2005). A partir dessa exposição, ocorre o aumento do estroma fibro adiposo e do componente epitelial. Nesse último há alongamento dos ductos com ramificações dicotômicas sob a influência estrogênica (HOWARD B A AND GUSTERSON B A. 2000; RUSSO J AND RUSSO I H. 1987). Simultaneamente o epitélio se divide em duas camadas distintas, uma mais externa denominada camada de células mioepiteliais e uma mais interna denominada camada de células luminiais. Tais células revestem os ductos e as estruturas alveolares em maturação (Figura 2 Painel A, Painel B e Painel C) (TIEDE AND KANG, 2011).

Com o desenvolvimento dos ácinos a partir de um ducto terminal (Figura 3 Painel A), há o desenvolvimento do componente de estroma especializado que circunda essas estruturas, formando a unidade lobular do ducto terminal (Figura 3 Painel B) (UDLT), que é a unidade funcional da mama (HOWARD AND GUSTERSON, 2000).

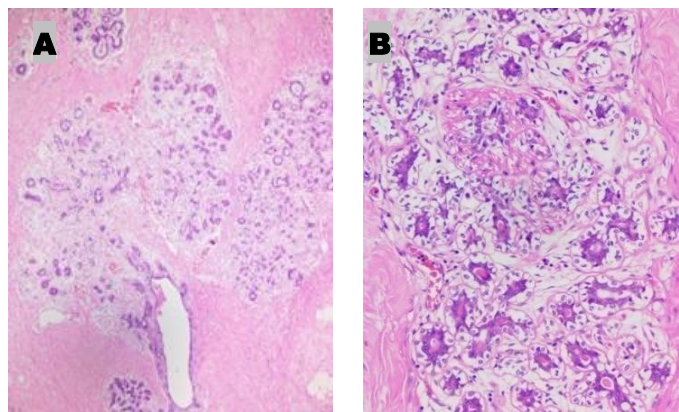
O estrogênio e a progesterona são respectivamente os grandes responsáveis por alongar e ramificar lateralmente os ductos (BRISKEN, et al. 1998). Alguns reguladores, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (ErbB2) podem influenciar na morfologia dos ductos e na sua ramificação (JACKSON-FISHER AJBG, et al. 2004).

Figura 2. Fotomicrografia de cortes histológicos de estrutura ducto lobular da mama.



Painel A mostra fotomicrografia de cortes histológicos de estrutura ducto lobular da mama feminina adulta, Painel B Apresentação dos ácinos e Painel C, do ducto, com detalhe da dupla população celular, a mais interna corresponde às células Luminais de coloração mais acidofílica e a mais externa corresponde a camada de células mioepiteliais, com citoplasma mais claro. Desenvolvimento da dupla população epitelial/mioepitelial da unidade ductal. Fonte: o Autor: HE 40X, 400X, 200X

Figura 3. Fotomicrografia da unidade ducto-lobular.



Painel A apresenta a unidade lobular do ducto terminal (UDLT), Painel B o detalhe do estroma especializado da unidade ducto lobular. Fonte: o Autor: HE 40X 200X.

As células-tronco mamárias e progenitores não expressam receptores para hormônios. Quando expressam os receptores hormonais geralmente não proliferam. (SHACKLETON, et al. 2006). Entretanto, os hormônios induzem mudanças morfológicas agindo em uma rede regulatória complexa de sinais parácrinos e fatores de transcrição que modulam a atividade das células-tronco mamárias (ASSELIN-LABAT, et al 2010. JOSHI, JACKSON H W, et al. 2010; JAVED AND LTEIF, 2013).

À medida que a mama evolui no estágio de maturação, há uma proliferação do parênquima interlobular, que é composto por tecido adiposo, fibroblastos, vasos sanguíneos e células imunológicas. O conjunto desses elementos compõe o microambiente da mama (WISEMAN AND WERB, 2002).



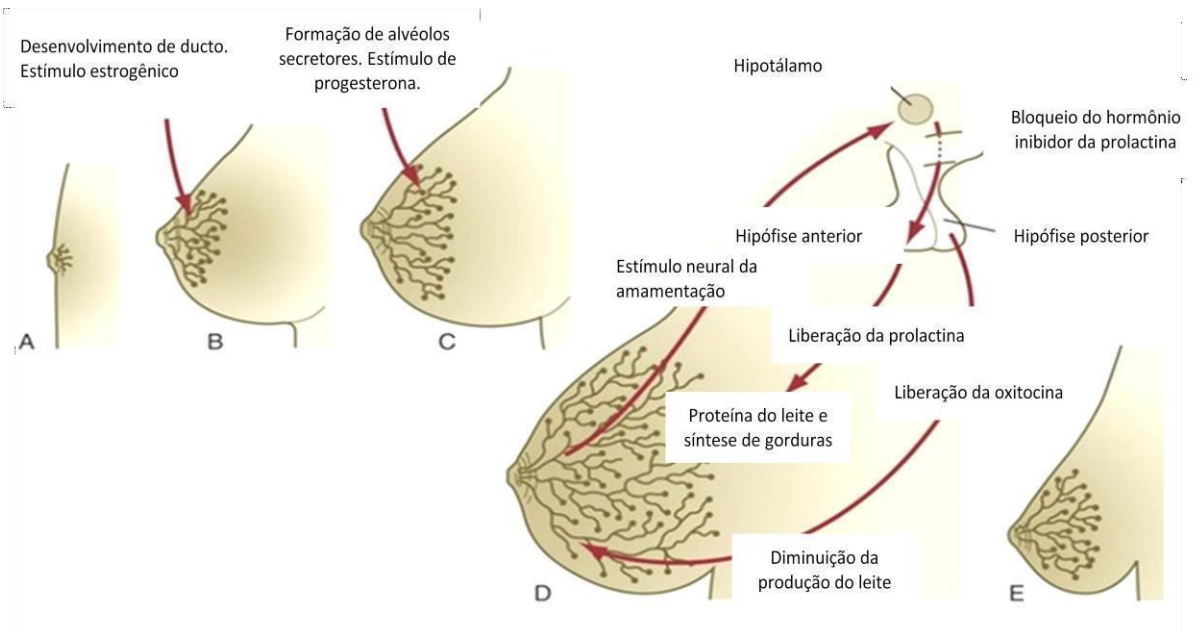
Interações entre o microambiente da mama (epitélio e estroma) são os grandes responsáveis pelo desenvolvimento da glândula, desde o período embrionário até o período puberal (SAKAKURA T, 1987; CUNHA, et al., 1995; ROBINSON, et al., 1999).

O desenvolvimento da mama humana é complexo, devido à ampla remodelação sofrida desde a fase embrionária até a idade adulta. Os vários estágios de diferenciação sofrem influência de múltiplos sinais hormonais. O estudo do desenvolvimento da mama humana é essencial para a compreensão de doenças, particularmente base na maturação hormonal (JAVEDAND L, 2013).

No desenvolvimento lobular da mama adulta são descritos quatro estágios de maturação. O estágio 1 é composto por agrupamento de células secretoras formando alvéolos. Os tipos 2, 3 e 4 são compostos por ductos terminais que se ramificam em vários ductulos e com aumento do número de alvéolos (Figura 4 Painel B, Painel C e Painel D) (HOWARD AND GUSTERSON, 2000). O 4º estágio é o nível máximo da maturação mamária, caracterizado pela mama gestacional e lactacional (Figura 5) (RUSSO AND RUSSO, 2004; RUSSO J, et al., 2006).

A mama nulípara, completa o desenvolvimento com maturação parenquimatosa e estromal entre a idade de 18 e 20 anos, e a principal composição são de lóbulos composto por agrupamento de células secretoras (estágio 1). São mamas maduras, mas inativas até o estímulo hormonal da gestação que transforma o microambiente em mama lactacional conforme observado na Figura 5 (JAVED AND LTEIF, 2013).

Figura 4. Desenvolvimento fisiológico dos ductos mamários.



Representação do desenvolvimento dos ductos mamários e controle hormonal do desenvolvimento e função da glândula mamária. A: ao nascimento. B: adulto jovem. C: adulto. D: Adulto em lactação. E, Adulto após lactação. Fonte: (<https://basicmedicalkey.com/integumentary-skeletal-and-muscular-systems>). Adaptado pelo Autor.

Influências hormonais entre o mesênquima e o parênquima existem em todos os estágios de desenvolvimento da mama, mas no estágio 4, o desenvolvimento de ductos lactíferos ocorre pelos hormônios placentários, progesterona, hormônios do crescimento, fatores do crescimento semelhante a insulina, estrógeno, prolactina, hormônios corticosteroides e triiodotironina (CERIANI R L, 1970;(I) CERIANI R L, 1970;(II); FLINT, et al., 2008).

Após a menopausa, a glândula mamária sofre um processo de involução gradual e progressiva, com atrofia lobular, perda do tecido conjuntivo intralobular e aumento do tecido adiposo do estroma interlobular (ROSEN AND OBERMAN, 1993).

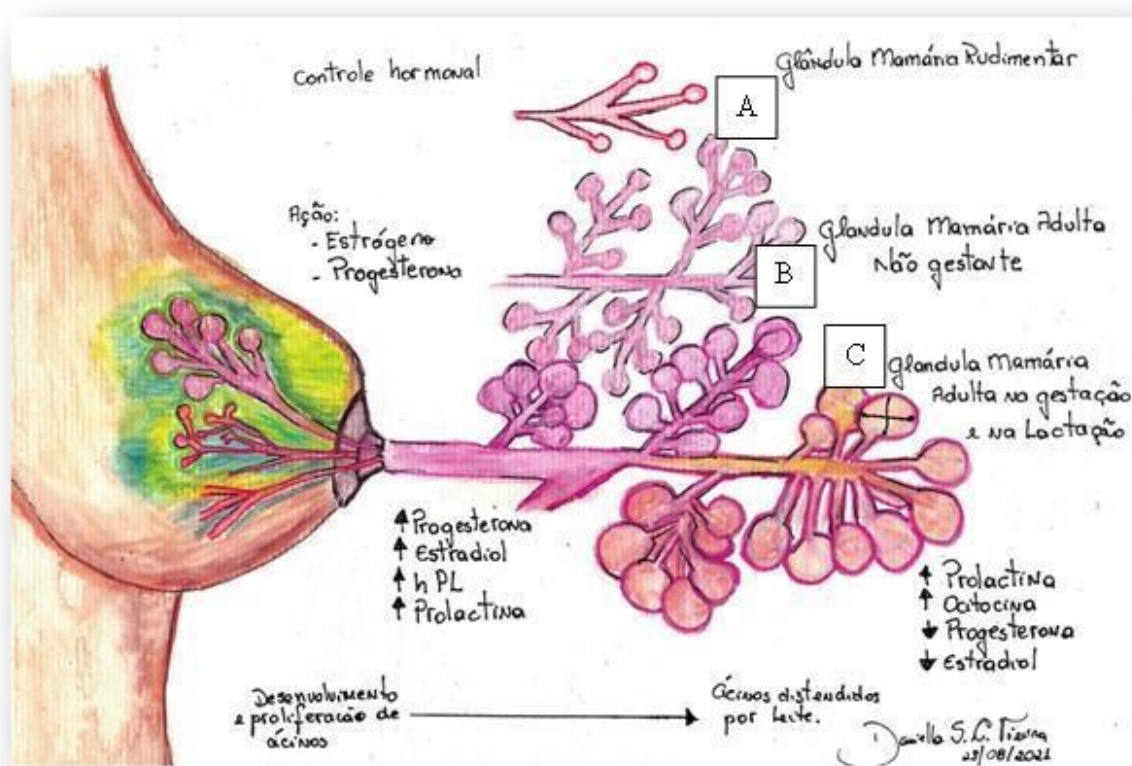
### 2.1.3. Lactogênese

A lactogênese está relacionada com a fisiologia dos processos reprodutivos da mulher. Na gestação ocorre a maior parte do desenvolvimento estrutural da mama, com intensas transformações metabólicas e fisiológicas (ORFÃO AND GOUVEIA, 2009).

Ao final da gestação, a lactogênese se manifesta, com o início da função secretora da mama, que transcende o período do parto e evolui até o período puerperal, quando estímulos fetais de sucção estimulam a produção de leite. Com a glândula mamária preparada durante a

gestação, a prolactina (de origem hipofisária), tem sua síntese aumentada e ativa as células luminiais da mama, estimulando a produção de leite (VINAGRE AND DINIZ, 2001). De forma sinérgica, outros hormônios participam do processo da lactogênese (HURLEY, 2002). A ocitocina, sintetizada no hipotálamo e armazenada na hipófise, age sobre a musculatura lisa e sobre as células mioepiteliais dos ácinos mamários, facilitando a ejeção do leite. O estrogênio, a progesterona, o hormônio do crescimento e hormônios tireoidianos também desempenham papéis no processo lactacional (Figura 5 Painel C) (GALVÃO, 2006).

Figura 5. Desenho da macro e microestrutura da glândula mamária humana.



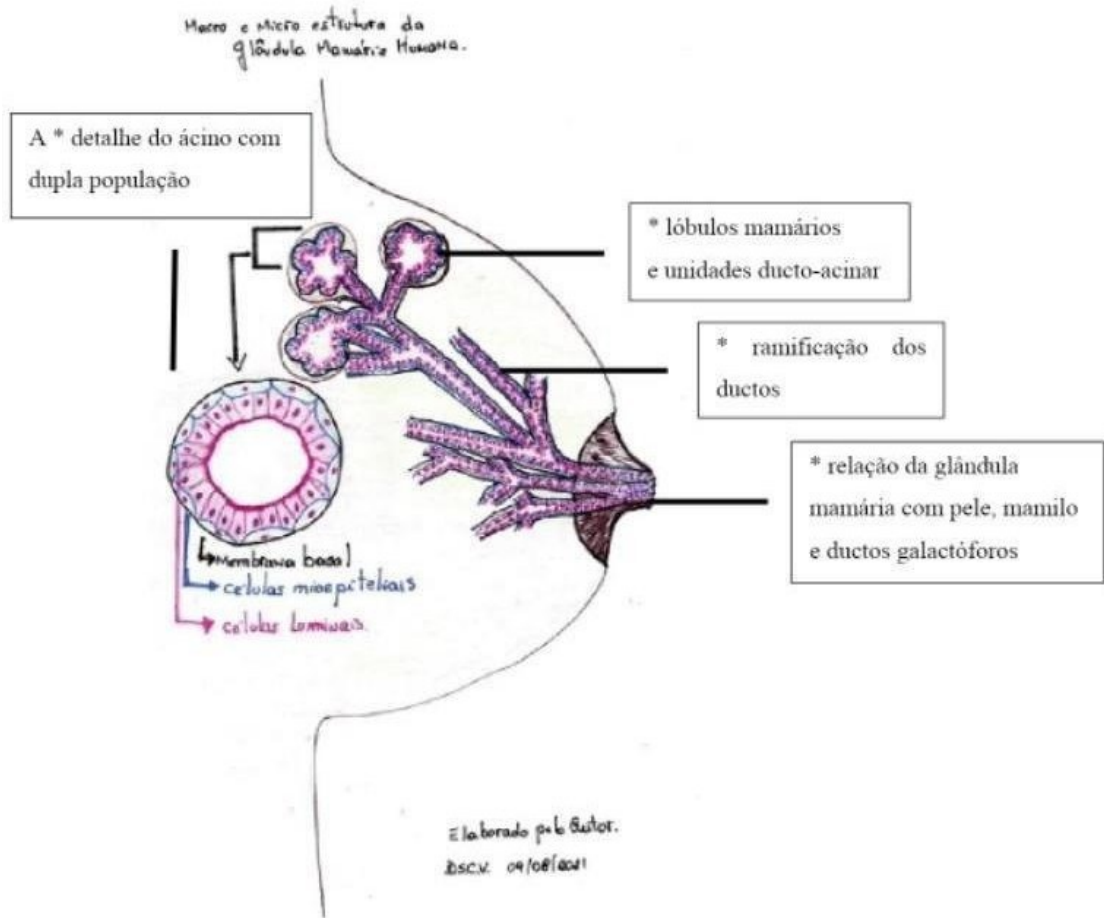
Mostra a macro e microestrutura da glândula mamária humana. Identifica-se a relação da pele e mamilo com os ductos galactóforos (ductos excretórios). Representação de controle hormonal e o desenvolvimento e função das unidades ductolobulares da glândula mamária. Painel A: pré-púbere – glândula mamária rudimentar; Painel B: glândula mamária adulta não gestante; Painel C: glândula mamária adulta gestante e lactante.

Fonte: o Autor: Aquarela sobre papel cansón, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>.

### 2.1.4. Estrutura da Glândula Mamária Humana Adulta

A representação da glândula mamária feminina humana segue padrões de configuração morfofuncional variável, mas de forma esquemática pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6. Desenho esquemático e a relação ducto-lobular.



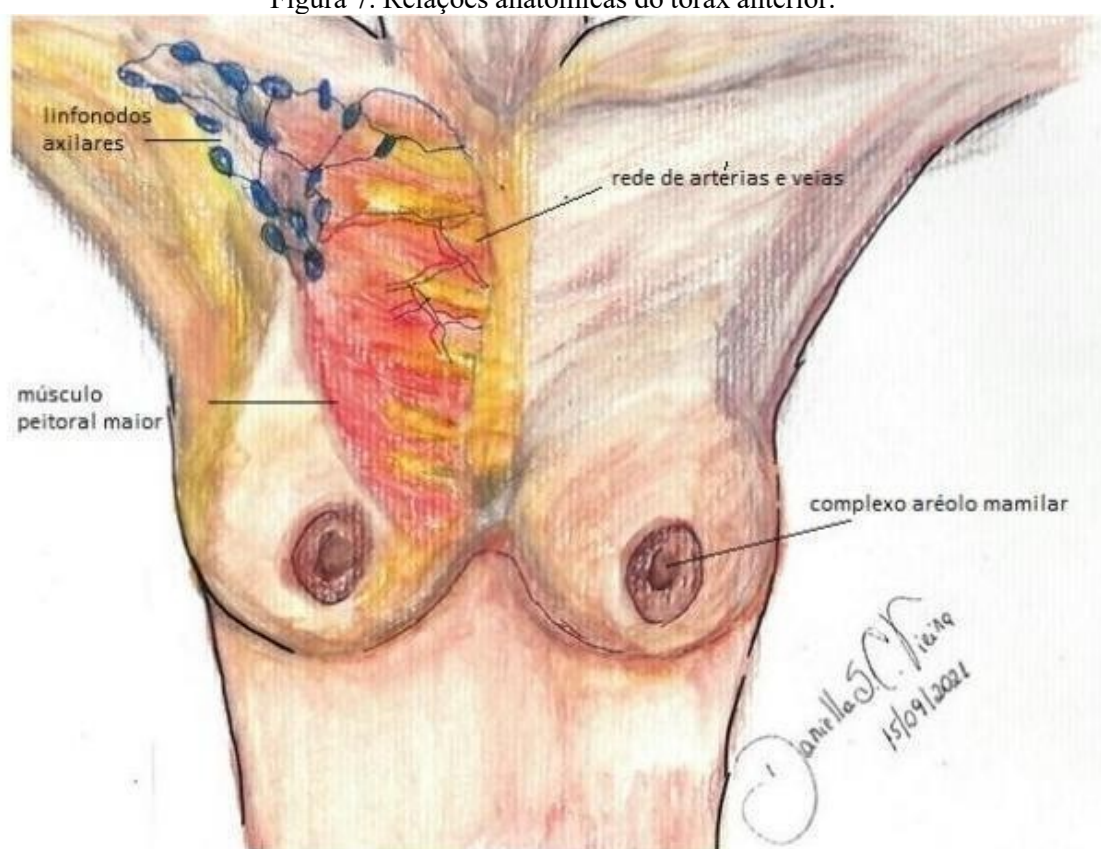
Representa esquematicamente a macro e microestrutura da glândula mamária humana. Identifica-se a relação da pele e mamilo com os ductos galactóforos (ductos excretores). Pode-se observar a ramificação de ductos interlobulares a partir de ductos galactóforos e a estrutura de lóbulos mamários na porção superior da imagem. Em detalhe há uma estrutura sacular de ácino mamário, com visualização bidimensional. Pode-se identificar a dupla população de células colunares ou cuboidais, representadas pela coloração rósea e dispostas na luz do ácino, chamadas de células luminiais e as de coloração azul, mais achatadas e periféricas, chamadas de células mioepiteliais. As células mioepiteliais repousam sobre a membrana basal.

Fonte: o Autor: caneta stabilo e lápis de cor sobre papel A4.

### 2.1.4.1. Macroestrutura da Glândula Mamária Humana Adulta

A glândula mamária é recoberta por pele e contém na porção central mamilo circundado por aréola. É um órgão par, localizado na parede anterior do tórax sobre o músculo peitoral maior. Normalmente se estende da segunda até a sexta costela, verticalmente, e da borda do esterno até a linha axilar média no eixo horizontal. A glândula pode ainda se projetar para a axila, com extensão para o músculo serrátil anterior e inferiormente ao músculo oblíquo externo e bainha do reto superior (Figura 7) (OSBORNE MP, 2010).

Figura 7. Relações anatômicas do tórax anterior.



Exibe desenho esquemático da porção anterior do tórax, com relação anatômica de linfonodos axilares, músculo peitoral maior, vasos da região mamária interna e complexo areolomamilar.  
 Fonte: o Autor. Aquarela sobre papel canson, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>.

O principal suprimento sanguíneo é pela artéria mamária interna e torácica lateral. Outros ramos arteriais como: intercostais, toraco-acromial, toraco-dorsal e subescapular, participam da irrigação. A drenagem venosa segue o sistema arterial. A drenagem mais importante dos vasos linfáticos é para a região axilar. Os linfonodos axilares recebem mais de 90% da linfa drenada. Uma pequena proporção é drenada dos vasos linfáticos intercostais

posteriores e torácicos internos para os linfonodos intercostais posteriores e mamários internos, respectivamente (OSBORNE MP, 2010).

#### 2.1.4.2. *Microestrutura da Glândula Mamária Humana Adulta*

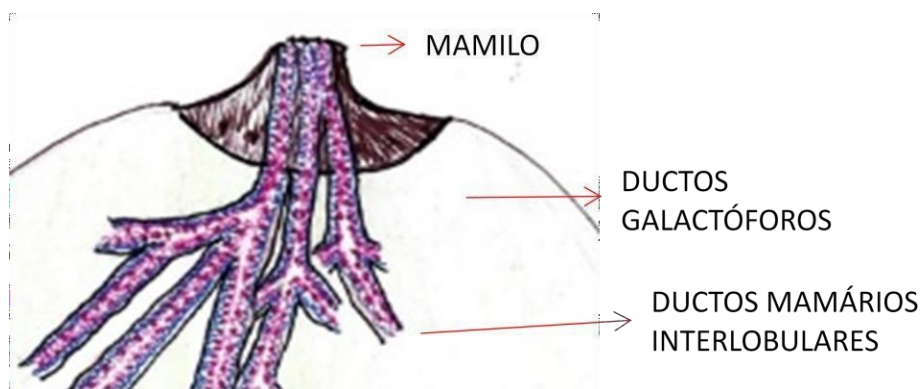
O sistema de ductos e lóbulos, não é um sistema anatomicamente bem definido. Apresenta uma importante variação individual em relação a sua distribuição (SCHNITT AND COLLINS, 2018).

O tecido glândular, também denominado parênquima mamário, contém ductos e lóbulos mamários, em meio a tecido conjuntivo especializado. O parênquima mamário está imerso em estroma que contém quantidades variáveis de tecido fibroso e tecido adiposo (GOING AND MOFFAT, 2004) Na mama não lactante há predomínio do estroma, com proporções relativamente variáveis de tecido fibroso e adiposo, que modificam com a idade e as condições individuais de cada mulher (SCHNITT AND COLLINS, 2018).

#### 2.1.4.3. *Ductos Mamários*

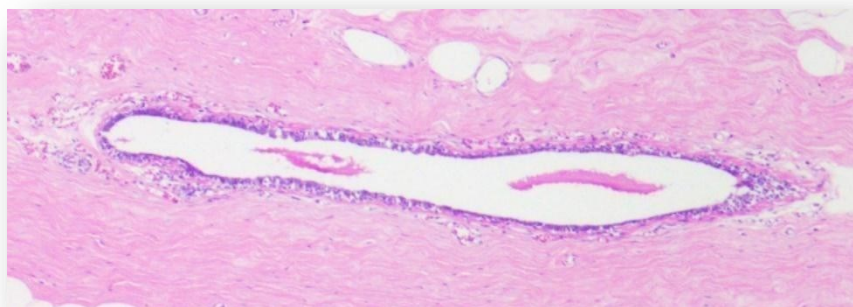
Os ductos mamários são elementos do parênquima que conduzem os produtos de lactogênese. Na mama normal pode haver entre 15 e 20 orifícios ductais que começam no mamilo (Figura 8) e se ramificam para formar as unidades ducto-lobulares ou ductos interlobulares (Figura 9) (PAGE AND ANDERSON, 1987; TAVASSOLI FA, 1999; LOVE AND BARRSKY, 2004; ROSEN, PP 2009; SCHNITT AND COLLINS. 2018).

Figura 8. Figura esquemática mamilo e ductos principais.



Apresentação macro e microestrutura do mamilo e ductos mamários.  
Fonte: o Autor: caneta stabilo e lápis de cor sobre papel A4.

Figura 9. Figura ilustrativa do ducto interlobular.

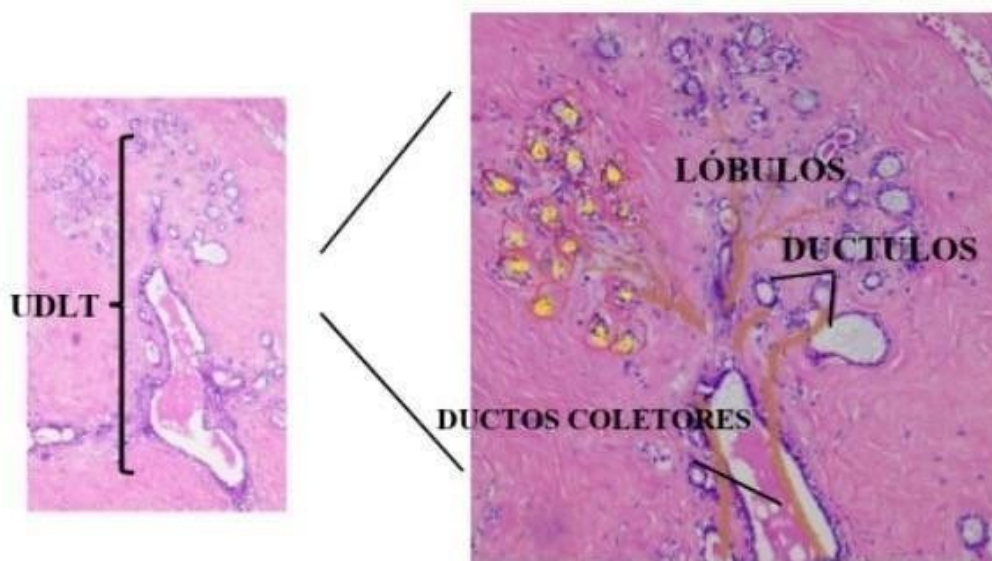


Mostra a apresentação histológica de um ducto mamário interlobulares cortado transversamente, em meio a estroma fibroso denso. Fonte: o Autor HE 100 X.

#### 2.1.4.4. Unidades Ductos Lobulares

As unidades ducto lobulares, são um conjunto de ácinos que tem uma estrutura comparada a árvore florida (Figura 10 Painel B), sendo os lóbulos a representação das flores, que drenam para os ductulos e ductos, que são representados pelos galhos e ramos maiores. Os ductos se projetam em ductos coletores (tronco da árvore) (Figura 10 Painel A) que terminam nos ductos galactóforos (Figura 8) junto aos seios lactíferos que terminam na superfície do mamilo (SCHNITT AND COLLINS, 2018).

Figura 10. Imagem histológica de Unidade Ducto Lobular.



Representação histológica da unidade ductolobular, com configuração arboriforme evidenciando os ductos coletores (tronco da árvore). Fonte: o Autor HE 40X e 100 X.

O lóbulo e seu ducto terminal (ductulos) são denominados de “unidade ducto lobular terminal” (UDLT) e representam a unidade funcional da mama. Essas estruturas sofrem mudanças morfológicas, tanto epiteliais quanto estromais, por ação hormonal, (como representado na Figura 5 Painel A e Painel B). As alterações morfológicas não são uniformes, e variam entre os indivíduos. Na lactação as células luminiais da desta região sofrem alterações secretoras (Figura 5 Painel C) (SCHNITT AND COLLINS, 2018).

Autores sugerem que a maioria dos carcinomas “in situ” e invasivo da mama surgem no epitélio da unidade lobular de ducto terminal (WELLINGS SR, ET AL. 1975; JENSEN HM, 1982; WHO, 2019)

#### 2.1.4.5. Componentes Epiteliais de Ductos e Lóbulos

Ductos e lóbulos são revestidos por duas camadas celulares. Uma mais interna denominada camada luminal, e uma mais externa denominada camada de células mioepiteliais (Figura 6 Painel A) (SCHNITT SJ, et al. 2004).

As células epiteliais luminiais expressam citoqueratinas (CK) de baixo peso molecular (CK 7, 8, 18 e 19), e a camada de células mioepiteliais podem ser evidenciadas através da imunomarcagem a qual inclui proteína S100, actina, calponina, miosina musculo liso de cadeia pesada, p63 e CD10, mas também expressam CK de alto peso molecular

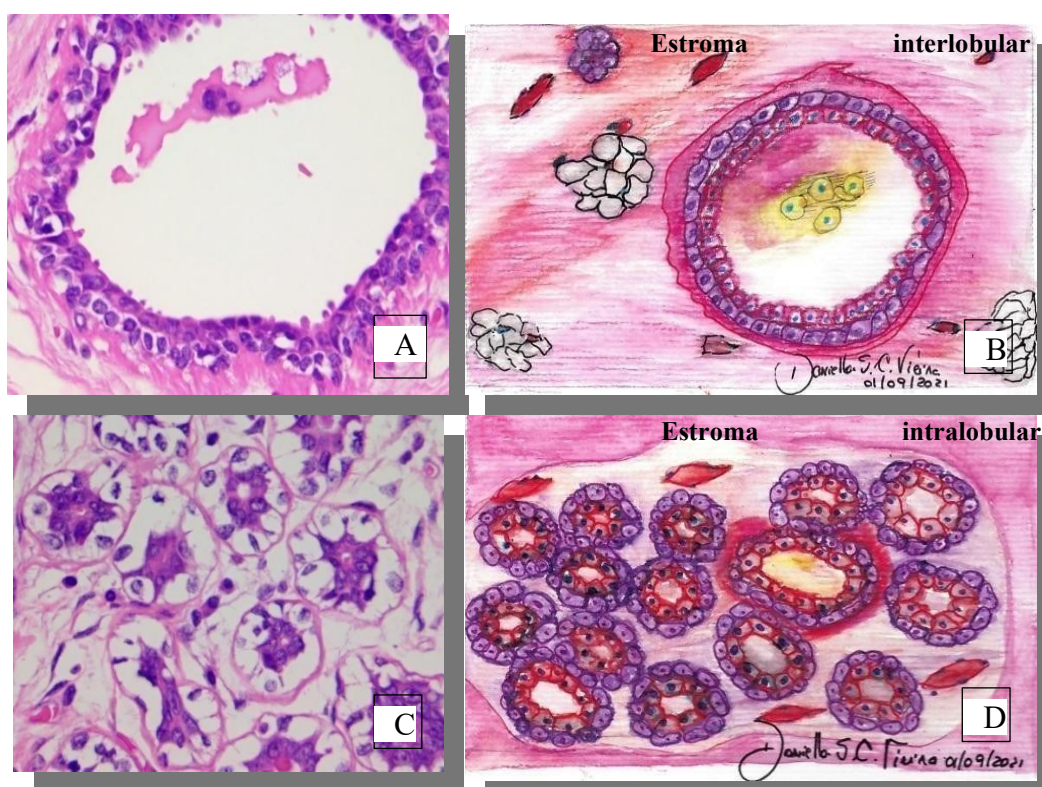


(CK5/6, 14 e 17). As células mioepiteliais têm aparência variável, podendo ser quase imperceptíveis ou apresentar citoplasma claro e abundante, tendo por vezes aparência mióide (Figura 11 Painéis A, B, C e D) (GOING JJ. 2006).

A expressão do ER $\alpha$  pode ser identificada nos núcleos das células epiteliais luminiais dos ductos e dos lóbulos. Entretanto a imunorreatividade nas células normais da mama não é forte nem homogênea, apresentam um padrão irregular e com variações de intensidade (SHOKER BS, et al. 1999).

Células mioepiteliais não expressam imunorreação para ER $\alpha$ . A expressão do PR também é observada com padrão heterogêneo no epitélio luminal ducto-lobular (SHAW JA, et al. 2002).

Figura 11. Representação de ductos e lóbulos mamários.



No detalhe da imagem de fotomicrografia mostra (Painel A) estrutura de ducto mamário e (Painel C) estrutura de lóbulo mamário, HE 600X, podem ser observados uma camada periférica de células mioepiteliais (dispostas continuamente, com citoplasma mais claro e núcleo central) e uma camada mais interna, de células luminiais, de padrão colunar ou cuboidal. Nas figuras aquareladas (Painel B) estrutura de ducto mamário e (Painel D) estrutura de lóbulo mamário, identifica-se a representação das duas camadas celulares, uma mais interna (Luminal) e uma mais externa (mioepitelial)

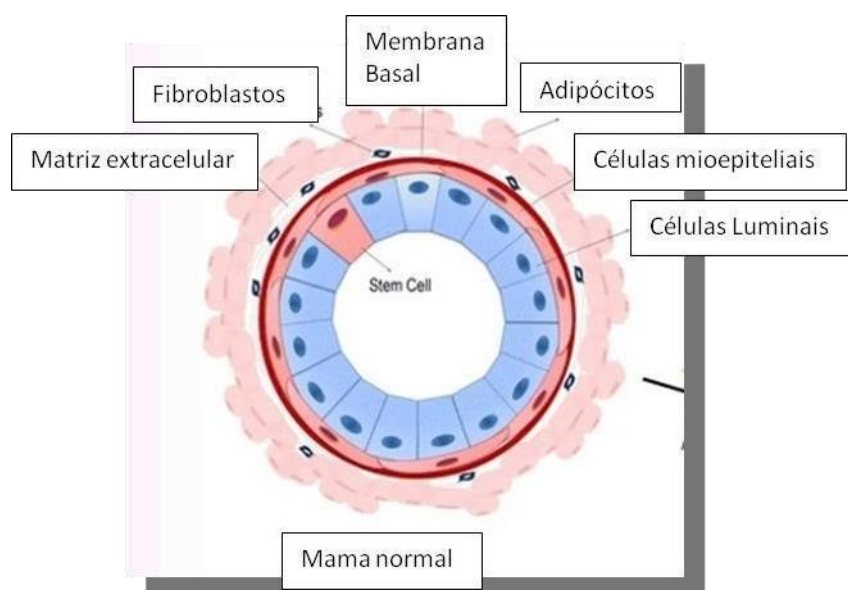
Fonte: o Autor: A e C HE 600X. B e D: Aquarela sobre papel canson, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>.

Além dessas, há um terceiro tipo celular, que está presente de forma dispersa e irregular ao longo da estrutura ducto lobular e expressa CK5 e CK14. Essas células se caracterizam pela ausência de expressão de proteínas, as quais são normalmente expressas nas células epiteliais luminais e mioepiteliais (BOECKER, et al. 2006; SCHMITT et al, 2012). Presume-se que tais células representam as células progenitoras da mama, que são capazes de se diferenciar em células maduras da dupla população ducto-lobular (luminal e mioepitelial) (SCHMITT et al, 2012).

Esse grupo específico de células, ilustrados na Figura 12, tem características de células tronco (*stem cell*), pois apresentam capacidade de auto renovação e de diferenciação entre duas linhagens celulares maduras distintas no parênquima mamário. A importância dessas células no desenvolvimento e na carcinogênese mamária já está estabelecida por alguns autores (BOECKER, et al., 2006; SHACKLETON, et al., 2006; CARIATI AND PURUSHOTHAM, 2008; MORIMOTO, et al. 2009; ZHOU, et al. 2010; SCHMITT, et al, 2012).

O imunofenótipo das células tronco mamárias é caracterizado pela ausência de expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona), pela baixa ou ausente expressão de CD24, expressão de aldeído desidrogenase (ALDH1) e pela alta expressão de CD44 (AL-HAJJ, et al, 2003; ZHOU, et al. 2010)

Figura 12. Representação da célula tronco mamária.



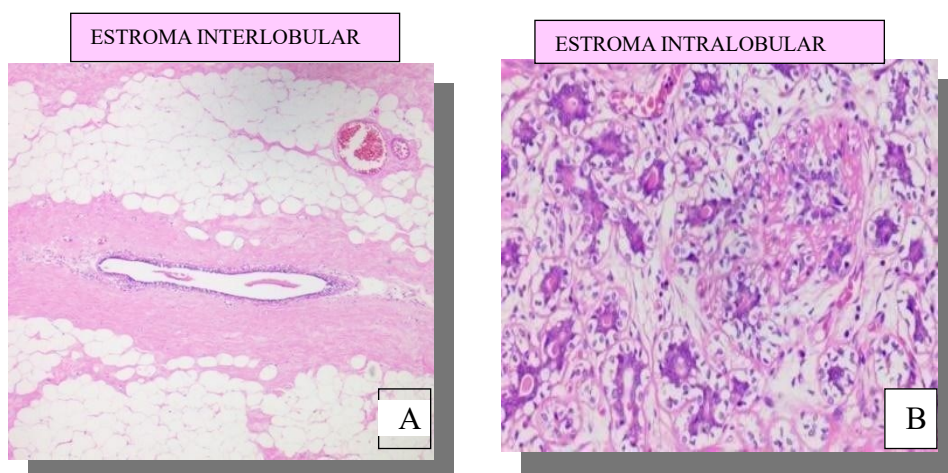
A figura representa o terceiro componente celular dos ductos e lóbulos, disposta entre as células luminais que estão coradas em azul. Fonte: modificado de Schmitt et al, 2012. Adaptado pelo Autor.

#### 2.1.4.6. Componentes Do Estroma Mamário Interlobular E Intralobular

O tecido interlobular é composto por tecido conjuntivo mais denso e por tecido adiposo maduro que permeia o parênquima mamário, e é denominado estroma mamário. O estroma preenche os espaços entre o tecido glândular (ducto-lobular) e o estroma fibroso interlobular (Figura 13 Painel A.). O volume da mama é determinado pela quantidade de tecido adiposo (ROSEN AND OBERMAN, 1993; ROSEN PP, 2009; SCHNITT AND COLLINS, 2018).

O estroma intralobular (Figura 13 Painel B) é um tecido especializado, hormonalmente responsivo, e mais delicado. É constituído por tecido conjuntivo frouxo, com quantidades variáveis de linfócitos, células plasmáticas, macrófagos e mastócitos (SCHNITT AND COLLINS, 2018).

Figura 13. Figura ilustrativa de um corte histológico de ductos e lóbulos.

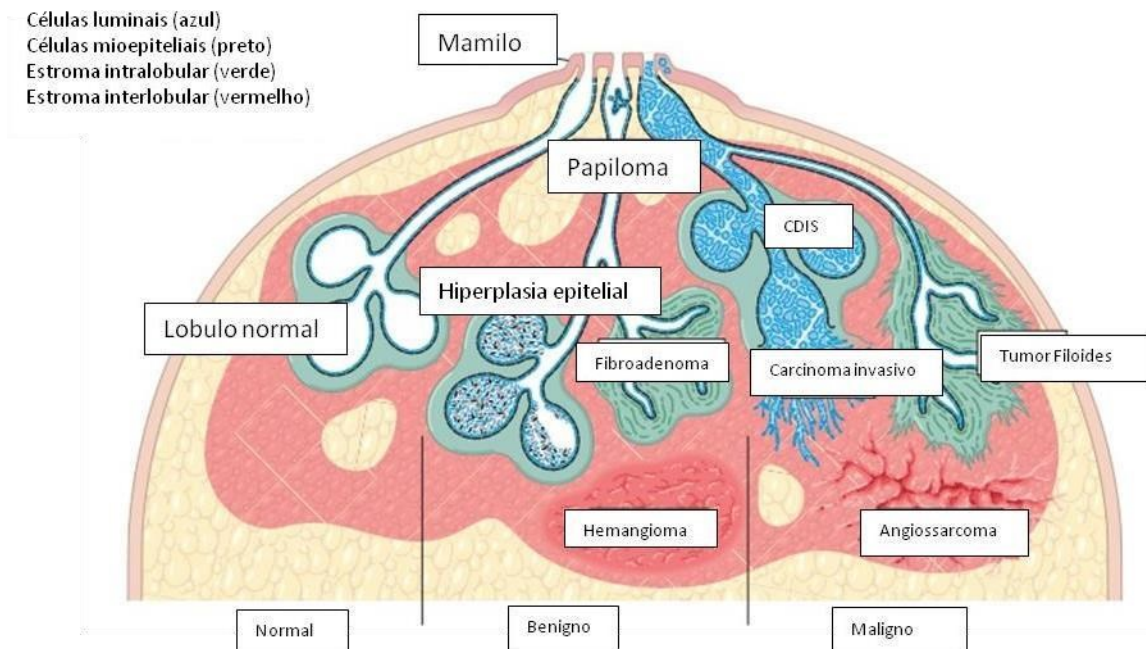


Fotomicrografia mostra em (Painel A) estrutura de ducto mamário em meio a estroma fibroso interlobular e (Painel B) estrutura de lóbulo mamário com estroma intralobular especializado. Fonte: o Autor HE 40X e 400X.

### 2.1.4.7. Relações do Parênquima e Estroma Mamário com Doenças Benignas e Malignas da Mama

As diversas apresentações da doença que comprometam a mama incluem condições inflamatórias, infecciosas, hiperplasias, neoplasias tanto benignas quanto malignas e tumores metastáticos. Na Figura 14 podem-se observar as diversas entidades benignas e malignas que compõem o grupo de doenças que podem comprometer o parênquima ou o estroma mamário. As lesões epiteliais benignas incluem papilomas intraductais e hiperplasia epitelial. As lesões epiteliais malignas são principalmente carcinomas de mama, que podem permanecer “in situ” ou apresentar um padrão invasivo. Além disso, podem-se observar células especializadas do estroma intralobular onde são originados os fibroadenomas e os tumores filóides, e o estroma interlobular que podem dar origem a uma variedade de tumores estromais benignos e malignos raros (WHO, 2019; ROBINS 10 edição).

Figura 14. Desenho esquemático das lesões benignas e malignas com o parênquima mamário.



A imagem representa a origem das lesões da mama, tanto benignas quanto malignas (epiteliais e não epiteliais).  
 Fonte: Robins 10 edição. Adaptado pelo Autor.

## 2.2. CARCINOMA DE MAMA

### 2.2.1. Doença Epitelial Maligna da Mama

O carcinoma invasivo de mama é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invadir o tecido adjacente a partir do rompimento da membrana basal das unidades ducto-lobulares de onde se originaram e ter marcada tendência à metástase a distância (WHO, 2019). A grande maioria destes tumores é derivado das células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário, que são as células cuboidais luminiais secretoras e as células mioepiteliais e/ou basais (BOCKER, et al. 2002; BIRNBAUM, et al. 2004; WHO, 2019).

Os tumores caracterizam-se como neoplasias heterogêneas, com vários subtipos patológicos, diferentes aspectos histológicos, apresentações clínicas diferentes e diversas variações de respostas ao tratamento (PAGE, DL, et al. 1998; VANT VEER, et al., 2002; SORLIE T. 2004; VIEIRA, et al. 2006; WHO, 2019).

### 2.2.2. Epidemiologia do Carcinoma de Mama

O carcinoma de mama é a segunda neoplasia maligna mais comumente diagnosticada em todo o mundo, sem considerar os tumores de pele não melanoma, com incidência de 2,3 milhões de casos no ano de 2020 (WHO, acesso em 05/03/2022).

Estima-se que uma em cada oito mulheres durante o seu tempo de vida possa desenvolver essa neoplasia (JEMAL, et. al., 2011; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013; WHO 2019).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) descrevem que o carcinoma de mama representou 627.000 mortes relacionadas ao câncer no mundo (WHO 2019). No Brasil, o panorama não é diferente, pois segundo os dados do INCA, para o ano de 2020 foram previstos 66.280 casos novos (29.7%), com maior prevalência nas mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste (INCA, acesso em 08/03/2022).

A partir dos 35 anos de idade a incidência tende a crescer progressivamente e conforme as projeções do IBGE espera-se um incremento na parcela da população com maior faixa etária devido à melhora da expectativa de vida no país (IBGE, 2017; INCA, 2021).

### 2.2.3. Fatores de Risco para o Carcinoma de Mama

O carcinoma de mama é uma doença multifatorial. Há diferentes fatores relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença. Os principais são a idade, fatores endócrinos/história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos/hereditários (ADAMI et al., 2008), porém, o fator de risco mais importante está relacionado ao sexo feminino, pois 99% dos casos de carcinoma de mama ocorrem em mulheres (WHO, 2019).

O aumento da idade, a exposição ao estrogênio, a herança genética relacionada a mutações da linha germinativa de alta penetrância e a história familiar com no mínimo um parente de primeiro grau com carcinoma de mama ou ovário (em especial em jovens) ou história de carcinoma de mama masculino, tem peso superior em relação a fatores ambientais ao estilo de vida (ROBBINS, 10 edição). Mulheres acima de 50 anos têm maior risco de desenvolver carcinoma de mama, principalmente pelas alterações biológicas relacionadas a senescência (SILVA AND SILVA, 2005; WHO, 2019).

Os fatores endócrinos e a história reprodutiva estão relacionados principalmente ao estímulo estrogênico aumentado, seja endógeno ou exógeno, pelo aumento do risco relacionado a maior tempo de exposição. Esses fatores incluem: história de menarca precoce (idade da primeira menstruação menor que 12 anos), menopausa tardia (após os 55 anos), primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade, uso de contraceptivos orais (estrogênio- progesterona) e terapia de reposição hormonal pós-menopausa (estrogênio-progesterona) (SILVA E SILVA, 2005; WHO, 2019; IARC, 2021).

Os fatores comportamentais/ambientais já estão bem estabelecidos e incluem a ingestão de bebida alcoólica, sobrepeso, obesidade, inatividade física e exposição à radiação ionizante (INUMARU et al., 2011; ANOTHASINTAWEE et al., 2013; WCRF/AICR, 2018; WHO, 2019; INCA, 2021, IARC, 2021a e b).

O tabagismo é um fator estudado ao longo dos anos com resultados contraditórios. Atualmente está classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como agente carcinogênico com limitada evidência para carcinoma de mama em humanos (IARC, 2021). Essas evidências são sugestivas, mas não conclusivas, de que o tabagismo possivelmente aumenta o risco desse tipo de carcinoma (DROPE et al., 2018; JEMAL et al., 2019).

Outros fatores associados ao desenvolvimento do carcinoma de mama são exposições a determinadas substâncias como agrotóxicos, benzeno e compostos orgânicos

voláteis presentes em diversos tipos de materiais sintéticos ou naturais, além de hormônios e dioxinas (poluentes orgânicos altamente tóxicos ao ambiente e que demoram muitos anos para serem eliminados, oriundos de subprodutos de processos industriais e de combustão) (PESATORI, 2011; RATHOURE, 2018).

Alguns ambientes específicos com campos eletromagnéticos de baixa frequência e campos magnéticos, também podem estar associados. Os profissionais que apresentam risco aumentado de desenvolvimento da doença são os cabeleireiros, operadores de rádio e telefone, enfermeiros e auxiliares de enfermagem, comissários de bordo e trabalhadores noturnos. As atividades econômicas que mais se relacionam ao desenvolvimento da doença são as da indústria da borracha e plástico, química e refinaria de petróleo. O risco de carcinoma de mama devido à radiação ionizante é proporcional à dose e à frequência (ADAMI et al., 2008). Doses altas ou moderadas de radiação ionizante, como as que ocorrem nas mulheres expostas a tratamento de radioterapia no tórax em idade jovem, aumentam o risco de desenvolvimento do carcinoma de mama (ADAMI et al., 2008).

#### *2.2.3.1. Risco Genômico*

Os fatores genéticos/hereditários foram relacionados à presença de mutações em determinados genes. Essas mutações são mais comumente encontradas nos genes BRCA1 e BRCA2, mas também são frequentes em outros genes como: PALB2, CHEK2, BARD1, ATM, RAD51C, RAD51D e TP53 (GARBER et al., 1991; BREAST CANCER ASSOCIATION CONSORTIUM, 2021).

Mulheres que possuem vários casos de carcinoma de mama e/ou pelo menos um caso de carcinoma de ovário em parentes consanguíneos, sobretudo em idade jovem, ou carcinoma de mama em homem parente consanguíneo, podem ter predisposição hereditária e são consideradas de risco elevado para a doença. O carcinoma de mama de caráter hereditário corresponde apenas de 5% a 10% do total de casos (ADAMI et al., 2008).

Embora o câncer seja uma doença multifatorial, com uma forte relação entre fatores genéticos e não genéticos, o acúmulo de numerosas alterações moleculares levam à proliferação celular descontrolada, instabilidade genética e aquisição de fenótipos resistentes e invasivos (SIMON et al., 2003).

As alterações dinâmicas no genoma são os fatores responsáveis pelo desenvolvimento de vários tipos de neoplasias e várias linhas de pesquisa indicam que o processo de tumorigênese em humanos tem múltiplos estágios que remetem a alterações

genéticas, as quais conduzem ao processo de transformação de uma célula normal em uma célula maligna (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; PRAT, 2011; SCHMITT et al., 2012). Recentemente foi apresentada a diversidade genética e biológica tanto celular quanto tecidual patológica de resposta à terapia utilizando poderosas ferramentas e tecnologias experimentais e computacionais que forneceram informações sobre as inúmeras manifestações das doenças que o câncer engloba. O conceito integrador incorporado aos tipos de cancer ajudou a analisar a complexidade e a melhorar o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento e progressão do cancer, com aplicação na prática oncológica (HANAHAN, 2022).

Quando mudanças nas atividades dos genes alcançam o ambiente interno e a vizinhança das células tumorais, a combinação entre os fatores exógenos com variações genéticas inatas do indivíduo constituem a causa para a manifestação tumoral por diferentes fenótipos (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011; SCHMITT et al., 2012).

Indubitavelmente o carcinoma de mama é uma doença complexa com padrões histopatológicos diversos, desfechos clínicos diferentes e variações de respostas ao tratamento (SORLIE T, 2004; MATOS, 2005). E o objetivo no campo oncogenômico é tentar responder questões clinicamente relevantes, como: quais tumores permanecerão inativos, quais pacientes necessitarão, ou não, de terapias sistêmicas e quais drogas deverão ser utilizadas (SORLIE T, 2004; SORLIE T, 2016).

Das lesões precursoras e o risco para carcinoma de mama estudos preliminares de acompanhamento indicaram a associação entre lesões intraductais proliferativas com diferentes níveis de risco para o desenvolvimento do carcinoma de mama invasivo. Os níveis de risco variam de aproximadamente 1,5 vezes mais na Hiperplasia Ductal Usual (HDU), 4 a 5 vezes mais na Hiperplasia Ductal Atípica (HDA) e 8 a 10 vezes para o Carcinoma Ductal “in situ” (CDIS) do que na população sem as lesões (FITZGIBBONS, et al., 1998).

Estudos por imunofenotipagem e em genética molecular forneceram novo espectro das lesões, que inicialmente foram descritas como uma progressão linear muito simplista entre o epitélio normal para a hiperplasia com evolução de HDA/CDIS para CDI. Nestes estudos relatase que a inter-relação entre as lesões proliferativas intraductais e o CDI é muito mais complexa (WHO, 2019).

A HDU não apresenta um fator de risco substancial para o carcinoma invasivo da mama, e possivelmente trata-se de uma improvável representação de lesão precursora. Pois, no conhecimento atual, esta entidade apresenta poucas semelhanças com a maioria dos



casos de HDA, CDIS e CDI (WHO, 2019). Apesar disso, alguns dados genômicos sugerem que uma pequena proporção de HDU possa abrigar populações clonais de células, indicando que lesões clonais como o HDA podem ocasionalmente surgir a partir desta entidade (GONG, et al., 2001; KHOURY, et al., 2014; WHO, 2019).

Também se observou que a HDA compartilha muitas semelhanças com o CDIS de baixo grau; e que o CDIS de baixo grau e CDIS de alto grau, na maioria dos casos, representam doenças geneticamente distintas produzindo formas distintas de carcinoma invasivo da mama (WHO, 2019).

Ainda dentro deste novo panorama de correlações entre as lesões intraductais, a atipia epitelial plana (AEP) está categorizada como uma lesão clonal de natureza neoplásica, com características morfológicas, imunohistoquímicas e moleculares compartilhadas com a HDA e com o CDIS. Apesar de alguns estudos epidemiológicos sugerirem que lesão de células colunares (LCC) e AEP estão associados a um risco muito baixo de progressão para IBC (BOULOS, et al., 2008; ARONER, et al., 2010; SAID, et al., 2015), há descrição de associação entre LCC e AEP e a evolução para HDA e CDIS baixo grau (SIMPSON, et al., 2005).

Estes dados são embasados na característica genética das lesões de baixo grau (HDA e CDIS baixo grau), que apresentam perda do 16q. Essa é a alteração recorrente detectada com mais frequência na LCC e na AEP, o que mostra um grau de sobreposição no perfil molecular destas entidades histológicas aparentemente distintas (SIMPSON, et al., 2005; MOINFAR, et al., 2000).

Outro fator importante envolve a metilação do promotor e alteração do número de cópias de genes relacionados ao carcinoma de mama, que incluem CCND1, ESR1 e CDH1. Esses genes foram identificados nas LCC, o que forneceu evidências para embasar o potencial papel na carcinogênese da mama (SIMPSON, et al., 2005; DABBS, et al., 2006; VERSCHUUR-MAES, et al., 2012; VERSCHUUR-MAES, et al., 2014). Além disso, estudos pioneiros identificaram alterações genéticas nos tecidos mamários normais (Deng, et al., 1996; LAKHANY, et al., 1999). Essas alterações foram observadas tanto nas células luminiais, quanto nas mioepiteliais de forma independente (LAKHANY, et al., 1999), sugerindo que tais mudanças podem ter ocorrido no início do desenvolvimento do carcinoma de mama.

Alterações genéticas no estroma mamário de pacientes com malignidade também foram descritos, com atual interesse na compreensão da relação do estroma e de sua resposta

inflamatória com o epitélio na tumorigênese e a progressão do carcinoma de mama (MOINFAR, et al., 2000; MA, et al., 2009).

O significado das alterações nos tecidos normais da mama não está claro no momento, mas investigações futuras da possível relação entre o desenvolvimento do carcinoma e seu potencial preventivo pode ser uma estratégia no futuro (WHO, 2019).

#### 2.2.3.2. *Recomendações para Acompanhamento de Paciente de Risco*

Fatores de risco para carcinoma de mama são múltiplos e podem variar em uma escala de risco relativo. Assim a depender das condições abaixo relacionadas de (a) a (e) de acordo com: [bcrisktool.cancer.gov/](http://bcrisktool.cancer.gov/) e <http://www.ems-trials.org/riskevaluator>:

- (1.a) Pacientes com mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2 ou com parentes de primeiro grau com uma mutação comprovada,
- (1.b) Pacientes com risco  $\geq 20\%$  calculado segundo um dos modelos matemáticos\*\* baseados na história da família,
- (1.c) Pacientes com história de irradiação torácica entre 10 e 30 anos de idade,
- (1.d) Pacientes com diagnóstico de síndromes genéticas que aumentam o risco de carcinoma de mama, como a síndrome de Li-Fraumeni e a síndrome de Cowden, ou com familiares de primeiro grau com essas doenças,
- (1.e) Pacientes com história pessoal de hiperplasia lobular atípica, carcinoma lobular “in situ”, hiperplasia ductal atípica, carcinoma ductal “in situ” ou carcinoma invasivo de mama.

\*\*O início do rastreio vai depender de cada situação individual de cada paciente de acordo com as correlações de (1.a) a (1.e):

- (2.a) Rastreio a partir dos 25-30 anos,
- (2.b) Rastreio dez anos antes da idade em que o parente mais jovem foi diagnosticado,
- (2.c) Rastreio a partir do oitavo ano após a radioterapia,
- (2.d) Rastreio a partir do diagnóstico,
- (2.e) Rastreio a partir do diagnóstico.

Abaixo, seguem os exames indicados para os pacientes de alto risco:

- (3.a) Realização de exame de mamografia anual a partir dos 30 anos e ressonância magnética (RM) anual a partir dos 25 anos,
- (3.b, 3.c, 3.d) Realização de mamografia e RM anuais. Não é recomendado que a mamografia seja feita antes dos 30 anos ou a RM antes dos 25 anos de idade,
- (3.e) Realização de mamografia e RM anuais.

\*Em todas as situações, realizar ultrassonografia de mamas somente se a RM não puder ser feita, por qualquer razão

\*\*Existem diferentes modelos matemáticos para cálculo de risco, como os de Gail, Tyrer-Cuzick, BRCAPRO, BOADICEA, entre outros, sendo alguns mais específicos para pacientes que apresentam condições clínicas. Mais informações estão disponíveis em: <https://bcrisktool.carcinoma.gov/> e <http://www.ems-trials.org/riskevaluator/>.

#### **2.2.4. Diagnóstico do Carcinoma de Mama**

O diagnóstico do CDI deve estar ancorado em um tripé determinado pelo exame clínico, exame de imagem e análise histopatológica (INCA acesso em 16/02/2022). A sensibilidade da associação pode chegar a 99.6% e a especificidade a 93%, fornecendo um diagnóstico definitivo e, quando possível, possibilitando o tratamento rápido de casos malignos (ELLIS, et al., 1991; LAYFIELD AND LESTER, 1995).

##### *2.2.4.1. Característica Clínicas*

Há dois grupos de pacientes que podem ser diagnosticadas com carcinoma de mama. O primeiro grupo é o de mulheres que não fazem parte do rastreio mamográfico, que é constituído por mulheres com idade inferior a 50 anos, e o grupo de mulheres com 70 anos ou mais. O segundo grupo, seleciona mulheres com idade entre 50 e 69 anos, e é constituído pela população de mulheres de rastreio mamográfico, de acordo com a OMS (WHO, 2019). A Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia adotou as recomendações do Instituto Nacional do Câncer e do Ministério da Saúde, que orientam a realização de mamografia a cada dois anos por mulheres entre 50 e 69 anos, mas não abaixo dos 50 anos porque alegam que os danos da exposição a radiação superam os possíveis benefícios (INCA, 2020).

Cerca de 90% dos carcinomas de mama tem apresentação unifocal e a localização mais frequente é no quadrante superior externo (QSE), mas podem surgir em qualquer quadrante da mama (BRIGHT, et al., 2016). Em 2% das pacientes, pode ser diagnosticado um tumor sincrônico na mama contralateral e em 0,1% das pacientes com carcinoma de mama, a presença de metástase axilar pode ser identificada, com sítio primário oculto na mama (WALKER, et al., 2010).

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO NÃO RASTREADA

A população não rastreada (grupo de mulheres com idade abaixo de 50 anos e acima de 70 anos) com CDI, apresenta como sinal clínico mais comum nódulo ou massa palpável. O aumento do parênquima, por nódulo ou massa, incluem sinais visuais como alterações cutâneas, projeções exofíticas (Figura 15 Painel A e 15 Painel.B), retração de pele, inversão de mamilo, descarga mamilar ou alterações de tamanho, formato, cor e textura da pele da mama. Nos casos extremos, pode haver ulceração da pele (Figura 15 Painel C) ou eritema difuso de 1/3 ou mais da pele da mama, característico do tipo clínico mais agressivo de CDI, chamado “Carcinoma Inflamatório” (Figura 15 Painel D) (WHO, 2019).

Figura 15. Imagem de exame físico e inspeção das mamas na população não rastreada.



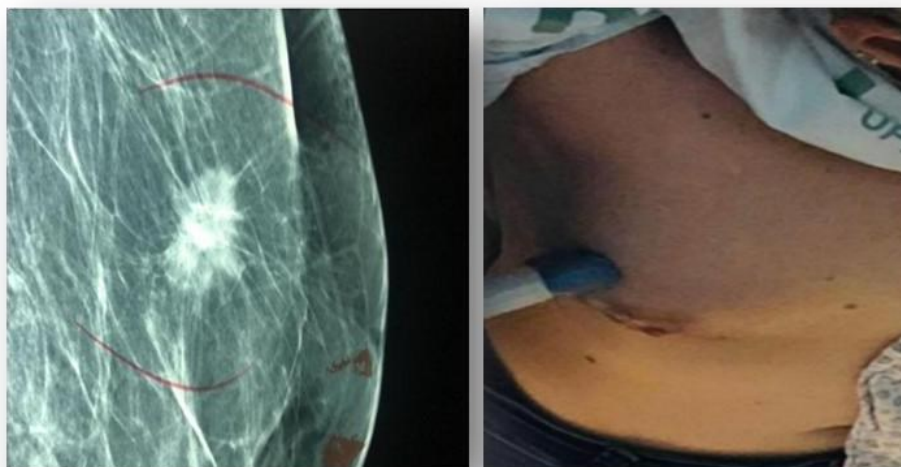
Apresenta a inspeção durante o exame físico da mama, de duas pacientes da população não rastreada. A figura A e B representa mulher com idade acima de 70 anos, com massa protusa no quadrante inferior interno da mama direita (QII MD), associada a distorção e retração cutânea. A Figura C apresentação de comprometimento cutâneo com ulceração, no mesmo grupo idade da Figura A. Na Figura D, representa paciente do grupo idade inferior a 50 anos, com comprometimento de toda a mama por massa que ocupa os quatro quadrantes da mama direita, apresentando alterações de tamanho, formato, cor e textura da pele da mama, com eritema difuso de toda a mama, com diagnóstico clínico de “Carcinoma Inflamatório”.

Fonte: o Autor

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO DE RASTREIO

Na população de rastreio (idade entre 50 e 69 anos) a aparência clássica do carcinoma de mama é o nódulo espiculado ao exame mamográfico (Figura 16 Painel A). Entretanto nódulos circunscritos, áreas de distorção arquitetural, calcificação isolada ou assimetria podem ser identificados (WHO, 2019).

Figura 16. Imagem de exame físico e injeção das mamas na população de rastreio.



Painel A. apresenta nódulo espiculado na mamografia, e na imagem B exame de USG de paciente da população rastreada, que não apresenta alterações ao exame físico na inspeção mamária. O Painel A e Painel B representam mulheres com idade entre 50 e 69 anos. Fonte: o Autor

### 2.2.4.2. Características Radiológicas

A detecção precoce do carcinoma de mama é um fator importante na taxa da mortalidade da doença (TABÁR, et al, 1995; WHO 2019). Discussões sobre o rastreamento para carcinoma de mama demonstraram que a redução na mortalidade pode chegar a 20% em um programa de 20 anos de screening (MARMOT, et al., 2012). Programas efetivos de rastreamento, com cobertura da população-alvo, com exames de qualidade e tratamento adequado, podem reduzir a mortalidade por carcinoma de mama (INCA, 2021).

O exame de escolha para rastreamento das mulheres com risco populacional usual é a mamografia, por ser o único método de rastreio associado com diminuição da mortalidade pelo carcinoma, e sua indicação para a avaliação da população geral está bem documentada (LEE, et al, 2010; URBAN, et al 2012; INCA, 2021).

De acordo com dados do INCA, em 2022 houve estimativa de 29,7% de casos novos de câncer de mama no sexo feminino, que estão associadas a alta taxa de mortalidade no país.

Para reduzir esses números, a estratégia permanece sendo o diagnóstico precoce. E para realizar o diagnóstico precoce, são necessárias medidas aplicáveis a população visando rastreamento de nódulos pequenos em mulheres assintomáticas, com o objetivo principal de diminuir a mortalidade pela doença (FLEURY, 2021; INCA, acesso em 08/03/2022).

A ultrassonografia (US) e a ressonância magnética (RM) são capazes de detectar pequenas lesões de mama assintomáticas, muitas vezes ocultas na mamografia. Contudo, por não haver estudos que mostrem que esses métodos se associam com a redução da mortalidade pelo carcinoma de mama, tais exames estão especialmente indicados nos subgrupos de mulheres consideradas como população de alto risco (URBAN, et al 2012). O exame de ultrasson pode ser adicionado a investigação de nódulos mamários para melhorar a sensibilidade no diagnóstico de mulheres com mama mamograficamente densa, e é o método de escolha para mulheres com idade menor que 40 anos. A combinação entre US e Mamografia apresenta baixataxa de falso negativo, que varia de 0% a 3% (MOY, et al., 2002;SOO, et al., 2001).

A RM é o método mais sensível para detecção do carcinoma de mama, mas não o mais específico. A recomendação deste método é para uso combinado e no rastreio de mulheres que apresentam risco muito alto para desenvolver o carcinoma da mama, tais como as pacientes com mutação de genes BRCA1 e BRCA2 (URBAN, et al., 2012).

Evidências no impacto e no custo efetivo do rastreamento nas taxas de mortalidades pelo carcinoma de mama justificam a adoção da mamografia como política de saúde pública, tal como recomendado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2019).

Um importante avanço ocorreu com a criação de uma ferramenta que uniformiza interpretação radiológica de lesões da mama.

A categoria “*Breast Imaging Reporting and Data System*” também conhecida como BI-RADS®, criada em 1993 pelo Colégio Americano de Radiologia, é uma ferramenta essencial para comunicação entre clínicos, radiologistas, patologistas e cirurgiões (MILANI, et al., 2007). O sistema constitui o preditor mais poderoso de carcinoma de mama, sendo ferramenta essencial para manejo das pacientes (FRANKEL et al, 2011). Há muito tempo descreve-se que a clareza na comunicação e o treinamento com esse sistema pode diminuir erros em amostragemna biópsia e diminuir a detecção tardia do câncer (MILANI et al, 2007; FEBRASGO, acesso em fevereiro de 2022).

O diagnóstico por imagem, um dos tripés para o diagnóstico do carcinoma de mama é uma ferramenta de screening, e a associação com as categorias BI-RADS®, permitiu

comparar a incidência da doença entre diferentes populações, contribuindo significativamente para programas de prevenção e planejamento de recursos (PRADO AND GUERRA, 2010)

A classificação das mamografias segundo o BI-RADS®, varia de 0 a 6, sendo avaliada conforme Tabela 1 (FEBRASGO, acesso em fevereiro de 2022; BURNSIDE, et al., 2009).

Tabela 1. Tabela de categoria BI-RADS®, interpretação, risco de malignidade e conduta.

<b>Categoria</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Risco de malignidade</b>	<b>Conduta</b>
0	Exame incompleto	Não avaliável	Reconvocação e exame adicionais e/ou comparação com exames anteriores
I	Exame normal	0%	Controle anual
II	Achados benignos	0%	Controle anual
III	Provavelmente benigno	> 0% mas $\leq$ 2%	Seguimento a curto prazo, até 6 meses ou acompanhamento individualizado
IV a	Suspeito leve	> 2% a $\leq$ 10 %	Biópsia
IV b	Suspeito moderado	> 10% a $\leq$ 50%	Biópsia
IV c	Suspeito forte	> 50% a < 95%	Biópsia
V	Altamente suspeito	$\geq$ 95%	Biópsia
VI	CDI diagnosticado	Não avaliável	Excisão se clinicamente indicado

Tabela adaptada do ACR BI-RADS®® Fonte: ATLAS — Concordancia entre BI-RADS®, recomendações acesso a categoria e manejo / [www.acr.org](http://www.acr.org).

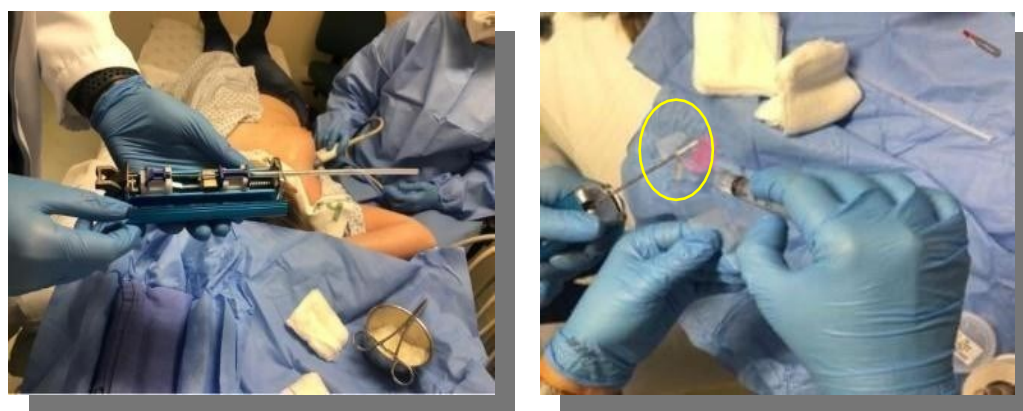
### 2.2.4.3. Características da Amostra Histopatológica

A punção aspirativa da mama é recomendada nas mamografias com BI-RADS® 4 e 5, engloba duas técnicas minimamente invasivas, a punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e a punção por Agulha Gorssa (PAG ou do inglês “Core-Needle Biopsy”) KOCAAY, et al, 2016).

A PAAF da mama é um método diagnóstico minimamente invasivo, que comumente evita a biópsia aberta e é utilizada na avaliação citológica. Na PAG são obtidos fragmentos para a avaliação histopatológica que detecta morfológicamente o CDI e possibilita a realização de testes complementares como a imuno-histoquímica (TSE, et al., 2010; GONCALVES, et al., 2011; WILLEMS, et al., 2012; KOCAAY, et al., 2016).

Na PAG a agulha está acoplada a um dispositivo (Figura 17 Painel A) que permite a retirada de pequenos cilindros de tecido (Figura 17 Painel B), porém pode causar desconforto e maior probabilidade de hematoma (LAYFIELD, 1995; SINGHAL, 2013). Por outro lado, tem maior sensibilidade que a PAAF (sensibilidade PAG é melhor do que a da PAAF 87% (95% CI, 84%-88%, I2 = 88,5%) versus 74% (95% CI, 72%-77%, I2 = 88,3%) e a especificidade do PAG é semelhante à da PAAF, 98% (IC 95%, 96%-99%, I2 = 76,2%) versus 96% (IC 95%, 94%-98%, I2 = 39,0%) estando associada a menor índice de amostras insatisfatórias (TSE, et al, 2010; WILLEMS, et al, 2012; WANG, et al, 2017).

Figura 17. Imagem de preparo do dispositivo com agulha para coleta de material por core biópsia.



(Painel A) Agulha acoplada ao dispositivo para PAG. Painel B mostra fragmentos cilíndricos de tecido provenientes da biópsia do nódulo de mama.

Fonte: o Autor.

### 2.2.5. Classificação Histopatológica do Carcinoma de Mama

A classificação histopatológica do carcinoma de mama estratifica os tumores baseados no grau tumoral (AJCC, 2018), no estágio (TNM) e no tipo histológico (WHO, 2019). Entretanto, mesmo correlacionando com a sobrevida global, esta classificação tem pobre valor preditivo, pois tumores com grau histológico e estádios idênticos podem ter desfechos contrastantes (CALLAGY, 2003, WHO, 2019) com diferentes respostas terapêuticas e diferentes prognósticos (DUFLOTH RM, 2004, SORLIE T, 2016).

O exame anatomo-patológico é o ponto de partida para o estudo molecular, pois, por meio do material recebido, pode-se determinar o perfil de expressão proteica e o retrato imunofenotípico dos tumores de mama (VIEIRA, et al., 2008; SORLIE T, 2004).



### *2.2.5.1. Tamanho*

A avaliação do tamanho do componente invasivo do carcinoma da mama tem um importante papel na avaliação do valor prognóstico. Embora a medida macroscópica possa ser realizada, a medida microscópica é preferível, pois é capaz de distinguir áreas de fibrose e componentes não invasivos do componente invaso do CDI. Na avaliação TNM, a categoria patológica (pT) tem mais acurácia que a clínica (cT). O estabelecimento da avaliação do volume tumoral é fundamental para o estadiamento das pacientes (AJCC, 2018).

### *2.2.5.2. Graduação Histológica*

A graduação histológica Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis, também conhecida como Sistema de Classificação de Nottingham (ELSTON AND ELLIS, 1991), é o sistema de gradação recomendado para todos os CDI pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2019) e pelo Colégio Americano de Patologista (AJCC, 2018). A relevância prognóstica foi demonstrada em 1991 (ELSTON AND ELLIS, 1991), e as correlações foram descritas pelo nosso grupo em um estudo posterior (VIEIRA et al., 2021, 1).

Para avaliar graduação histológica pelo Sistema de Classificação de Nottingham ou também denominado grau histológico combinado de Nottingham para carcinoma invasivo de mama aplica-se um sistema de pontuação numérica de 1 a 3 para determinar escores de formação tubular, grau nuclear e contagem mitótica, cujo somatório final pode resultar valores entre 3 e 9 pontos. A graduação final é apresentada em graus de diferenciação (Grau 1: bem diferenciado quando a soma dos escores for entre 3 a 5 pontos; Grau 2: moderadamente diferenciado quando a soma dos escores for entre 6 e 7 pontos e Grau 3: pouco diferenciado quando a soma dos escores for 8 e 9 pontos) (Tabela 2) (ELSTON AND ELLIS, 1991).

Tabela 2. Sistema de Classificação de Nottingham

<b>Diferenciação tubular</b>		
Grau 1	Grau 2	Grau 3
<b>Grau nuclear</b>		
Grau 1	Grau 2	Grau 3
<b>Índice mitótico</b>		
Grau 1	Grau 2	Grau 3

Apresentação da graduação histológica do tumor de mama, que leva em conta: Diferenciação tubular com a formação de túbulos proporcional a: Grau 1: >que 75%, Grau 2: entre 10 a 75% e Grau 3: menos que 10 %; Grau nuclear: pleomorfismo nuclear, com em relação complexidade nuclear pela morfologia de tamanho, cromatina, vesiculação e nucléolos, e o índice mitótico, com a contagem de mitoses bem definidas em 10 campos de grande aumento (ELSTON and ELLIS, 1991).

## 2.2.6. Exame Imunohistoquímico

A avaliação imuno-histoquímica (IHQ) possibilita investigar a presença de expressão de proteínas por meio de reações entre antígeno e anticorpo (Vuong, et al., 2014). É possível subclassificar os imunofenótipos do carcinoma de mama por IHQ utilizando biomarcadores tumorais através da expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e do marcador de proliferação Ki67 (Gobbi H, 2012; GOLDBIRSCHE et al., 2013; WHO, 2019). A avaliação da presença ou ausência desses marcadores é fundamental para definir a classificação tumoral e avaliar os preditores de resposta e prognóstico da doença. Pelo consenso Internacional de St. Gallen, os tumores podem ser definidos em quatro subtipos: Luminal A - like, Luminal B like, Superexpressor de HER2 e Triplo Negativo (TNBC) (CURIGLIANO, et al., 2018).

### 2.2.6.1. Receptores Hormonais (RH)

São proteínas que se ligam aos hormônios circulantes, e mediam os seus efeitos celulares (ROSEN, 1997). Os receptores hormonais (RH) mais estudados no carcinoma de mama são os RE e RP (ROSEN, 1997; GOLDBIRSCHE et al., 2013; SHEFFIELD, 2016; YAO et al., 2017; WHO, 2019).

A análise do RE deve ser realizada em todos os tumores primários da mama, preferencialmente por IHQ, por ser um fator prognóstico e preditivo importante, com benefício ao tratamento adjuvante (PAIK et al., 2004; PRAT AND PEROU, 2010; AMIM et al., 2017; WHO, 2019). Tumores com RE positivo, sofrem inibição do seu crescimento com uso de terapias antiestrogênicas (PAYNE et al., 2008).

O status do RP tem maior associação com a sobrevida global, em contrapartida os casos com baixa expressão estão relacionados com piores prognósticos (JIANG, et al., 2012, REGAN et al, 2016; WHO,2019).

Os critérios IHC para o status dos RH (tanto RE quanto RP) consideram imunomarcações positivas se pelo menos 1% dos núcleos das células tumorais expressarem a imunomarcação (AMIN, et al., 2017);

#### 2.2.6.2. *HER2*

O gene HER2 está localizado no cromossomo 17q21, é homólogo, porém distinto do receptor do fator do crescimento epidérmico (EGFR), e, é codificado por uma proteína transmembrana que possui atividade tirosina-kinase intracelular (SLAMON, et al., 1987; CARR, et al., 2000; TANNER, et al., 2001; RIOU, et al., 2001; YAMAUCHI, et al., 2001; VOGEL, et al., 2002). A amplificação e a superexpressão do HER2 ocorrem em 20 a 30 % dos tumores de mama, e esta associada a tumores de pior prognóstico (OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004; FOULKES et al., 2010; NG et al., 2015; WOLFF AC et al., 2018; WHO 2019). A amplificação do gene é usada como fator preditivo e prognóstico de resposta a terapia alvo trastuzumabe (SHAK, 1999; PRAT AND PEROU, 2010; AMIM et al., 2017; WHO, 2019).

Para considerar amplificação da oncoproteína para o status HER2+, pelo menos 10% das células tumorais devem apresentar um escore de coloração da membrana celular de 3+ (forte e contínua). Se a marcação fraco/moderado for > 10% consideram-se os resultados indeterminados (2+) ou negativo sem esses critérios (AMIN, et al., 2017; WOLFF, et al., 2018; WHO, 2019).

### 2.2.6.3. Ki67

O antígeno Ki67 é uma proteína nuclear associada à transcrição do RNA ribossomal (BULLWINKEL, et al., 2006). Essa proteína está presente em todas as fases ativas do ciclo celular e é um marcador de proliferação celular (YERUSHALMI, et al., 2010). Descrito em 1983 por GERDES, et al., 1984, tem sido amplamente utilizado em reações de IHC com valor prognóstico reconhecido para diferentes tipos de carcinoma.

No carcinoma de mama é um marcador preditivo e prognóstico (GERDES, et al., 1983; DOMAGALA, et al., 1996; TRIHIA, et al., 2003; VIALE, et al., 2008; ALESKANDARANY, et al., 2010; MUFTAH, et al., 2017). Particularmente nos tumores em que mais de 15% das células expressam essa proteína, considera-se valor de alto índice proliferativo, e o caso é associado ao comportamento biológico de tumores de pior prognóstico (BROWN, et al., 2014; JUHASZ-BÖSS, et al., 2014; SOLIMAN, et al., 2016).

Na prática clínica, os pacientes com carcinoma de mama podem ser estratificados em dois grupos de risco (alto e baixo) com base nesse antígeno (GOLDHIRSCH, et al., 2013). No entanto, não existe um consenso universal, tanto clínico quanto de pesquisa, sobre o ponto de corte ideal para analisar essa proteína e a sua associação com fatores prognósticos e preditivos para cada grupo (CHEANG, et al., 2009; AHN, et al., 2015; SOLIMAN, et al., 2016).

Em contrapartida, muitos grupos têm trabalhado para garantir a uniformidade nesta avaliação (GOLDHIRSCH, et al., 2013; BRAUN, et al., 2013; BROWN, et al., 2014; NIELSEN, et al., 2021). Recentemente nosso grupo investigou a expressão de Ki67 em células neoplásicas de mama por CF e avaliou a concordância entre os exames de IHQ e CF, provando que a CF é um método promissor na determinação do índice proliferativo em pacientes com carcinoma de mama, com concordância perfeita entre os testes estatísticos (VIEIRA, et al., 2021, 2).

Para avaliar o índice de proliferação celular pelo Ki-67 por IHQ consideram-se dois pontos de corte: i) baixo índice se expressão nuclear quando menos de 15% das células neoplásicas expressam imunomarcagem; ii) alto índice se expressão nuclear quando 15% ou mais expressam a imunomarcagem (CHEANG, et al., 2009; SOLIMAN and YUSSIF, 2016; AMIN, et al., 2017; WHO, 2019).

## OUTRAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO CARCINOMA DE MAMA

### 2.2.6.4. *E-Caderina*

As caderinas são uma superfamília de moléculas de adesão dependentes de cálcio, e tem um importante papel na determinação do fenótipo epitelial, na migração e na diferenciação celular e na disseminação tumoral (PAREDES, et al., 2002). As duas caderinas clássicas, E- (epitelial) e P-(placentária), encontram-se preferencialmente localizadas nas junções intercelulares, são do tipo aderente e têm uma estrutura básica comum, todavia com diferentes pesos moleculares, especificidade de ligação e distribuição tecidual (PAREDES, et al., 2002). Na mama, a P-caderina é expressa nas células mioepiteliais e nas cap cells, putativas células-tronco da glândula mamária, enquanto que a E-caderina é expressa nas células mioepiteliais/basais e nas luminais (PAREDES, et al., 2002, LEMOS, et al., 2019).

Estudos prévios sugeriram identificaram a expressão de P-caderina num grupo de carcinomas de mama predominantemente de alto grau (GIII), receptor de estrógeno negativo, com níveis de proliferação mais elevados e com um comportamento mais agressivo (PAREDES, et al., 2002; ORLANDINI, et al., 2018).

### 2.2.6.5. *Citoqueratinas (CK)*

As citoqueratinas (CK) foram amplamente descritas como ferramentas de diagnóstico nos tumores de mama (PUJOL et al., 1993; WEBER, 1994; COULOMBE AND OMARY, 2002; CHU; WEISS, 2002; ALIX-PANABIÈRES et al., 2009; OHI et al., 2012; NABAIS et al., 2017). Trata-se de uma família multigênica, subdividida em peptídeos ácidos tipo I (CK 9 - CK20) e básico tipo II (CK1- CK8), é considerado o maior subgrupo de proteínas de filamento intermediário (FUCHS; WEBER, 1994). As células epiteliais normais secretam pelo menos um tipo da CK ácida e um tipo da básica (ALIX-PANABIÈRES et al., 2009). Essas proteínas formam o citoesqueleto das células epiteliais e têm como função principal a manutenção da integridade dessas células, na sinalização celular, nas respostas ao estresse e apoptose (COULOMBE AND OMARY, 2002).

Entre as citoqueratinas descritas, a CK19 é expressa em epitélios simples, estratificados e em alguns tumores, como no carcinoma de mama (CHU; WEISS, 2002). Essa proteína é clivada pela caspase 3, e os fragmentos solúveis são liberados e detectados no sangue periférico de pacientes com carcinomas (PUJOL et al., 1993). Nos tumores de mama

seu estudo é relevante, pois se relaciona com a progressão metastática, e é descrita como um marcador utilizado na detecção de células disseminadas em linfonodos ou em órgãos a distância, em pacientes clinicamente livres de metástase (cM0), porém com detecção de células por meio de estudos de expressão proteica (pM1) (OHI et al., 2012).

#### 2.2.6.6. *CK19*

Classicamente, a expressão de CK19 já está estabelecida como o marcador mais comum para revelar células neoplásicas disseminadas na medula óssea de pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama, e a sua expressão está associada a prognósticos desfavoráveis (PANTEL et al., 2008). Consequentemente, a sua positividade pode ser um indicador de comportamento agressivo das células do carcinoma de mama disseminado (ALIX-PANABIÈRES et al., 2009). Existem evidências da relação entre o fenótipo de células tronco do carcinoma de mama com o subtipo TNBC e o aumento da frequência de expressão da CK19 nesses tumores (RAKHA; ELLIS, 2009). Há indícios que células tumorais que expressam CK19 podem ser relacionadas a um possível subgrupo de carcinoma da mama (PAREDES et al., 2005). Tumores de comportamento biológico mais agressivo apresentam uma relação entre a detecção de determinadas proteínas, como as Citoqueratinas 19 (CK19) (ALIX-PANABIÈRES et al., 2009; NABAIS et al., 2017) e o ligante da morte programada 1 (PD-L1) (MUENST et al., 2014; WU et al., 2015; QIN et al., 2015; LI et al., 2016), sendo possível detectar estes potenciais biomarcadores por IHQ (SOUSA, et al., 2010).

#### **2.2.7. Marcadores Prognósticos e Preditivos do Carcinoma de Mama**

Fatores de prognóstico são determinados pelas características clínicas das pacientes e pelos aspectos patológicos/biológicos dos tumores, que permitem prever a evolução clínica da doença ou a sobrevivência da paciente no momento do diagnóstico inicial, por outro lado, os fatores preditivos são as características clínicas, patológicas e biológicas utilizadas para estimar a probabilidade de resposta do tumor a um tipo específico de terapia adjuvante (CLARK GM, 1996; PHAROAH, et al., 1997; FITZGIBBONS et al., 2000).

Na Tabela 3 descreve-se a relação dos fatores prognósticos e seus respectivos níveis de evidência. Os fatores preditivos e prognósticos norteiam as decisões terapêuticas das mulheres com CDI. Alguns fatores têm dupla função, tanto prognóstico quanto preditivo na determinação de terapias específicas para o tratamento do carcinoma de mama (BUITRAGO, et al., 2011).

Tabela 3. Fatores Prognósticos em carcinoma de mama –nível de evidência AJCC

<b>Nível de evidência 1</b>	<p><b>EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ESTRÓGENO</b>  <b>EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE PROGESTERONA</b>  <b>EXPRESSÃO DA ONCOPROTEINA HER-2</b>  <b>GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DE NOTTINGHAM</b>  <b>ONCOTYPE DX®</b></p>
<b>Nível de evidência 2</b>	<p>CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E MÉTODOS DE DETECÇÃO  CÉLULAS TUMORAIS DISSEMINADAS E MÉTODOS DE DETECÇÃO  PESQUISA DO KI67  SCORE DE ASSINATURA MULTIGENICA (RE, RP, HER2, KI67)  MAMAPRINT® teste genômico  PAM50 (PROSIGNA)  BREAST CANCER INDEX: categorias de alto e baixo risco  ENDOPREDICT: medida de score de alto e baixo risco</p>

Tabela de nível de evidência: No nível de evidência 1, as evidências são provenientes de revisão sistemática ou metanálise de todos relevantes ensaios clínicos randomizados controlados ou oriundas de diretrizes clínicas baseadas em revisões sistemáticas de ensaios clínicos randomizados controlados; nível de evidência 2, evidências derivadas de pelo menos um ensaio clínico randomizado controlado bem delineado (MELNYK AND FINEOUT-OVERHOLT, 2005). Fonte AJCC, 8 edição.

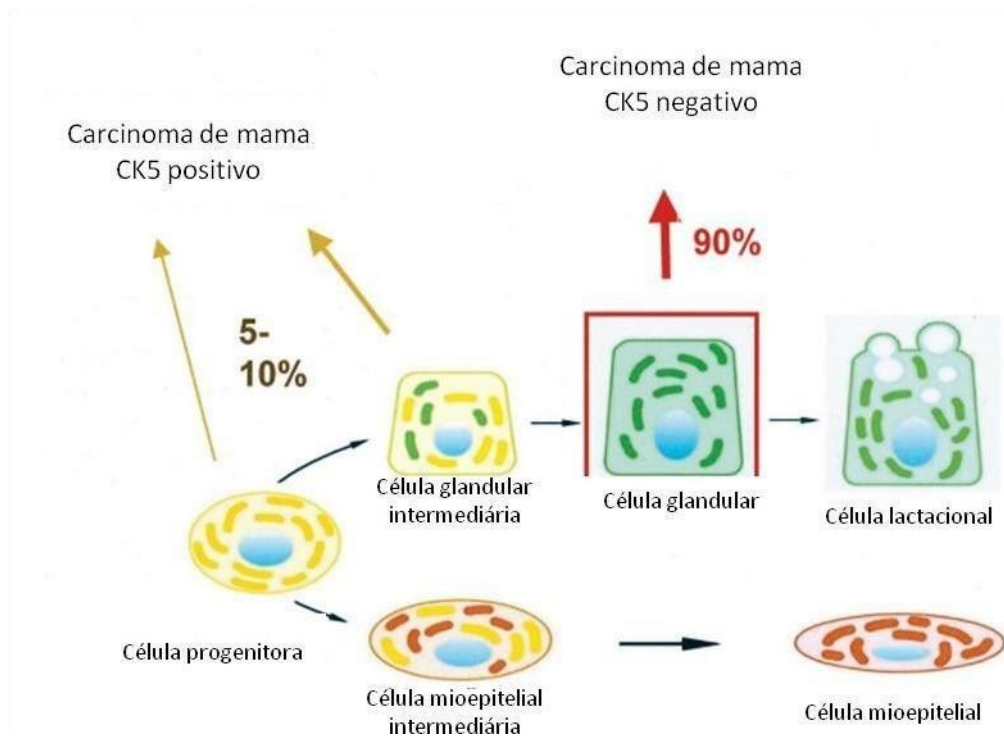
### 2.2.8. Carcinogênese Mamária

Um dos maiores desafios para o estudo da carcinogênese em pacientes com carcinoma de mama é identificar marcadores específicos que possam prever quais os tumores apresentarão pior prognóstico (SORLIE T et al., 2001; VIEIRA et al., 2008; WHO, 2019). A classificação morfológica é insuficiente para prever quais tumores responderão ou não às terapias preconizadas, pois os tumores com o mesmo grau, estadiu ou tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas terapêuticas (ELSTON AND ELLIS, 1991; REIS-FILHO, et al., 2006; VIEIRA, et al., 2008; WHO, 2019). Os diferentes fenótipos observados no carcinoma de mama o caracterizam como uma doença heterogênea com comportamentos biológicos diversos (PEROU, et al., 2000; VIEIRA, et al, 2008., PRAT AND PEROU, 2010).

### 2.2.8.1. Modelo de Diferenciação Celular e a Relação com o Carcinoma de Mama

O modelo descrito por Böcker et al, 2002, Figura 18, mostra células progenitoras CK5, que se diferenciam em células luminais (Ck8 / CK18/19) e em células mioepiteliais (SMA positivas). Podem-se observar células intermediárias que co-expressam CK 5 / 6 associado ao marcador específico de ambas as linhagens (CK8 / 18/19 ou SMA).

Figura 18. Modelo de diferenciação celular e o carcinoma de mama.



Este modelo representa um dos conceitos de biologia celular baseado em resultados de fluorescência imunológica e Western blot, complementados por estudos de expressão gênica. Este modelo descreve as diferenças celulares fundamentais entre lesões proliferativas da mama e a maioria dos tipos de carcinoma de mama. Fonte Böcker et al, 2002. Modificado pelo Autor.

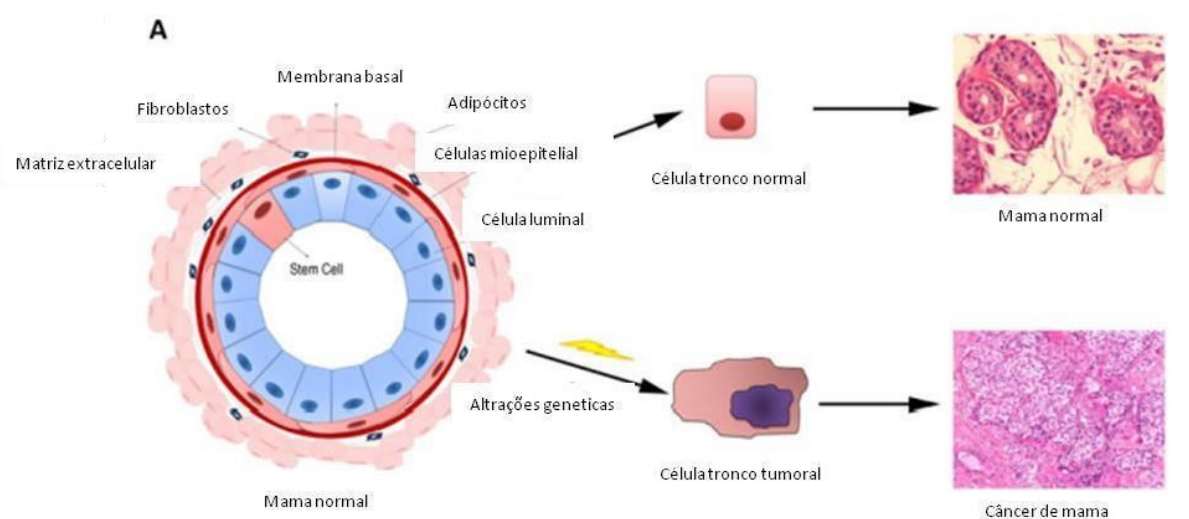


### 2.2.8.2. Representação dos Componentes Celulares da Mama com Células Tronco Normais e a Relação com as Células Tronco Neoplásicas

SCHMITT et al., 2012, descreveram um modelo representando o ducto mamário com a dupla população (luminal e mioepitelial) e a presença de uma terceira célula, ladeada por células luminais (Figura 19), que representa uma célula-tronco ou *stem cell* da glândula mamária normal.

Esta célula tronco normal possui a capacidade de auto-renovação e de se diferenciar nas duas linhagens mamárias (células luminais e células mioepiteliais). A célula-tronco maligna, que surgiria devido ao acúmulo de alterações genéticas (ou epigenéticas), além de possuir as mesmas características de autorrenovação e de diferenciação das células-tronco normais, apresentaria como características associadas à capacidade de sobrevivência, invasão e resistência terapêutica (SCHMITT et al, 2012).

Figura 19. A figura representa o desenho esquemático dos componentes celulares de um ducto normal da glândula mamária.



Na camada externa observam-se as células mioepiteliais em vermelho, circundando uma camada celular colunar chamadas de células epiteliais luminais, representadas em azul.

Fonte: Schmitt et al., 2012. Modificado pelo Autor.

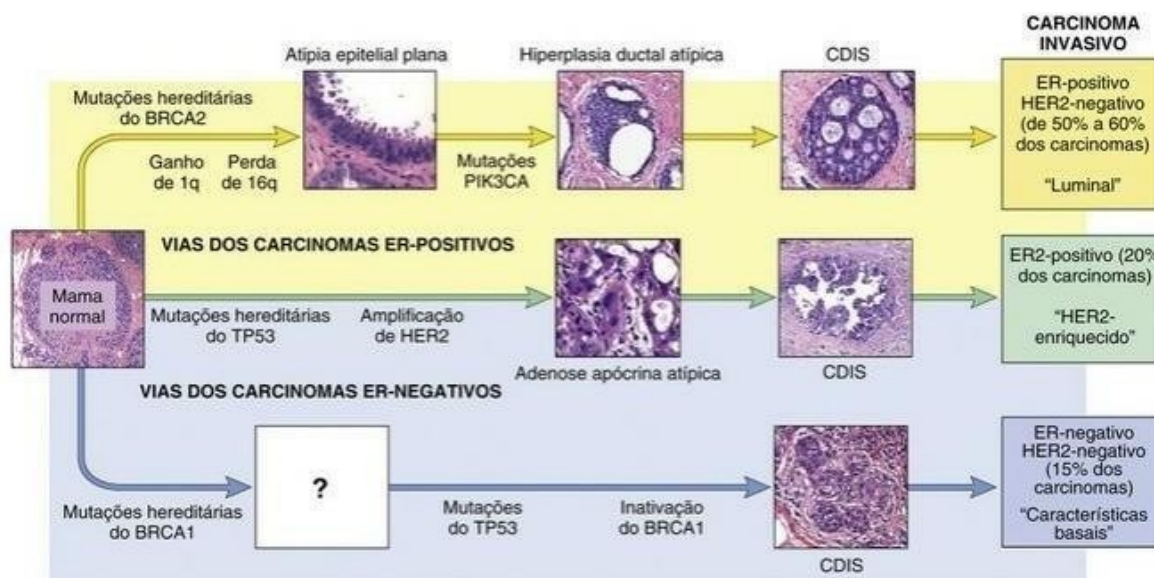
### 2.2.9. Hierarquia da Diferenciação celular Correlação com Subtipos Intrínsecos

A via de diferenciação do carcinoma de mama mais frequente é a via dos carcinomas luminais, que representa os tumores receptores de estrógeno positivo e HER2 negativo, independente do índice proliferativo. Nessa via também se incluem lesões benignas reconhecidas como lesões precursoras do carcinoma de mama luminal (atipia epitelial plana, hiperplasia ductal atípica e carcinoma ductal “*in situ*”). Todas as alterações compartilham eventos genômicos com o subtipo de tumores RE positivos (ganhos de cromossomo 1q, perdas do cromossomo 16q e mutações de PIK3CA) (WHO, 2019).

Os tumores que apresentam superexpressão do oncogene HER2 (com ou sem positividade para receptores hormonais), estão associados a mutações na linha germinativa de TP53, e tem uma possível associação com o carcinoma ductal *in situ* apócrino (WHO, 2019), como pode ser observado na Figura 20.

O subtipo triplo negativo tem associação com mutações e com perda da função BRCA1 e TP53 e são genomicamente instáveis. A maioria é classificada como "tipo basal" por perfis de expressão gênica (WHO, 2019).

Figura 20. Vias de diferenciação do carcinoma de mama.



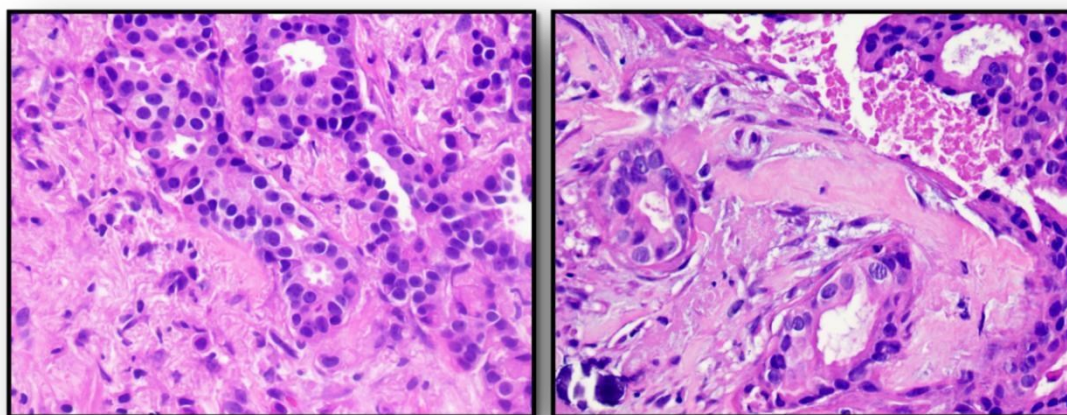
A figura representa as três principais vias de diferenciação do carcinoma de mama (via Luminal, via HER2 e a via TNBC). Fonte: Robins 9 edição.

### 2.2.10. Heterogeneidade Tumoral

O carcinoma de mama é um grupo heterogenio de tumor, com subtipos tumorais apresentando características patológicas aparentemente semelhantes (Figura 21), imunofenótipos distintos (Figura 22) com assinaturas moleculares e desfechos clínicos diferentes (WEIGEL, et al, 2010; SCHMITT et al., 2012). Em nível de transcrição, foram estratificados em cinco subtipos intrínsecos principais: luminal A, luminal B, HER2 positivo, *claudin-low* e *basal-like* (NIELSEN, et al., 2004; PRAT, et al, 2010; GOLDHIRSCH, et al, 2011).

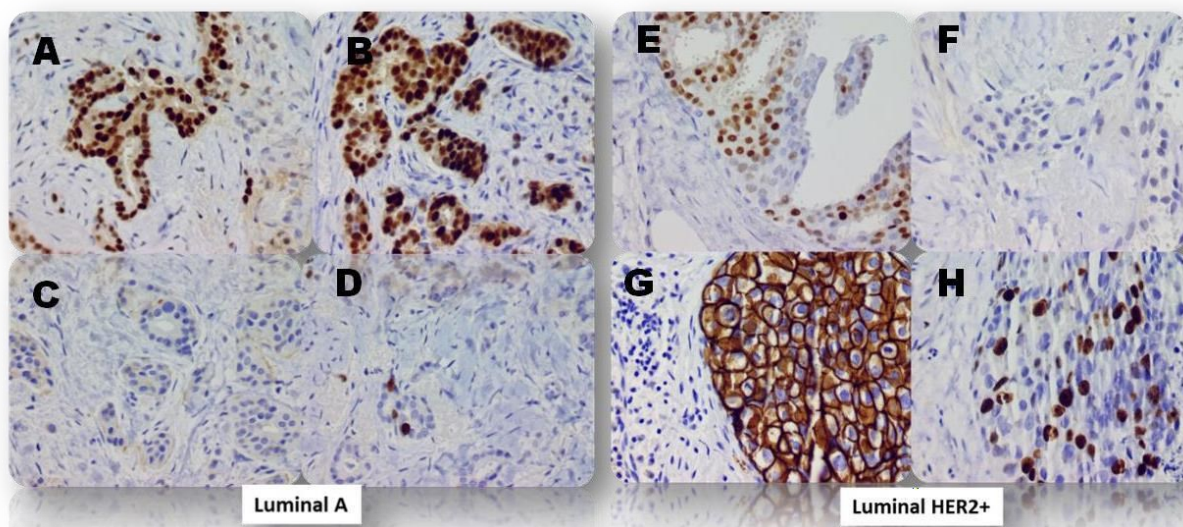
A classificação de tumores em um dos subtipos do carcinoma de mama tem implicações importantes para a adaptação dos tratamentos e a previsão dos desfechos dos pacientes; no entanto, a resposta do paciente à terapia direcionada ou quimioterapia permanece altamente variável (LEHMANN, et al.; 2016). Além disso, o microambiente que abrange células imunes e fibroblastos desempenha um papel fundamental na influência da histopatologia e comportamento tumoral (MAKDISSI. FBA, 2013). A comparação das assinaturas moleculares estabelecidas das subpopulações epiteliais normais da mama com as dos diferentes subtipos de carcinoma de mama forneceu um quadro importante para compreender as origens celulares do câncer de mama, tanto no câncer esporádico quanto no hereditário (Figura 20).

Figura 21. Imagem do carcinoma invasivo da mama Grau 1, Bem Diferenciado.



A fotomicrografia mostra a histologia do carcinoma invasivo da mama de duas pacientes diferentes (Painel A e Painel B) com formação tubular escore 1 e grau nuclear escore 2. Apesar de o mesmo padrão morfológico, em relação a graduação tubular e nuclear, apresentam prognósticos diferentes, devido as assinaturas genicas distintas  
Fonte o autor (HE 400X, Figura A e B).

Figura 22. Imagem de representa imunofenótipo de duas pacientes diferentes.



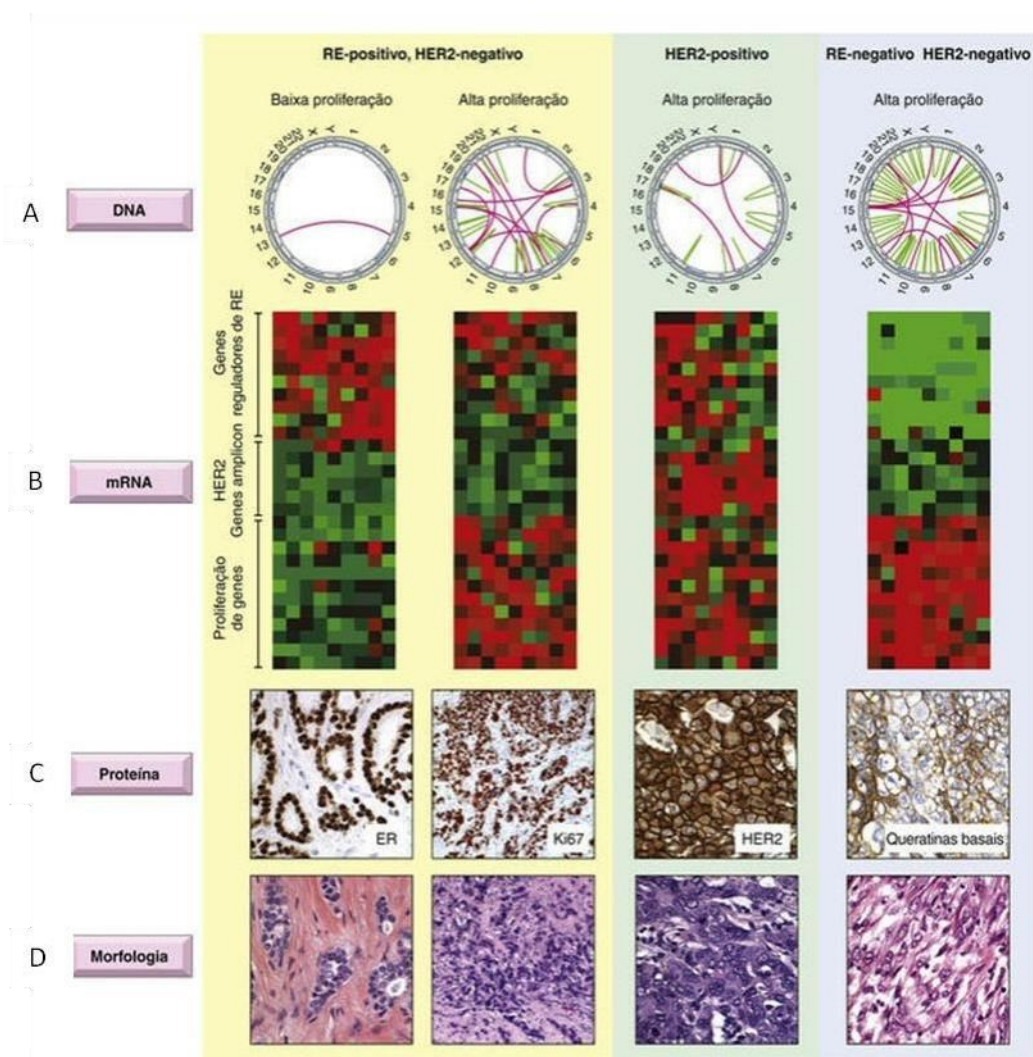
A imagem mostra heterogeneidade tumoral representada por dois tumores com o mesmo grau (G1) e estágio anatomopatológico (pT2) apresentam imunofenótipos diferentes e comportamentos biológicos distintos identificados através expressão de imunomarcção pela intensidade dos receptores hormonais RE (Figura 22 Painel A. e E.) e RP (Figura 22 Painel B. e F.), expressão da oncoproteína HER2 (Figura 22 Painel C e G.) e do índice de proliferação celular KI-67 (Figura 22 Painel D. e H.). As representações dos imunofenótipos são: Painel A, B, C, D representação do subtipo Luminal A; e Painel E, F, G, H representação do subtipo Luminal HER2+).

Fonte o Autor IHQ RE 400X, RP: 400X, HER2 400X e KI67: 400X.

### 2.2.11. Padrões Moleculares do Carcinoma de Mama

Tecnologias aplicadas nos estudos do DNA, do RNA, do perfil das proteínas e da distribuição do genoma (Figura 23) foram usadas para retratar com maior precisão os fenótipos dos tumores (SORLIE T, 2004). Nesse contexto, a caracterização sistemática e detalhada dos tumores em uma escala genômica pode ser correlacionada com informações clínicas, e, dessa forma, contribuir com o aumento do entendimento das causas e da progressão do carcinoma, assim como permitir e implementar a descoberta de novos marcadores moleculares, melhorando as intervenções terapêuticas (SORLIE T, 2004). Estudos do perfil de expressão gênica foram validados em exames de imuno-histoquímica (IHQ) (SORLIE T, 2004; BERTUCCI, 2006; PRAT E PEROU, 2011; VUONG, 2014).

Figura 23. Representação da classificação molecular do carcinoma de mama.



A figura representa a classificação molecular do carcinoma de mama (CDI). Três grupos principais de carcinoma de mama são distinguidos por mudanças características no DNA, mRNA, proteína e morfologia. As anormalidades genômicas são mostradas em gráficos circulares (Figura 23 Painel A) e apresentam todas as anormalidades genômicas dentro de um tumor específico, mapeadas nos cromossomos exibidos na periferia dos círculos. As alças verdes mostram rearranjos intracromossômicos, as alças vermelhas mostram rearranjos intercromossômicos. O perfil de expressão gênica (mRNA) (Figura 23 Painel B) mede os níveis relativos de expressão de mRNA. Vermelho indica aumento relativo; verde, diminuição relativa; e preto, sem alteração nos níveis. Os genes são organizados de cima para baixo e os tumores da esquerda para a direita. Os estudos imunohistoquímicos (Figura 23 Painel C) detectam as expressões das proteínas usando anticorpos específicos visualizados com um cromógeno marrom. Fonte: Robins 9 edição.

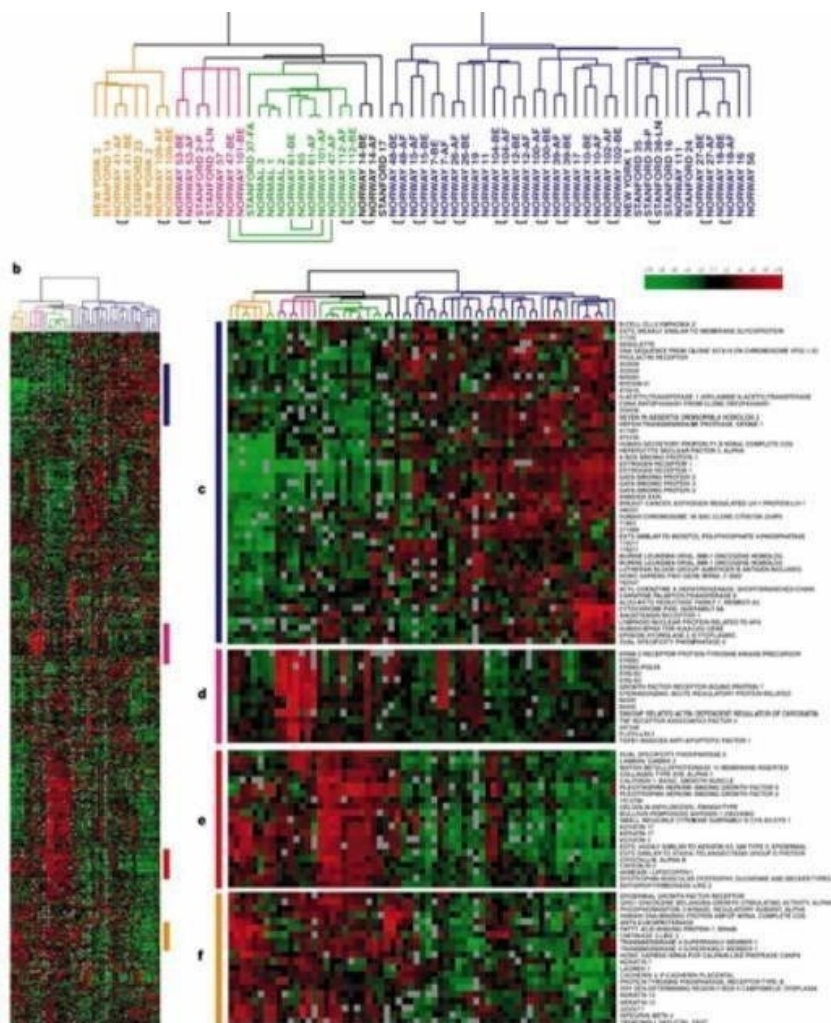
Na Figura 23 representam desde as alterações do DNA (Figura 23 Painel A) à morfologia tumoral (Figura 23 Painel D). Os subtipos luminais (RE-positivo / HER2-negativo), são os predominantes e variam de tumores bem diferenciados com baixas taxas de proliferação e poucas alterações cromossômicas a tumores pouco diferenciados com alta taxa proliferativa e grande número de rearranjos cromossômicos. Todos expressam RE que é um fator de transcrição dependente de estrogênio. A proliferação é estimada pela contagem de

mitoses ou por coloração para proteínas específicas do ciclo celular, através do Ki-67. Tumores HER2-positivos podem ser RE-positivos ou RE-negativos, mas quando RE está presente (nos luminais B HER2+) os níveis são tipicamente baixos. A positividade de HER2 pode ser detectada como um aumento no número de cópias do gene HER2, um aumento no mRNA de HER2 ou um aumento na proteína HER2, como mostrado na Figura 23 Painel C. Os TNBC (RE-negativos / HER2-negativos) sobrepõem amplamente aos carcinomas "basal like" definidos pela expressão de mRNA) e são caracterizados por instabilidade genômica com inúmeras alterações cromossômicas, uma alta taxa proliferativa e expressão de muitas proteínas típicas de células mioepiteliais (como por exemplo, queratinas basais) (ROBINS, 9 edição).

#### **2.2.12. Imunofenótipos Baseados no Retrato Molecular do Carcinoma de Mama**

Estudos do perfil molecular do câncer de mama mostraram importantes avanços a partir do estudo pioneiro de Perou et al, 2000, com a identificação dos perfis de expressão gênica baseados em estudos com cDNA microarrays, em mais de 8.000 genes humanos, pela análise de receptores hormonais (RH) representados pelo receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP), além do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (PEROU et al, 2000) (Figura 24).

Figura 24. Gráfico dos perfis de expressão gênica.



Descrição de uma plataforma de 8,102 genes de 42 pacientes, através da técnica *cDNA* microarrays, mostrando a diversidade fenotípica. Esse modelo tornou-se a chave inicial para a classificação molecular mostrou a heterogeneidade tumoral, onde tumores morfologicamente parecidos apresentavam comportamentos biológicos diferentes. Fonte: Perou, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Fonte: Nature. 2000; 406:747-52.

Posteriormente esses estudos foram validados em amostras de tecido que avaliaram produtos de expressão das proteínas por IHQ (SORLIE T et al., 2001). Na prática diária o RE, o RP e o HER2 são universalmente usados como fatores preditivos e prognósticos no diagnóstico do carcinoma invasivo da mama (VUONG et al., 2014; EIERMANN et al., 2013; AHN et al., 2015; WHO, 2019) pois são relacionados a terapêuticas específicas e são importantes ferramentas no tratamento desses tumores (WHO, 2019, AJCC, 2018; PAYNE et al., 2008). Recentemente, o nosso grupo avaliou esses mesmos marcadores em amostras de tecido mamário de mulheres com diagnóstico de câncer de mama por CF. Essa análise foi capaz de distinguir os subtipos tumorais pelos imunofenótipos (WOPEREIS, 2021). Também avaliamos a expressão do índice proliferativo pelo Ki67 em amostras de tumores de mama através da CF, e identificamos que a CF é eficaz e isenta de viés observacional (VIEIRA, 2021, 2).

Os carcinomas de mama foram inicialmente subdivididos em cinco grupos: luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e normal breast-like (PEROU et al., 2000). Atualmente, os critérios foram revisados pela 13ª Conferência de St. Gallen (GOLDHIRSCH et al., 2013), e a avaliação IHQ de quatro biomarcadores (ER, PR, HER2 e o marcador de proliferação Ki67) estratificou o carcinoma de mama em cinco subtipos IHQ distintos (luminal A, luminal B/HER2-, luminal B/HER2+, HER2+ e triplo negativo/TNBC) conforme descrito na Tabela 4 (GOLDHIRSCH et al., 2013; AHN et al., 2015, INWALD et al., 2013, WHO, 2019).

Tabela 4. Distribuição dos biomarcadores baseado na conferência de St. Gallen

Subtipos IHC	RE	RP	HER2	Ki67
Luminal A	+	+/-	-	baixo
Luminal B/HER2-	+	+/-	-	alto
Luminal B/HER2+	+	+/-	+(3+)	qualquer
HER2+	-	-	+(3+)	qualquer
TNBC	-	-	-	qualquer

IHC: imuno-histoquímicos; ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; Ki67: Marcador de Proliferação; TNBC: carcinoma de mama triplo negativo; +: positivo; -: negativo; +/-: positivo ou negativo; +(3+): positivo se pelo menos 10% das células tumorais apresentaram um escore de coloração da membrana celular de 3+ (forte e contínuo). Fonte: GOLDHIRSCH et al., 2013, modificado pelo Autor.



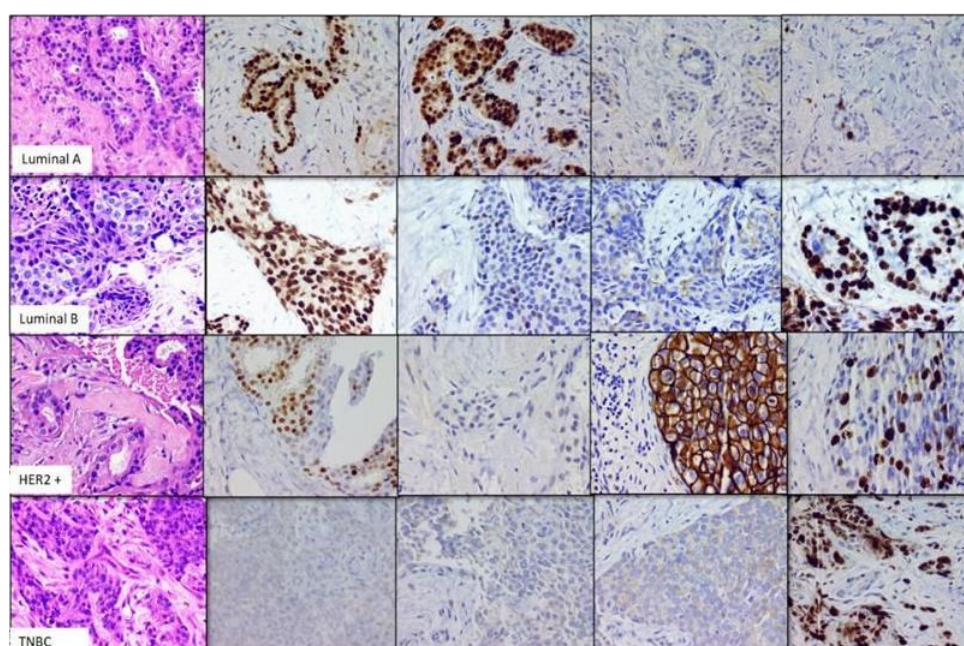
### 2.2.13. Classificação Imuno-Histoquímica do Carcinoma de Mama com Base no Padrão Molecular

A IHQ permanece como um dos principais métodos para determinar através dos imunofenótipos (Figura 25), o perfil de expressão proteica em laboratórios de anatomia patológica (MARQUEZ, 2004; AMIN, et al., 2017). Muitos anticorpos utilizados na IHC tem um papel estabelecido ou presumido e representam proteínas das quais a transcrição foi discriminada em estudos de perfil genético (PEROU, 2000; SORLIE T, 2004, BERTUCCI, 2006).

A caracterização dessas proteínas contribui para o diagnóstico e para o monitoramento do câncer de mama invasivo, e ajuda a desenvolver novos alvos diagnósticos e terapêuticos (BERTUCCI, 2006; GOLDBIRSCHE et al., 2013; AMIN, et al., 2017).

Todos os carcinomas de mama invasivos podem ser agrupados dentro de uma sequência de subtipos definidos pelos biomarcadores (WILLIAMS et al., 2006; ALMEIDA et al., 2012; WHO, 2019). Nesse contexto a IHQ é um dos principais métodos para determinar o perfil de expressão dessas proteínas (MARQUEZ et al., 2004; FOULKES et al., 2010; YUAN et al., 2019).

Figura 25. Imunofenótipos do carcinoma de mama.



A figura representa quatro padrões distintos e individuais da morfologia do CDI, na coloração de hematoxilina e eosina (HE), e a relação direta com os imunofenótipos do com base da imunexpressão do RE, RP HER2 e Ki67.

Fonte o autor (HE 200X; IHQ 200X).

#### **2.2.14. Rearranjo dos Imunofenótipos e Relação com Marcadores Prognósticos**

A partir do rearranjo estabelecido pela 13<sup>a</sup> Conferência de St. Gallen (GOLDHIRSCH et al., 2013), o subtipo luminal A foi posicionado no grupo de tumores indolentes, de melhor prognóstico e mais sensíveis a terapia endócrina. Enquanto os tumores do subtipo luminal B, (tanto HER2- quanto o HER2+) foram redistribuídos em uma categoria de tumores mais agressivos, com índice proliferativo alto, pior prognóstico e com menor sensibilidade a terapia endócrina (GOLDHIRSCH et al., 2013; AHN et al., 2015).

Uma grande diferença biológica entre os luminais A e B é a assinatura de proliferação, que se traduz em uma maior expressão nos tumores luminais B comparado aos tumores luminais A (GOLDHIRSCH et al., 2013; AHN et al., 2015).

Dentro desse conceito de subdivisão dos subtipos, destaca-se que o índice do Ki67 é importante para definir e estratificar tumores luminais A e B, especialmente o luminal B/HER2-, demonstrando que o uso da IHQ para o Ki67 é útil para predizer o prognóstico, a resposta a resistência ao tratamento quimioterápico ou à terapia endócrina, além de estimar risco residual na neoadjuvância (FAN et al., 2006; PARKER et al., 2009; GOLDHIRSCH et al., 2013; INWALD et al., 2013, AHN et al., 2015; WHO, 2019).

Apesar dessa importante função, há controvérsias mundiais na utilização do Ki67, principalmente pela falta de padronização (PAIK et al., 2004; INWALD et al., 2013; AMIN et al., 2017; MUFTAH et al., 2017). Estudos mostram que a expressão de genes relacionados à proliferação do gene MKI67 (que codifica Ki67) é um componente robusto no cálculo de pontuação de recorrência tumoral no ensaio OncoType DX<sup>®</sup> (PAIK et al., 2004). Por outro lado, destaca-se ainda a importância em detectar pacientes com baixo risco de recidiva, que são encontrados quase exclusivamente no subtipo luminal A (PARKER et al., 2009; FAN et al., 2006).

De fato, a taxa de proliferação é um dos principais fatores determinantes da maioria dos preditores genômicos projetados para separar tumores em subgrupos prognósticos (SOTIRIOU et al., 2006; GOLDHIRSCH et al., 2013; INWALD et al., 2013; AHN et al., 2015; WHO, 2019).

### **2.2.15. Imunofenótipos de Carcinoma de Mama e Comportamento Biológico Tumoral**

O subtipo luminal A caracteriza-se pela expressão dos RH, ausência de HER2 e baixa taxa de proliferação, com Ki67 inferior a 15% (INWALD et al., 2013; AHN et al., 2015, AMIM et al., 2017; WHO, 2019). Nesse subgrupo observa-se elevada expressão dos genes expressos pelas células epiteliais luminais e associação com prognóstico clinicamente mais favorável, além de boa resposta à terapia antiestrogênica (SORLIE, et al., 2001; CIRQUEIRA et al., 2011; BARROS; LEITE, 2015).

O subtipo luminal B, apresenta o fenótipo RE positivo, RP positivo ou negativo, HER2 negativo ou positivo e alta atividade mitótica representada pela expressão da proteína Ki67 maior que 15% nas células neoplásicas (AHN et al., 2015). Além disso, está associado a piores prognósticos, particularmente com recidivas tumorais e possíveis similaridades com os tumores RE negativos, os quais são os subtipos superexpressão do HER2 e TNBC (SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003; SORLIE T, 2004; GOLDBIRSCH et al., 2013; AHN et al., 2015).

O subtipo HER2+ cujo fenótipo apresenta RH negativo e HER2 positivo (NG et al., 2015; GOLDBIRSCH et al., 2013) apresenta boas respostas a fármacos que bloqueiam a atividade do HER2 (BERTUCCI et al., 2006; NIELSEN et al., 2004; ROSS; FLETCHER, 1999). Tumores com superexpressão do HER2 estão relacionados com piores prognósticos, grau histológico mais alto, aumento da agressividade tumoral, redução da sobrevida, aumento da recorrência e da mortalidade, e, estão associados com resistência a fármacos citotóxicos (FOULKES et al., 2010; NG et al., 2015; WOLFF AC et al., 2018).

Finalmente, o subtipo TNBC que apresenta imunofenótipos determinados pela negatividade de RH e HER2, além de expressão de genes evidenciados nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais que estão ligados a mutações no BRCA1 e BRCA2 (SORLIE T, 2004; PAREDES et al., 2007). Esse subtipo, 15 a 20% dos casos, são clinicamente mais agressivos, mais incidêntes em pacientes jovens, apresentam graus histológicos mais elevados, metástases linfonodais mais frequentes e, por isso, são considerados de mau prognóstico (NIELSEN et al., 2004; HÁ, et al., 2006; MORRIS et al., 2007; FOULKES, et al., 2010; LEHMANN et al., 2011). Esse é um dos mais intrigantes subtipos tumorais pois não possui alvo terapêutico definido como os outros subtipos, portanto, não responde ao tratamento antiestrogênico nem ao anticorpo monoclonal anti-HER2 (SHAK, 1999; TANNER et al., 2000; MATOS et al., 2005; BERTUCCI et al., 2006; TURNER; REIS-

FILHO, 2006; DUNKLER et al., 2007; BURSTEIN et al., 2015; JÉZÉQUEL et al., 2015; AHN et al., 2016).

Pacientes com TNBC tendem a apresentar maior probabilidade de metástase à distância e a recidivas tumorais mais precoces, em 2 a 3 anos, se comparado aos outros subtipos, além de menor sobrevida (NIELSEN et al., 2004; FOULKES et al., 2010; HA Y et al., 2006). Por se tratar de um subgrupo tumoral molecularmente heterogêneo há dificuldades no desenvolvimento de terapias direcionadas a esse tipo de carcinoma (KREIKE et al., 2007; LEHMANN et al., 2011; BURSTEIN et al., 2015; JÉZÉQUEL et al., 2015; AHN et al., 2016).

### 2.3. IMUNIDADE ANTI-TUMORAL

O sistema imunológico humano desempenha um papel importante tanto na progressão do câncer quanto na resposta ao tratamento (DENARDO AND COUSSENS, 2007; BINDEA et al., 2011;). Esclarecimentos sobre a associação entre as proteínas imunológicas e o infiltrado inflamatório peritumoral tem importância clínica (CHUNG et al., 2017).

O valor prognóstico dos linfócitos intratumorais tem sido comprovado no carcinoma de mama (DENKERT et al., 2010; LOI et al., 2013). Estudos indicam que o aumento do infiltrado inflamatório intra tumoral está relacionado com taxas de resposta patológica completa (pCR) e com a melhora na sobrevida (DENKERT et al., 2010; MAHMOUD et al., 2011; MOHAMMED et al., 2012; LEE et al., 2013), especialmente nos casos de TNBC (LOI et al., 2014; IBRAHIM et al., 2014).

Sabe-se que o complexo de histocompatibilidade (MHC1) na superfície da célula tumoral é essencial para o reconhecimento por células T citotóxicas. Moléculas do MHC1 são codificadas por antígenos de leucócitos humanos (HLA), e a expressão elevada do HLA tem sido relatada como um marcador de melhora da sobrevida dos pacientes com câncer (POWELL et al., 2012). Há um consenso que relaciona as células CD4+ (Th1) e CD8+ como auxiliares na atividade antitumoral (BATES, et al., 2006; MAHMOUD et al., 2011; GU- TRANTIEN et al., 2013).

Apesar de todos os avanços, ainda são necessários mais estudos para elucidar qual o subgrupo de linfócitos intratumorais poderia apresentar um potencial prognóstico mais significativo, principalmente porque a imunoterapia vem se tornando uma das opções

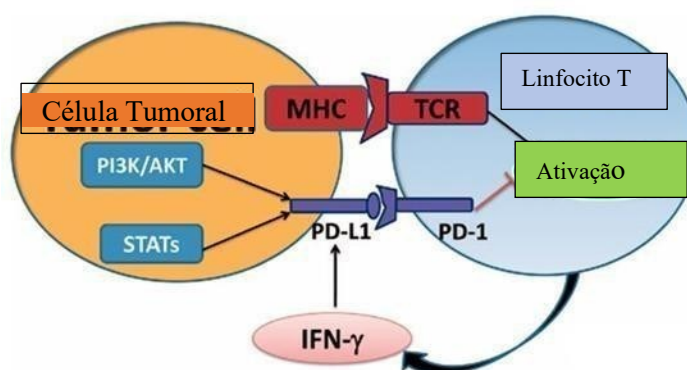
terapêuticas no tratamento do carcinoma de mama (MILANI et al., 2013; MAZEL, et al., 2015; BUISSERET et al., 2017; WHO, 2019).

### 2.3.1. Expressão do PDL-1 e o Carcinoma da Mama

A proteína transmembrana ligante de morte programada-1 PD-L1 desempenha importantes funções na supressão do sistema imunológico em condições normais, atua na manutenção da homeostase imune, e, em tumores, como o de pulmão e o melanoma, é superexpressa pelas células tumorais e pelas células imunes intratumorais, como os macrófagos e as células dendríticas (CHEMNITZ et al., 2004; CHEN et al., 2012; CHEN; MELLMAN, 2013).

A superexpressão da proteína PD-L1 esta relacionada a um mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro pelas células tumorais de diversos tipos de cânceres, inclusive no de mama (CHEN AND MELLMAN, 2013; QIN et al., 2015; MINGHUI et al., 2017). O PD-L1, presente nas células tumorais, se liga receptor de morte programado-1 (PD-1) nas células T citotóxicas ativadas, e, dessa forma, inibe a resposta imune antitumoral (Figura 26) (KEIR, et al., 2008; CHEN, et al., 2012; CHEN AND MELLMAN, 2013).

Figura 26. Via de ativação do PDL-1.



Via PD-1/PD-L1. Há dois caminhos utilizados pelas células neoplásicas para *upregular* o receptor de morte programado-1 (PD-1) evitar a imunidade. O primeiro normalmente envolve uma resposta imune inata. A regulação do ligante de morte programada-1 (PD-L1) pode ser causada pela sinalização oncogênica ativa, como pela via proteína quinase B (AKT), que é independente da resposta inflamatória. A alternativa é vista principalmente em respostas imunológicas adaptativas. A regulação do PD-L1 é induzida pela resposta inflamatória, como via interferon (IFN). Abreviaturas: MHC, maior complexo de histocompatibilidade; PI3K, fosfoinositida 3-quinase; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição. Fonte: Guan et al., 2017. Modificado pelo Autor.

A associação entre o PD-L1 e os prognósticos mais agressivos nos carcinomas da mama é um importante tema de investigação na área da pesquisa clínica (WU et al., 2015; QIN et al., 2015; MUENST et al., 2014; LI et al., 2016, MAZEL et al., 2015; SALMANINEJAD et al., 2019; SCHÜTZ et al., 2017).

Embora haja relatos em trabalhos prévios que questionam o valor prognóstico do PD-L1 no carcinoma de mama (BAPTISTA et al., 2016; PARK et al., 2016), há evidências que o PD-L1 possa ser um biomarcador significativo nos carcinomas de mama de pior prognóstico (MINGHUI et al., 2017), pois a presença da superexpressão dessa proteína está associada a casos com metástases linfonodais, alto grau histológico, negatividade para RE, imunofenótipo TNBC e diminuição da sobrevida (ALI et al., 2015, MAZEL et al., 2015; SCHÜTZ et al., 2017; SALMANINEJAD et al., 2019).

A diferença entre os aspectos prognósticos ocorre principalmente quando a superexpressão dessa proteína é comparada com as amostras de pacientes RE positivos, com linfonodos negativos e características morfológicas de baixo grau histológico (MINGHUI et al., 2017). Como visto, o PD-L1 pode ser um promissor biomarcador de prognóstico do carcinoma de mama e um indicador de prognóstico relacionado a redução de sobrevida global (MINGHUI et al., 2017). O reconhecimento do papel fisiológico do PD-L1 em se ligar a receptores de morte programada 1 (PD-1), expressos na superfície de células T citotóxicas ativadas foi revelado (KAFL et al., 2004).

Informações adicionais sobre as propriedades das células tumorais que estão associadas à expressão de PD-L1, por IHQ, podem trazer repostas sobre o bloqueio da via PD-1/PD-L1 (SOLIMAN et al., 2014).

Pesquisas que investigam os produtos da expressão proteica podem ser úteis na tentativa de selecionar casos responsivos à imunoterapia, o que possibilita a identificação de candidatos a terapia anti-PD-1/PD-L1, especialmente para pacientes com o subtipo TNBC (MINGHUI et al., 2017).

O tratamento relacionado a imunoterapia contra o carcinoma de mama trouxe a necessidade de se compreender as respostas imunes antitumorais dentro dos microambientes dos tumores. Um microambiente imunológico em equilíbrio é fundamental para respostas positivas (BUISSERET et al., 2017).

### 2.3.2. Expressões de PD1 e CTLA-4 e o Carcinoma da Mama

O linfócito T é a célula mais importante na defesa antitumoral e as expressões das proteínas PD-1 e as moléculas coestimuladoras negativas CTLA-4 (do inglês cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), presentes na sua superfície dos linfócitos T, são reguladores críticos de sua função em diversos processos que vão desde autoimunidade, tolerância a transplantes, infecções virais crônicas e imunidade tumoral. O CTLA-4 limita a atividade das células T jovens durante as respostas imunológicas e o PD-1 reduz a atividade das células T em tecidos periféricos (FIFE and BLUESTONE, 2008).

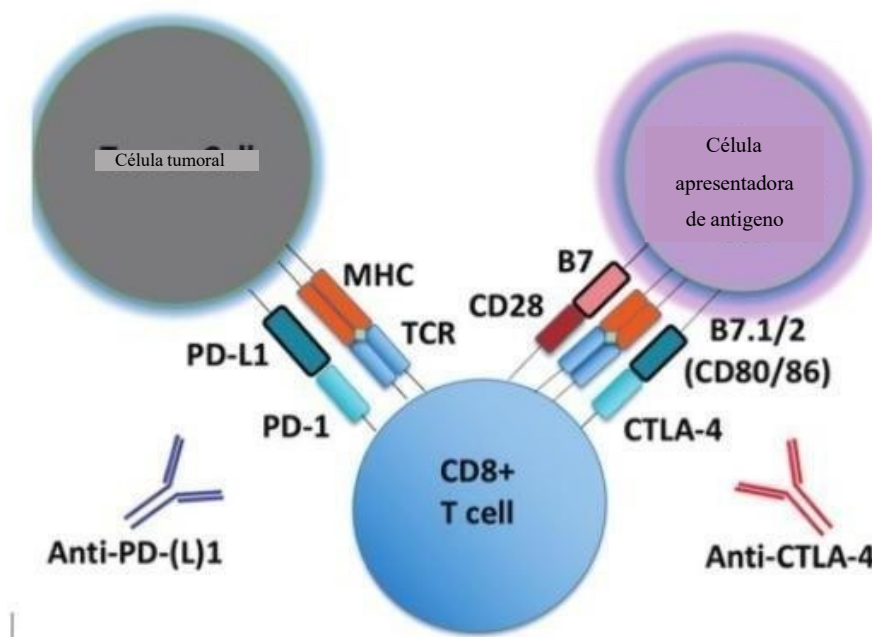
A possibilidade de investigar alvos que seletivamente possam bloquear células T destrutivas ou que melhorem as repostas imunes dos pacientes para equilibrar a homeostase imunológica representa um grande desafio. A família de moléculas da superfície celular da proteína 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4), também conhecida como CD152, regula caminhos de sinalização complexos que afetam profundamente as respostas celulares da imunidade (FIFE and BLUESTONE, 2008).

O CTLA-4, é uma proteína expressa na superfície dos linfócitos T e a identificação e caracterização de membros adicionais dessa família, incluindo o PD-1, o PD-L1 e o ligante da morte programada 2 (PD-L2), adicionaram complexidade na análise de como as moléculas de superfície controlam a ativação de células T e a tolerância periférica (FIFE and BLUESTONE, 2008).

Algumas interações co-estimulam e melhoram significativamente as respostas periféricas das células T, e, em contraste, o CTLA-4 interage com moléculas resultando na diminuição da atividade dos linfócitos T, bloqueando-os, da mesma forma que as interações do PD-1 com PD-L1 e PD-L2 reduzem a resposta imune de células T (FIFE and BLUESTONE, 2008).

Apesar dessas semelhanças, os papéis regulatórios das vias CTLA-4 e PD-1 são distintos e possuem padrões de expressão dos ligantes do CTLA-4 e PD-1 individualizados, tanto temporalmente quanto espacialmente, como pode ser observado na Figura 27 (FIFE and BLUESTONE, 2008).

Figura 27. Vias CTLA-4 e PD-1.



Mostra o esquema de bloqueio PD-1/CTLA-4. Esquema detalhando passos básicos envolvidos na geração de células T específicas do tumor. Mostrado é um esquema de uma célula tumoral, célula T efetor CD8, e uma célula apresentadora de antígeno (APC), com interações células-células associadas via PD-1/PD-L1 e CTLA-4/B7. Antígenos ou neoantígenos associados ao tumor são apresentados pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC) em APCs ou células tumorais para células T com receptor de células T (TCR) apropriados. O receptor de co-ativação CD28 em células T liga B7 em APCs. Os anticorpos anti-PD-(L)1 e anti-CTLA-4 são mostrados. Fonte: Guan et al., 2017. Modificado pelo Autor.

#### 2.4. DOENÇA METASTÁTICA

A presença de metástase linfonodal é um fator prognóstico relevante no carcinoma de mama, pois é o indicador mais importante de tempo livre de doença e sobrevida global (ROSEN, et al., 1993; SLOANE JP, 1994; LEITNER, et al., 1995; CADY B, 1997; AJCC, 2018). A grande maioria das pacientes com metástase linfonodal são candidatas a terapia sistêmica. Mas, o maior desafio é determinar quais pacientes com linfonodos negativos devem receber terapia adjuvante, na associação ao tratamento cirúrgico. O risco e o benefício são estimados através de vários critérios relacionados aos fatores prognósticos e preditivos (BUITRAGO et al., 2011).

As metástases à distância ocorrem quando as células do tumor primário se espalham para outros locais no corpo. Os principais locais de metástase do carcinoma de mama são o cérebro, o fígado, os ossos e os pulmões (Hess, et al., 2006; KENNECKE, et al. 2010). A doença metastática é a principal causa de morte relacionada ao carcinoma (KIMBUNG, et al., 2015).



O processo metastático requer uma complexa condição para sobrevivência das células tumorais circulantes (CTC), pois existem barreiras que limitam a sobrevivência das CTC fora do ambiente de origem. Além disso é necessário que as células dormentes reiniciem a sua atividade proliferativa para desenvolver as macrometástases (VANHARANTA AND MASSAGUE, 2013; KIMBUNG, et al., 2015).

Outra questão importante são os diferentes subtipos tumorais e a relação com os sítios metastáticos. Tumores do tipo Luminal, que são RE positivos, tem períodos de latência prolongados para o desenvolvimento de metástases, e os principais locais de comprometimento são os ossos. Em contrapartida, tumores RE negativos apresentam um período de latência mais curto para o desenvolvimento de metástases, e as metástases são mais frequentemente nas vísceras. (SMID, et al., 2008; LARGILLIER, et al., 2008; KENNECKE, et al., 2010; SONI, et al., 2015). Há indícios que as células tumorais RENegativas possam adquirir um fenótipo precocemente mais agressivo durante a progressão da doença (VANHARANTA AND MASSAGUE, 2013).

A história natural do carcinoma de mama varia de paciente para paciente e dependem de fatores clínicos, mecanismos imunológicos, hormonais e nutricionais dos indivíduos e do potencial biológico e metastático tumoral (CLARK GM, 1996).

#### **2.4.1. Células Dormentes**

Células dormentes ou êmbolos são “clusters” de células tumorais que podem permanecer em estado de "dormência ou latência" até que retornam a um estágio ativo e iniciam as metástases, mesmo décadas após o primeiro diagnóstico (FEHM et al., 2008).

A investigação dessas células “dormentes ou latentes” *in vivo* é difícil. Há relatos da utilização de RT-PCR ou métodos baseados em anticorpos que detectaram essas células na medula óssea em 30 a 40% de mulheres com carcinoma da mama primário (COTE et al., 1991; DIEL et al., 1996; BRAUN et al., 2000; GEBAUER et al., 2001; WIEDSWANG et al., 2003).

A população de células dormentes, que permanecem ocultas, assintomáticas e indetectáveis durante um período prolongado, é a principal causa das metástases. Tais células possivelmente sobrevivem às repostas de defesa dos organismos por mecanismos de reparação de DNA, e, em dado momento, entram em atividade proliferativa levando às recorrências tumorais ou metástases (EVANS AND LIN, 2015). Pelo fato de as células tumorais disseminadas estarem associadas com mau prognóstico há indícios que as

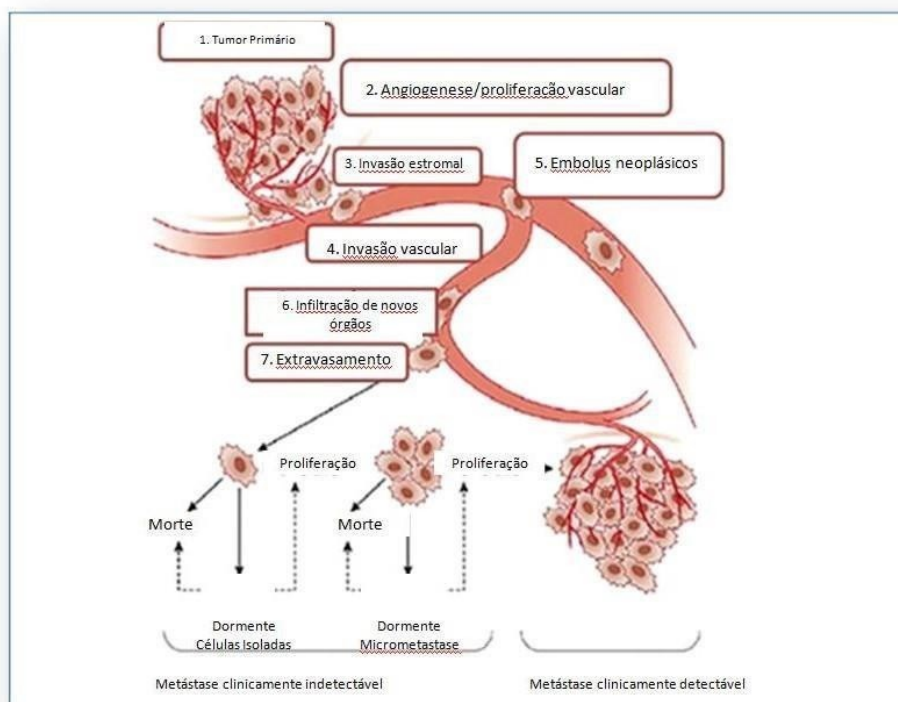
subpopulações dessas células residuais desenvolvam mecanismos para evitar a resposta imune do hospedeiro (FEHM et al., 2008; AZOURY, STRAUGHAN E SHUKLA, 2015).

Essas populações residuais na corrente sanguínea caracterizam um prognóstico desfavorável, pois as pacientes com tumores originalmente RE+ e HER2-, por exemplo, podem expressar as proteínas de comprovado valor preditivo, de tal modo que esta ferramenta poderia ser usada na triagem para estratificar e monitorar pacientes com câncer de mama (MAZEL et al., 2015).

### 2.4.2. Células Circulantes

A despeito dos progressos terapêuticos, um grande problema no carcinoma de mama é a recidiva tumoral, pois tumores primários, mesmo em pequenas dimensões, podem recidivar após a exérese, pela disseminação de êmbolos tumorais na circulação sanguínea (Figura 28) (BUTLER; GULLINO, 1975; FIDLER, 1970; FEHM et al., 2008; MAZEL, et al., 2015; BUISSERET et al., 2017).

Figura 28. Representação de células tumorais circulantes.



O desenho esquemático mostra diferentes estágios das células tumorais circulantes intravasculares e sua relação com as metástases. Fonte: Al-Mahmood et al., 2018. Modificado pelo Autor.

A presença de células positivas para CK na medula óssea da maioria dos pacientes com neoplasias malignas sólidas, mesmo assintomáticas, podem corresponder a células tumorais disseminadas com potencial para desenvolver metástases a distância (VESELLA et al., 2007; MAZEL et al., 2015).

Tais células podem impulsionar a imunidade, induzindo memória antitumoral nas células T. Já foi estabelecido que células T de memória CD4 e CD8 têm aumento proporcionalmente mais alto em pacientes com carcinoma de mama quando comparados a pacientes controle saudáveis, e que os pacientes com células “dormentes positivas” na medula óssea também apresentam aumento do número de linfócitos T CD4+, células CD56 + e CD8 + quando comparados aos pacientes sem células dormentes (FEUERER et al., 2001).

## 2.5. JUSTIFICATIVA

O carcinoma de mama é um problema de saúde pública mundial, por ser uma doença com alta prevalência na população feminina e que apresenta incidência e mortalidade crescentes. A necessidade da criação e desenvolvimento de novas ferramentas para o screening do diagnóstico desses tumores e a possível utilização na prática clínica é de fundamental importância.

Neste sentido, o estudo da utilização de ferramentas que possam abreviar os resultados para o diagnóstico de tumores sólidos através da caracterização das expressões proteicas, como por exemplo a utilização CF integrada aos métodos anatomopatológicos e de IHQ, que já está amplamente padronizados, poderão contribuir para fornecer conclusões diagnósticas mais rápidas e aumentar a cobertura na investigação do carcinoma de mama.

O CK19, CD4, CD8, CD45, CTLA4, PD1 e PD-L1 têm sido estudados como parâmetros únicos ou em outras associações nos estudos de carcinoma de mama. O estudo em conjunto desses produtos de expressão proteica e suas possíveis associações com dados clínicos, morfológicos e subtipos moleculares dos tumores de mama e as relações com valores prognósticos, bem como a possibilidade de utilização desses biomarcadores em metodologias como a citometria de fluxo para a avaliação do risco de metástase ainda não foram investigados.

Para tanto, compreender as associações entre as variáveis deste estudo e as características imunofenotípicas relacionadas aos produtos de expressão proteica são determinantes para organizar e estabelecer protocolos que auxiliem mais rapidamente no direcionamento da avaliação do carcinoma de mama.

Antes do desenvolvimento do estudo dos biomarcadores CK19, CD4, CD8, CD45, CTLA4, PD1 e PD-L1 para o estudo, houve a necessidade de conhecer a prevalência do carcinoma de mama na população a ser estudada e de padronizar titulações e metodologias a serem aplicadas nas amostras do estudo prospectivo.

Assim, foi realizada a busca de informações com base no perfil epidemiológico dos pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo da mama atendidos no HospitalUniverstario da Universidade Federal de Santa Catarina, durante o período de janeiro de 1994 a dezembro de 2018, para estabelecer as frequências dos subtipos imuno-histoquímicos e as associações de carcinoma de mama com a idade, características morfológicas estabelecendo correlações entre biomarcadores imunohistoquímicos.

Por isso, este trabalho foi dividido em estudo retrospectivo e estudo prospectivo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a importância da análise conjunta dos biomarcadores RE, RP, HER2, Ki-67, CK19, CD8, CD4, CD45, CTLA4, PD1 e PD-L1 para o diagnóstico, prognóstico e avaliação do risco de metástase em pacientes com carcinoma invasivo da mama (CDI).

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

##### **3.2.1. Estudo Retrospectivo**

- Investigar a frequência de CDI em mulheres atendidas no HU/EBSERH/UFSC entre os anos de 1994 a 2018;
- Avaliar a frequência dos subtipos imunohistoquímicos do CDI no período de 24 anos;
- Analisar a prevalência de subtipos de CDI de acordo com a faixa etária e características morfológicas de grau histológico e grau nuclear no período de 24 anos;

##### **3.2.2. Estudo Prospectivo**

- Validar a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a investigação dos biomarcadores CK19, PDL-1, PD1 e CTLA4
- Estabelecer um painel de anticorpos para a investigação conjunta dos biomarcadores CD4, CD8, CD45, PDL-1, PD1 e CTLA4 por CF e por IHQ nas amostras de tecido (biópsia) e amostras de sangue periférico.
- Investigar a presença da expressão do PD1 e CTLA-4 nos linfócitos TCD4 e TCD8 por CF
- Estabelecer critérios imuno-histoquímicos para biomarcadores (RE, RP, Her2 e Ki67);
- Relacionar a presença da expressão do PDL-1 por IHQ com os subtipos baseados pelos imunofenótipos (RE, RP, HER2 e Ki-67);

- Avaliar se há associação entre a expressão de PDL-1 por IHQ e os subtipos de pior prognóstico
- Investigar os leucócitos e subtipos de linfócitos infiltrados (células TCD4 e TCD8, células NK e NKT) no tecido tumoral e sangue periférico por CF das pacientes com CDI e associar com os subtipos imunofenotípicos
- Analisar se a relação CD4/CD8 no sangue periférico e no tecido mamário tumoral por citometria de fluxo servem como um biomarcador de imunovigilância nos subtipos de pior prognóstico;
- Padronizar e validar a metodologia para a identificação das células CK19 circulantes no sangue periférico por citometria de fluxo;
- Investigar a presença de células tumorais circulantes (CTC) no sangue periférico venoso pela expressão da CK19 por CF;
- Verificar se a detecção em células CK19 no sangue periférico por CF pode diminuir o tempo de detecção de metástase na paciente clinicamente sem metástase (cM0).

## **4. ESTUDO RETROSPECTIVO:**

### **4.1. METODOLOGIA**

#### **4.1.1. Caracterização da população de estudo**

##### *4.1.1.1. Seleção dos pacientes*

Foi realizada uma busca retrospectiva no arquivo de laudos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (SAP/HU/UFSC), Florianópolis, Brasil, que compreendeu os períodos entre janeiro de 1994 e dezembro de 2018. Foram selecionados 1.335 casos de carcinoma de mama invasivos em mulheres, consecutivamente. Todas as pacientes tiveram diagnóstico de carcinoma de mama invasivo e seguiram seus tratamentos de acordo com os protocolos dos serviços especializados.

##### *4.1.1.2. Critérios de inclusão e de exclusão*

Os critérios de inclusão deste estudo foram: i) sexo feminino; ii) diagnóstico histológico de carcinoma mamário invasivo. Os critérios de exclusão foram: i) material não encontrado no arquivo; ii) material sem análise do IHC; iii) ausência de dados clínicos no prontuário; iv) casos de pacientes masculinos.

##### *4.1.1.3. Aspectos éticos*

O estudo foi aprovado pela pesquisa com seres humanos da UFSC (Parecer comprovado Projeto 141/2005 e Comitê de Ética e Pesquisa do Ser Humano da UFSC CAAE 52861715.0.0000.0121).

#### **4.1.2. Características clínicas e morfológicas**

##### *4.1.2.1. Coleta de dados*

Os dados foram coletados a partir dos laudos anátomo patológicos de 1.335 carcinomas invasivos de mama. Dos registros foram obtidas informações referentes à idade, tipo histológico, grau histológico, grau nuclear, biomarcadores RE, RP, HER2 e índice proliferativo. As amostras referentes aos anos entre 1994 e 2004 foram encaminhadas para o Instituto de Patologia Molecular e Imunologia da Universidade do Porto, Portugal (IPATIMUP) de forma experimental, por não haver rotineiramente IHC para tumores de

mama no SAP/HU/UFSC, e do banco de dados foram coletados os resultados. O estudo do IHQ das amostras de 2005 a 2018 ocorreu no SAP/HU/UFSC. Os critérios adotados no momento do diagnóstico foram revisados por um patologista sênior, de fevereiro a novembro de 2019.

#### 4.1.2.2. Critérios clínicos e morfológicos

A idade foi referida em anos completos no diagnóstico e dividida em três faixas etárias: Grupo 1: < 50 anos, Grupo 2: 50-69 anos, Grupo 3:  $\geq$  70 anos. A população de *screening* foi determinada neste estudo como grupo 2 (idade entre 50-69 anos) (WHO, 2019). Para avaliação do tipo histológico, os tumores foram avaliados em carcinoma de mama invasivo não tipo especial (CDI NST) e carcinoma lobular invasivo (CLI), nos casos com negatividade para e-caderina ao exame de IHC (WHO, 2019). Para avaliação do grau histológico três características foram analisadas: formação de túbulo, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. Cadavariável foi avaliada independentemente com base no grau histológico combinado de Nottingham para carcinoma invasivo de mama (ELSTON and ELLIS, 1991). Um sistema de pontuação numérica de 1 a 3 foi utilizado para determinar os escores (Grau 1: bem diferenciado; Grau 2: moderadamente diferenciado; Grau 3: pouco diferenciado). O grau nuclear foi avaliado por tamanho e pleomorfismo, divididos em 3 escores (Grau 1: baixo grau; Grau 2: grau intermediário; Grau 3: alto grau (ELSTON and ELLIS, 1991).

#### 4.1.3. Critérios Imuno-Histoquímicos

Os critérios utilizados para avaliação IHC para o *status* dos receptores hormonais (RH) (RE e PR) foram consideradas imunomarcações positivas se pelo menos 1% dos núcleos das células tumorais fossem marcados (AMIN, et al., 2017); para o *status* HER2, foram considerados positivos se pelo menos 10% das células tumorais apresentassem um escore de coloração da membrana celular de 3+ (forte e contínua). Se a marcação fraco/moderado fosse > 10% foram considerados resultados equívocos (2+) ou foram considerados negativos sem esses critérios (AMIN, et al., 2017; WOLFF, et al., 2018; WHO, 2019). Para o índice de proliferação celular (Ki-67), neste estudo o percentual médio de positividade nuclear foi avaliado em dois pontos de corte: i) baixo índice se expressão nuclear menor que 15%; ii) alto índice se expressão nuclear maior ou igual a 15%. Nos casos discordantes foi correlacionado



com contagem mitótica. (CHEANG, et al., 2009; AMIN, et al., 2017; SOLIMAN and YUSSIF, 2016; WHO, 2019).

#### 4.1.4. Definição de Subtipos do Carcinoma de Mama por Imuno-Histoquímica

Foram definidos dois grupos com base na avaliação da IHQ dos biomarcadores ER, PR, HER2, Ki67. O primeiro grupo, rotulado como “Grupo 1”, os critérios foram baseados na 13ª Conferência de St. Gallen, através da análise de quatro biomarcadores IHQ mencionados acima. A classificação dos biomarcadores agrupados resultou em cinco subtipos, como apresentado na Tabela 5 (GOLDHIRSCH, et al., 2013). O segundo grupo, rotulado como “Grupo 2” neste estudo adotou dois biomarcadores com base no status RE e HER2 e definiu quatro subtipos, conforme Tabela 6 (WHO, 2019).

Tabela 5. Distribuição de quatro biomarcadores para caracterização de subtipos IHQ com base na Conferência de St. Gallen.

Subtipos IHC - Grupo 1	RE	PR	HER2+	Ki67
Luminal A	+	+/-	-	baixo
Luminal B/HER2-	+	+/-	-	alto
Luminal B/HER2+	+	+/-	+(3+)	qualquer
HER2+	-	-	+(3+)	qualquer
TNBC	-	-	-	qualquer

IHQ: subtipos imuno-histoquímicos; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; Ki67: Marcador de Proliferação; TNBC: carcinoma de mama triplo negativo; +: positivo; -: negativo; +/-: positivo ou negativo; +(3+): positivo se pelo menos 10% das células tumorais apresentaram um escore de coloração da membrana celular de 3+.

Tabela 6. Distribuição de Subtipos com base no status do RE e HER2.

Subtipos IHC – Grupo 2	RE	HER2+
ER +/HER2-	+	-
ER +/HER2+	+	+(3+)
ER -/HER2+	-	+(3+)
ER -/HER2-	-	-

IHC: subtipos imuno-histoquímicos; RE: receptor de estrogênio; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; +: positivo; -: negativo; +(3+): positivo se pelo menos 10% das células tumorais apresentaram um escore de coloração da membrana celular de 3+.

#### 4.1.5. Análise Estatística

As frequências e os respectivos percentuais foram estimados para cada variável de interesse. Associações univariadas foram estimadas por meio de testes qui-quadrado. Foram estimados índices de chances e intervalos de confiança de 95%. A concordância entre o Grupo 1 e o Grupo 2 foi testada utilizando-se os coeficientes kappa de Cohen. Os cálculos foram realizados no STATA/SE v.14.0 (Stata Soft, College Station, TX, USA). A significância estatística foi definida em alfa < 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. Descrição da Amostra

Como pode ser observado na Tabela 7, a maioria dos casos ocorreu em mulheres com idade entre 50 e 69 anos (Grupo 2), com frequência de 48,8% ( $n = 652$ ) da amostra.

Tabela 7. Dados demográficos da amostra.

	Casos	Idade (anos)	
	% (N)	Média ± DP	Mediana (menor idade e maior idade)
<b>Grupo 1 idade</b>	35.0(467)	42.4 ± 5,5	44 (24 – 49)
<b>Grupo 2 idade</b>	48.8(652)	58.9 ± 5,5	59 (50 – 74)
<b>Grupo 3 idade</b>	16.2(216)	77.4 ± 5,8	77 (70 – 96)
<b>Total</b>	100(1335)	56.1 ± 13,2	55 (24 – 96)

N: número de casos; faixa etária variável em anos: G1= Grupo 1 <50 anos, G2= Grupo 2: 50-69 anos, G3= Grupo 3: ≥70 anos.

O tipo histológico predominante foi o CDI NST com prevalência de 92,5% ( $n = 1235$ ) seguido pelo CLI, presente em 7,5% ( $n = 100$ ) dos casos.

Através da Tabela 8 pode-se observar que as variáveis morfológicas mais prevalentes foram grau histológico 2 (G2) e grau nuclear 2 (G2) com frequência de 46,2% e 50,8% respectivamente.

Tabela 8. Frequência de características morfológicas

	<b>Grau Histológico</b>	<b>Grau Nuclear</b>
	<b>% (N)</b>	<b>% (N)</b>
<b>G1</b>	24.3 (325)	13.4 (179)
<b>G2</b>	46.2 (617)	50.8 (678)
<b>G3</b>	29.5 (393)	35.8 (478)
<b>Total</b>	100 (1335)	100 (1335)

N: número de casos; variável grau histológico (G1= Grau 1/ bem diferenciado; G2= Grau 2/moderadamente diferenciado; G3= Grau 3/mal diferenciado) e variável grau nuclear (G1= Grau 1/baixo grau; G2= Grau 2/grau intermediário; G3 Grau 3/ alto grau).

A expressão dos biomarcadores demonstrada na Tabela 9 revela que 75,3 % dos casos dos CDI NST foi positivo para RE e que 16,6% (n= 221) dos casos apresentou superexpressão da oncoproteína HER2.

Tabela 9. Frequência dos biomarcadores nas amostras de carcinoma invasivo da mama

	<b>RE</b>	<b>RP</b>	<b>HER2</b>
	<b>% (N)</b>	<b>% (N)</b>	<b>% (N)</b>
<b>Positive</b>	75.3 (1005)	62.0 (828)	16.6 (221)
<b>Negative</b>	24.7 (330)	38.0 (507)	70.7 (944)
<b>Equivocal</b>	-	-	12.7 (170)
<b>Total</b>	100 (1335)	100 (1335)	100 (1335)

Grupo variável Biomarcadores RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; com base em resultados imuno-histoquímicos.

De acordo com os critérios da conferência de St Gallen, o subtipo luminal foi o de maior prevalência (65,3%) quando comparado aos outros subtipos (Tabela 10). Desses, 32,0% (n= 427) foram do tipo luminal B/HER2-, seguidos pelo luminal A com 23.4% (n= 313). O TNBC foi o segundo subtipo mais prevalente, com 14,1% (n= 188) dos casos, seguido pelo HER2+ com 6,7% (n= 89) dos casos.

Tabela 10. Prevalência dos subtipos IHQ de acordo com a Conferência de St Gallen (Grupo 1).

Subtipos	RE	RP	HER2+	Ki-67	% (N)
<b>Luminal A</b>	+	+/-	-	Low	23.4 (313)
<b>Luminal B/HER2-</b>	+	+/-	-	High	32.0 (427)
<b>Luminal B/HER2+</b>	+	+/-	+(3+)	Any	9.9 (132)
<b>HER2+</b>	-	-	+(3+)	Any	6.7 (89)
<b>TNBC</b>	-	-	-	Any	14.1 (188)
<b>Indeterminado</b>	+/-	+/-	+(2+)	Any	12.7 (170)
<b>Não classificado</b>	-	+	Any	Any	1.2 (16)
<b>Total</b>					100 (1335)

IHC: subtipos imuno-histoquímicos; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; Ki67: Marcador de Proliferação; TNBC: carcinoma de mama triplo negativo; +: positivo; -: negativo; +/-: positivo ou negativo; +(3+): positivo se pelo menos 10% das células tumorais apresentaram um escore de coloração da membrana celular de 3+; N: número de casos.

Como pode ser observado na Tabela 11, que mostra a distribuição dos subtipos utilizando biomarcadores RE/HER2, os imunofenótipos RE+/HER2- e RE-/HER2- foram as mais frequentes nas pacientes incluídas neste estudo como percentual de 55,4% e 15,3 %, respectivamente.

Tabela 11. Distribuição dos Subtipos IHQ pelos biomarcadores RE/HER2 (Grupo 2).

Subtypes RE/HER2	RE	HER2+	% (N)
<b>RE+/HER2-</b>	+	-	55.4 (740)
<b>RE+/HER2+</b>	+	+(3+)	9.4 (125)
<b>RE-/HER2+</b>	-	+(3+)	7.2 (96)
<b>RE-/HER2-</b>	-	-	15.3 (204)
<b>Equivocal</b>	+/-	+(2+)	12.7 (170)
<b>Total</b>			100 (1335)

IHC: subtipos imuno-histoquímicos; RE: receptor de estrogênio; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; por análises no: +: positivo; -: negativo; +(3+): positivo se pelo menos 10% das células tumorais apresentaram um escore de coloração da membrana celular de 3+; N: número de casos.

Na Tabela 12 percebe-se que 100% dos casos de HER2+ foi de CD1 NST. Em relação aos grupos etários, no grupo 1 (<50 anos) o subtipo mais prevalente foi luminal B/HER2+ (50,8%), no grupo 2 (50-69) o subtipo HER2+ (57,3%) e no grupo 3 ( $\geq$  70 anos) o subtipo luminal A (21,1%). Os subtipos luminais A, luminal B/HER2-, HER2+ e TNBC foram mais prevalentes nas mulheres do grupo 2 com 48,2% e 52,5%, 57,3% e 42,6, respectivamente; ao passo que luminal B/ HER2+ foi mais prevalente nas mulheres do grupo

1. Além destes achados, 51,8% dos subtipos denominados luminais A corresponderam ao grau histológico 1, 53,9% dos luminal B/HER2- foram grau histológico 2 e 71,8% dos TNBC foram grau histológico 3. Em relação ao grau nuclear, destaca-se que mais de 2/3 dos tumores com grau nuclear 3 (69.1%) corresponderam ao TNBC.

Tabela 12. Frequência de subtipos do Grupo 1 e os tipo histológico, faixas etárias e características morfológicas.

	Luminal A % (N)	Luminal B/HER2- % (N)	Luminal B/HER2+ % (N)	HER2+ % (N)	TNBC % (N)
<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>					
<b>CDI NST</b>	86.9 (272)	91.8 (392)	96.2 (127)	100 (89)	96.8 (182)
<b>CLI</b>	13.1 (41)	8.2 (35)	3.8 (5)	0.0 (0)	3.2 (6)
<b>Total</b>	100 (313)	100 (427)	100 (132)	100 (89)	100 (188)
<b>GRUPO IDADE</b>					
<b>G1</b>	30.7 (96)	33.7 (144)	50.8 (67)	24.7 (22)	38.8 (73)
<b>G2</b>	48.2 (151)	52.5 (224)	40.9 (54)	57.3 (51)	42.6 (80)
<b>G3</b>	21.1 (66)	13.8 (59)	8.3 (11)	18.0 (16)	18.6 (35)
<b>Total</b>	100 (313)	100 (427)	100 (132)	100 (89)	100 (188)
<b>GRAU HISTOLÓGICO</b>					
<b>G1</b>	51.7 (162)	22.2 (95)	12.9 (17)	7.9 (7)	5.3 (10)
<b>G2</b>	46.3 (145)	53.9 (230)	53.0 (70)	42.7 (38)	22.9 (43)
<b>G3</b>	1.9 (6)	23.9 (102)	34.1 (45)	49.4 (44)	71.8(135)
<b>Total</b>	100 (313)	100 (427)	100 (132)	100 (89)	100 (188)
<b>GRAU NUCLEAR</b>					
<b>G1</b>	29.1 (91)	11.9 (51)	4.6 (6)	3.4 (3)	3.2 (3)
<b>G2</b>	60.1 (188)	60.9 (260)	44.7 (59)	37.1 (33)	27.7 (52)
<b>G3</b>	10.8 (34)	27.2 (116)	50.7 (67)	59.5 (53)	69.1 (130)
<b>Total</b>	100 (313)	100 (427)	100 (132)	100 (89)	100 (188)

N: número de casos; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; TNBC: carcinoma de mama triplo negativo; grupo variável: tipo histológico: CDI NST= carcinoma mamário invasivo sem tipo especial e CLI = carcinoma lobular invasivo; grupo variável: faixa etária (faixa etária em anos: G1= Grupo 1 <50 anos, G2= Grupo 2: 50-69 anos, G3= Grupo 3: ≥70 anos) grupo variável: grau histológico (G1= Grau 1/ bem diferenciado; G2= Grau 2/moderadamente diferenciado; G3= Grau 3/mal diferenciado) e grau nuclear variável (G1= Grau 1/baixo grau; G2= Grau 2/grau intermediário; G3 Grau 3/Alto Grau) e os cinco subtipos moleculares.

Na Tabela 13 apresenta que 99% dos subtipos RE-/HER2+ foram CDI NST. Em relação a frequência entre as categorias idade, mulheres do grupo etário 1 apresentaram o subtipo RE+/HER2+ (52,0%), como o mais prevalente, enquanto nas do grupo 2, o subtipo

mais prevalente foi o RE-/HER2+ (58,3%) e no grupo 3 foi o RE-/HER2- (17,6%). Em relação a variável grau de diferenciação, tumores pouco diferenciados (G3), foram predominantemente dos subtipos RE-/HER2- (70,6%), enquanto para a variável grau nuclear, o fenótipo RE-/HER2- foi o mais frequente nos tumores de grau nuclear 3 (69,6%).

Tabela 13. Frequência dos biomarcadores RE e HER2 nos CDI NST e CLI, nos grupos etários e nas características morfológicas relacionadas ao grau histológico e ao grau nuclear

	RE+/HER2- % (N)	RE+/HER2+ % (N)	RE-/HER2+ % (N)	RE-/HER2- % (N)
<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>				
CDI NST	89.7 (664)	96.8 (121)	99.0 (95)	97.1 (198)
CLI	10.3 (76)	3.2 (4)	1.0 (1)	2.9 (6)
<b>Total</b>	100 (740)	100 (125)	100 (96)	100 (204)
<b>GRUPO IDADE</b>				
G1	32.4 (240)	52.0 (65)	25.0 (24)	38.2 (78)
G2	50.7 (375)	39.2 (49)	58.3 (56)	44.1 (90)
G3	16.9 (125)	8.8 (11)	16.7 (16)	17.7 (36)
<b>Total</b>	100 (740)	100 (125)	100 (96)	100 (204)
<b>GRAU HISTOLÓGICO</b>				
G1	34.7 (257)	13.6 (17)	7.3 (7)	5.4 (11)
G2	50.7 (375)	52.8 (66)	43.7 (42)	24.0 (49)
G3	14.6 (108)	33.6 (42)	49.0 (47)	70.6 (144)
<b>Total</b>	100 (740)	100 (125)	100 (96)	100 (204)
<b>GRAU NUCLEAR</b>				
G1	19.2 (142)	4.8 (6)	3.1 (3)	2.9 (6)
G2	60.5 (448)	44.8 (56)	37.5 (36)	27.5 (56)
G3	20.3 (150)	50.4 (63)	59.4 (57)	69.6 (142)
<b>Total</b>	100 (740)	100 (125)	100 (96)	100 (204)

N: número de casos; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; TNBC: carcinoma de mama triplo negativo; grupo variável: tipo histológico: CDI NST= carcinoma mamário invasivo sem tipo especial e CLI = carcinoma lobular invasivo; grupo variável: faixa etária (faixa etária em anos: G1= Grupo 1 <50 anos, G2= Grupo 2: 50-69 anos, G3= Grupo 3: ≥70 anos) grupo variável: grau histológico (G1= Grau 1/ bem diferenciado; G2= Grau 2/moderadamente diferenciado; G3= Grau 3/pouco diferenciado) e grau nuclear variável (G1= Grau 1/baixo grau; G2= Grau 2/grau intermediário; G3 Grau 3/Alto Grau) e os quatro subtipos moleculares.

#### 4.2.2. Associações Univariadas

Na Tabela 14 pode-se identificar que a chance de ser não luminal A (subtipos: luminal B/HER2-, luminal B/HER2+, HER2+ e TNBC), na faixa etária do grupo 3 ( $\geq 70$  anos) foi 1,56 vezes menor que nos casos controle. Na comparação entre os biomarcadores RE/HER2 observou-se no grupo etário 1 (idade  $< 50$  years) que a chance de ser não RE+/HER2- foi 1,28 vezes maior que nos casos controle. As demais comparações com a idade e os subtipos descritos na Tabela 14, não apresentaram associações estatisticamente significantes.

Tabela 14. Padrão de associação entre a prevalência de subtipos pelo Consenso de St Gallen e os biomarcadores RE/HER2 por faixas etárias.

Grupo idade			OR	95% CI	*p
	não luminal A	luminal A			
G1	371	96	1.29	0.98 – 1.70	0.0680
	651	217			
G2	500	151	1.02	0.80 – 1.32	0.8330
	522	162			
G3	151	66	0.64	0.47 – 0.90	*0.0084
	871	247			
	TNBC	não TNBC			
G1	73	394	1.21	0.88 – 1.66	0.2331
	115	753			
G2	80	571	0.74	0.54 – 1.02	0.0667
	108	576			
G3	35	182	1.21	0.81 – 1.81	0.3442
	153	965			
	não RE+/HER2-	RE+/HER2-			
G1	227	240	1.28	1.02 – 1.61	*0.0296
	368	500			
G2	276	375	0.84	0.68 – 1.04	0.1193
	319	365			
G3	92	125	0.90	0.67 – 1.20	0.4817
	503	615			
	RE-HER2-	Não RE-HER2-			
G1	78	389	1.18	0.87 – 1.60	0.2901
	126	742			
G2	90	561	0.80	0.59 – 1.08	0.1497
	114	570			
G3	36	181	1.12	0.75 – 1.66	0.5583
	168	950			

OR: odds ratios; IC 95%: intervalos de confiança de 95%; A significância estatística foi definida em alfa  $< 5\%$  ( $p < 0,05$ ). Variável (faixa etária em anos: G1= Grupo 1  $< 50$  anos, G2= Grupo 2: 50-69 anos, G3= Grupo 3:  $\geq 70$  anos) subtipos IHQ (Não Luminal A, TNBC: carcinoma de mama triplo negativo, Não-RE+/HER2-, RE-/HER2- : RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, por análises em: +: positivo; -: negativo;).

Nas Tabelas 15 e 16 descreve-se as razões de chance e seus respectivos intervalos de de confiança (95%), entre grau histológico e grau nuclear. Associação foi encontrada entre o G3 histológico e os piores subtipos prognósticos: Não luminal A (OR = 31,18; IC 95 % =



13,76 – 70,64), TNBC (OR = 8,77; IC 95% = 6,20 – 12,41), não-ER+/HER2- (OR = 5,37; IC 95% = 4,11 – 7,04) e ER-/HER2- (OR = 8,50; 95% IC = 6,10 – 11,85). Além disso, verificou-se correlação semelhante para o grau 3 nuclear (G3): não luminal A (OR = 6,3; IC 95 % = 4,29 – 9,47), TNBC (OR = 5,14; IC 95% = 3,64 – 7,31), não-ER+/HER2- (OR = 4,83; IC 95% = 3,80 – 6,15) e ER-/HER2- (OR = 5,41; IC 95% = 3,92 – 7,50).

Tabela 15. Padrão de associação entre a prevalência de subtipos pelo Consenso de St Gallen e os biomarcadores ER/HER2 pelo grau histológico.

Grau histológico			OR	95% CI	*p
	não luminal A	luminal A			
G1	163	162	0.17	0.13 to 0.23	*<0.001
	859	151			
G2	472	145	1.0	0.77 to 1.28	0.9649
	550	168			
G3	387	6	31.18	13.76 to 70.64	*<0.001
	635	307			
TNBC		não TNBC			
G1	10	315	0.14	0.07 to 0.28	*<0.001
	178	832			
G2	43	574	0.30	0.20 to 0.42	*<0.001
	145	573			
G3	135	258	8.77	6.20 to 12.41	*<0.001
	53	889			
nãoRE+/HER2-		ER+/HER2-			
G1	68	527	0.24	0.17 to 0.32	*<0.001
	257	483			
G2	242	353	0.66	0.53 to 0.83	*0.0003
	375	365			
G3	285	310	5.37	4.11 to 7.04	*<0.001
	108	632			
ER-HER2-		nãoRE-HER2-			
G1	11	314	0.14	0.08 to 0.27	*<0.001
	193	817			
G2	49	568	0.31	0.22 to 0.44	*<0.001
	155	563			
G3	144	249	8.50	6.10 to 11.85	*<0.001
	168	950			

OR: odds ratios; IC 95%: intervalos de confiança de 95%; A significância estatística foi definida em alfa <5% (p < 0,05). Grupo variável: categoria de grau histológico (Histológico: G1- Grau 1/bem diferenciado; G2= Grau 2/moderadamente diferenciado; G3= Grau 3/pouco diferenciado) subtipos IHQ (Não Luminal A, TNBC: carcinoma de mama triplo negativo, Não-ER+/HER2-, ER-/HER2-: RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, por análises em: +: positivo; -: negativo;).

Tabela 16. Padrão de associação entre a prevalência de subtipos pelo Consenso de St Gallen e os biomarcadores ER/HER2 com o grau nuclear.

Grau nuclear		OR	95% CI	*p	
	não luminal A	luminal A			
G1	88	934	0.22	0.16 to 0.32	*<0.001
	91	222			
G2	490	532	0.61	0.47 to 0.80	*0.0002
	188	125			
G3	444	578	6.3	4.29 to 9.47	*<0.001
	34	279			
	TNBC	não TNBC			
G1	6	182	0.18	0.07 to 0.42	*<0.001
	173	974			
G2	52	136	0.31	0.22 to 0.45	*<0.001
	626	521			
G3	130	58	5.14	3.64 to 7.31	*<0.001
	348	799			
	nãoRE+/HER2-	RE+/HER2-			
G1	37	142	0.27	0.19 to 0.40	*<0.001
	558	598			
G2	230	448	0.41	0.32 to 0.51	*<0.001
	365	292			
G3	328	150	4.83	3.80 to 6.15	*<0.001
	267	590			
	ER-HER2-	não ER-HER2-			
G1	6	173	0.16	0.07 to 0.38	*<0.001
	198	958			
G2	56	622	0.31	0.22 to 0.43	*<0.001
	148	509			
G3	142	336	5.41	3.92 to 7.50	*<0.001
	62	795			

OR: odds ratios; IC 95%: intervalos de confiança de 95%; A significância estatística foi definida em alfa <5% (p < 0,05). Grupo variável: categoria de grau nuclear (G1= Grau 1/baixo grau; G2= Grau 2/grau intermediário; G3 Grau 3/ alto grau); subtipos IHQ (Não Luminal A, TNBC: carcinoma de mama triplo negativo, Não-RE+/HER2-, RE-/HER2-: RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, por análises em: +: positivo; -: negativo).

### 4.2.3. Concordância entre as Classificações

Como pode ser visualizado na Tabela 17, o percentual de concordância entre os subtipos luminal A e luminal B/HER2- agrupados, comparados aos biomarcadores RE+/HER2- foi igual a 100%, o que corresponde a um coeficiente de concordância kappa de Cohen igual a 1 (Std. Err. (SE) =0,03;  $p<0,001$ ). Entre o subtipo luminal B/HER2+ e os biomarcadores RE+/HER2+ foi igual a 99,48%, o que corresponde a um coeficiente de concordância kappa de Cohen igual a 0,97 (SE=0,02;  $p<0,001$ ). Entre o subtipo HER2+ e os biomarcadores RE-/HER2+, foi igual a 99,48%, com um coeficiente de concordância kappa de Cohen igual a 0,96 (SE=0,03;  $p<0,001$ ) e finalmente o percentual de concordância entre os subtipos TNBC e os biomarcadores RE-/HER2- foi igual a 100%, correspondendo a um coeficiente de concordância kappa de Cohen igual a 1 (SE=0,03;  $p<0,001$ ).

Tabela 17. Concordância entre os subtipos do Grupo 1 e os subtipos do Grupo 2 pelo Kappa de Cohen.

GRUPO 1	GRUPO 2	CONCORDÂNCIA	KAPPA DE COHEN	STANDARD ERROR	P
Luminal A e luminal B/HER2-	RE+/HER2-	100%	1	0,03	$p<0,001$
Luminal B/HER2+	RE+/HER2+	99,48%	0,97	0,02	$p<0,001$
HER2+	RE-/HER2+	99,48%	1	0,03	$p<0,001$
TNBC	RE-/HER2-	100%	0,96	0,03	$p<0,001$

O grupo 1 representa os subtipos descritos no Consenso de St Gallen (luminal A e luminal B/HER2- agrupados; luminal B/HER2+; Her2+ e TNBC/triplo negativo) e grupo 2 os biomarcadores RE/HER2, RE receptores de estrogênio e oncoproteína HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, por análises em: +: positivo; -: negativo).

### 4.3. DISCUSSÃO

O carcinoma de mama é um dos principais problemas de saúde pública e é o câncer mais comum entre as mulheres no mundo. Mas, apesar de muitos programas de rastreamento com técnicas de imagem, o diagnóstico laboratorial utilizando biomarcadores é parte essencial para descrever o subtipo que define tratamento, prognóstico e vigilância da doença após o tratamento (WHO, 2019).

Neste estudo foram analisados 1335 casos de mulheres com diagnóstico de carcinoma de mama, atendidas em um hospital público no Brasil entre 1994 e 2018, para investigar o perfil epidemiológico e estabelecer uma correlação entre dois modelos de análise imunohistoquímica, que são importantes para a decisão do melhor tratamento das pacientes portadoras dessa neoplasia. No presente estudo o carcinoma de mama foi mais frequentemente observado em mulheres do grupo etário 2, com idade entre 50 e 69 anos (48.8%), e o tipo histológico predominante foi o CDI NST (92.5%) seguido pelo CLI (7,5%). Em relação ao grau morfológico, o G2, tanto histológico quanto o nuclear, foi o mais frequente, presente respectivamente em 46.2% e 50.8% da amostra (Tabela 8). Esses resultados corroboram com os dados da literatura, que descrevem essa faixa etária como a de maior incidência, além do grau e do tipo histológico mais prevalente como o G2 e o CDI NST, respectivamente (WHO, 2019).

Importante ressaltar que essa é a faixa etária de *screening* para o rastreio da doença e que os tumores desse grupo são predominantemente RH positivos, seguida pelos duplos negativos (ER-/HER2-) em 13 a 17% e HER2+ (10 – 15%). Fora dessa faixa etária, os casos são mais frequentes são o ER-/HER2- (20-40%) e o HER2+ (15-25%) (WILLIANS, et al., 2006; AHN, et al., 2015; WHO, 2019; INCA, 2020). No presente estudo, a análise dos grupos etários mostrou dois resultados relevantes, o primeiro foi que mulheres acima de 70 anos tiveram 1,56 vezes menos chance de desenvolver tumor não luminal A, e o segundo, mulheres com idade menor que 50 anos tiveram 1,28 vezes mais chance de desenvolverem tumores ER+/HER2+, ER-/HER2+ e ER-/HER2-, que são tumores de pior prognóstico (PRAT and PEROU, 2010). Entretanto, não houve diferenças entre as idades e a razão de chance de ter tumores de pior prognóstico nas outras faixas etárias discriminadas (Tabela 14).

A graduação histológica dos tumores é um fator prognóstico consistente para orientar a terapia adjuvante nos carcinomas invasivos (WHO, 2019). Os critérios anátomo patológicos tradicionalmente são utilizados para determinar o prognóstico de carcinoma de mama, com possíveis associações dos perfis de expressão gênica observados pela IHC (VIEIRA, et al.,

2008; AMIN, et al., 2017; WHO, 2019). O grau histológico 3 é associado com a indiferenciação nuclear e maior agressividade da doença, por isso, é considerado um fator de mau prognóstico (VIEIRA, et al., 2008; DING, et al., 2019; WHO, 2019). Ao verificar a relação dos resultados entre os subtipos e as características morfológicas, foi identificado que tumores de grau histológico bem diferenciado foram mais frequentes no subtipo luminal A, enquanto os tumores pouco diferenciados foram identificados com maior frequência nos subtipos HER2+ e TNBC (Tabela 12).

Na rotina laboratorial, os biomarcadores RE, PR e HER2 são universalmente usados em CDI (BERTUCCI, et al., 2006; EIERMANN, et al., 2012; AHN, et al., 2015; WHO, 2019). Destaca-se que todos os CDI podem ser agrupados dentro de uma sequência de subtipos definidos pelos biomarcadores RE e HER2 (WILLIAMS, et al., 2006; ALMEIDA, et al., 2012; WHO, 2019). Esses biomarcadores estão relacionados com terapêuticas específicas e são importantes no tratamento do carcinoma de mama (PAYNE, et al., 2008). No presente estudo os resultados dos biomarcadores por IHC foram positivos para RE em 75,3%, RP em 62% e HER2 em 16,6% das amostras (Tabela 9). O RE pode estar presente em 60 a 75% dos carcinomas invasivos da mama (SORLIE T, 2004; BRAUN, et al., 2013), por isso, a sua análise deve ser realizada em todos os tumores primários da mama, preferencialmente por IHC, pois são um fator prognóstico e preditivo importante, com benefício ao tratamento adjuvante (PRAT e PEROU, 2010; AHN, et al., 2015). Tumores com RE positivo, sofrem inibição do crescimento tumoral com terapias antiestrogênicas (PAYNE, et al., 2008; BURSTEIN, et al., 2014). O RP, presente em até 65% dos casos de carcinoma de mama tem maior associação com a sobrevida global, mas as estimativas ainda não estão bem estabelecidas (BRAUN, et al., 2013; BURSTEIN, et al., 2014). O gene Her-2/neu amplificado ou a superexpressão da sua oncoproteína está presente em 20 a 30 % dos tumores de mama e é associado a tumores de pior prognóstico (PRAT and PEROU, 2010; NG, et al., 2015; WHO, 2019). A sua amplificação tem sido usada como fator preditivo e prognóstico de resposta a terapia alvo trastuzumabe (SHAK S., 1999; PRAT e PEROU, 2010).

Uma das questões importantes abordadas foi neste trabalho foi a associação entre os tumores de alto grau (G3 histológico e G3 nuclear) com os subtipos de pior prognóstico (Tabelas 15 e 16). Através da análise univariada, tumores G3 histológico apresentaram 31,18 vezes mais chance de serem o subtipo não luminal A, 8,77 vezes mais chance de serem do subtipo TNBC, 5,37 vezes mais chance de serem subtipo não RE+/HER2- e 8,50 vezes mais chance de terem o subtipo RE-/HER2-, em relação aos casos controle. Os casos de G3 nucleartiveram 6,3 vezes mais chance de serem do subtipo não luminal A, 5,14 vezes mais chance de

serem do subtipo TNBC, 4,83 vezes mais chance de serem do subtipo não RE+/HER2- e 5,41 vezes mais chance de serem do subtipo RE-/HER2- em relação aos controles. Essa evidência revelou uma associação dos casos que apresentaram características morfológicas de agressividade (G3 nuclear e histológico) com os subtipos IHQ mais agressivos. Os resultados das razões de chance (OR) descritos nas Tabelas 15 e 16, vem de encontro aos caracterizados pela literatura como os subtipos de pior prognóstico, que descrevem os imunofenótipos luminal B, TNBC e HER2+, como tumores de alto grau morfológico e com alto risco de recorrência (FAN, et al., 2006; PRAT and PEROU, 2010).

Pela análise da frequência dos subtipos IHQ de acordo com o St Gallen Consensus 2013 (GOLDHIRSCH, et al., 2013), a distribuição dos subtipos deste estudo foi de 23,4% de casos luminal A, 32,0% de luminal B/HER2-, 9,9% luminal B/HER2+, 6,7% HER2+ e 14,1% TNBC (Tabela 10). Da mesma forma, a análise de frequência utilizando os dois biomarcadores agrupados, ER e HER2, revelou 55,4% de ER+/HER2-, 9,4% de ER+/HER2+, 7,2% de ER-/HER2+ e 15,3% de ER-/HER2- (Tabela 11). De acordo com a literatura, o luminal A inicialmente era o subtipo mais comum, porém, com a aplicação dos critérios do consenso de St Gallen (GOLDHIRSCH, et al., 2013), atualmente, o subtipo mais comum passou a ser o luminal B (GOLDHIRSCH, et al., 2013; AHN, et al., 2015). A partir desse rearranjo, o tipo luminal A foi posicionado no grupo de tumores indolentes, de melhor prognóstico e mais sensível à terapia endócrina e os subtipos luminal B (tanto HER2- quanto HER2+) são mais agressivos, apresentam índice proliferativo alto, tem pior prognóstico e são menos sensíveis a terapia endócrina (AHN, et al., 2015; FOULKES, SMITH, REIS-FILHO, 2010). É importante ressaltar que embora tenha sido observada a associação entre os casos luminal A e luminal B/HER2- (Tabela 10) com o grupo ER+/HER2- (Tabela 11), não há possibilidade de distinguir subtipos (luminal A e luminal B/HER2-) no uso dessa metodologia pela falta de avaliação do índice proliferativo (AHN, et al., 2015). Assim, é necessário encontrar biomarcadores que possam diferenciar entre um ou outro subtipo (PRAT and PEROU, 2010). Uma grande diferença biológica entre os luminais A e B é a expressão de marcadores de proliferação, os quais se apresentam mais altos nos tumores luminais B do que nos tumores luminais A (CHEANG, et al., 2009; NIELSEN, et al., 2010).

O grau histológico também reflete essa diferença de proliferação (Tabela 15). Dentro desses conceitos de subdivisão de subtipos, destaca-se que o índice do Ki-67 é importante para definir e estratificar tumores entre os subtipos luminal A e B, especialmente o luminal B/HER2-, o que torna a metodologia útil para prever o prognóstico, resposta a quimioterapia ou à terapia endócrina, além de estimar risco residual na neoadjuvância (AHN, et al., 2015).

Destaca-se ainda a importância em detectar pacientes com baixo risco de recidiva, os quais são encontrados quase exclusivamente no subtipo luminal A (PAIK, et al., 2004; BURSTEIN, et al., 2014). De fato, a proliferação é um dos principais fatores determinantes da maioria dos preditores genômicos projetados para separar tumores em subgrupos prognósticos (BURSTEIN, et al., 2014). Destaca-se nos resultados que mesmo com as limitações pela falta de avaliação de biomarcadores de proliferação, uma possível avaliação criteriosa utilizando aspectos do exame morfológico clássico de gradação de Nottingham (ELSTON and ELLIS, 1991) possa auxiliar na divisão entre os casos de melhor e pior resposta a terapia adjuvante, pois os resultados deste trabalho demonstraram que houve equivalência entre as análises de associações univariadas e a análise de concordância entre as classificações (Tabela 15, Tabela 16 e item 3.4.3 (concordância entre a classificações).

Neste trabalho, os casos HER2+ foram separados em luminal B/HER2+ e HER2+, de acordo com os critérios da conferência de St Gallen (GOLDHIRSCH, et al., 2013) (Tabela 5). Na Tabela 9, pode-se observar que a superexpressão dessa oncoproteína está presente em 16,6% dos casos estudados, e quando analisada em relação aos subtipos como descritos na Tabela 5, representam 9,9% e 6,7% dos casos de luminal B/HER2+ e HER2+, respectivamente (Tabela 10). A frequência do subtipo HER2+ em relação ao grau histológico 2 e 3 foi de 42,7% e 49,4%, respectivamente (Tabela 12). De acordo com o descrito na literatura, CDI de subtipo HER2+ estão relacionados com piores prognósticos, grau histológicos mais alto, aumento da agressividade tumoral e redução da sobrevida, com consequente aumento da recorrência e da mortalidade e resistência a drogas citotóxicas (FOULKES, SMITH e REIS-FILHO, 2010; NG, et al., 2015; WOLFF, et al., 2018), conforme identificado nas Tabelas 15 e 16 nas análises de OR entre alto grau histológico e nuclear (G3).

Em relação aos casos TNBC, é importante sempre destacar que são tumores histologicamente mais agressivos, de alto grau histológico e nuclear, estágios avançados e que desenvolvem recorrência precocemente (FOULKES, SMITH e REIS-FILHO, 2010, DING et al. 2019). Apesar de ser mais sensível a quimioterapia, as repostas têm curta duração, com média de sobrevida para paciente com doença metastática de 12 meses (FOULKES, SMITH and REIS-FILHO, 2010; WHO, 2019). Por isso, apresentam pior prognóstico comparado a todos os outros subtipos (VIEIRA, et al., 2010; PRAT and PEROU, 2010; AHN, et al., 2015, WHO, 2019). A frequência desse subtipo varia entre 10 a 25% (FOULKES, SMITH e REIS-FILHO, 2010; EIERMANN, et al., 2012). Neste estudo a frequência foi de 14,1% dos casos (Tabela 10) e o subtipo duplo negativo (ER-/HER2-) foi identificado em 15,3% das pacientes (Tabela 11). Esses resultados estão concordantes com a literatura (PRAT and PEROU, 2010;

FOULKES, SMITH e REIS-FILHO, 2010; EIERMANN, et al., 2012; YUAN, et al., 2019, WHO, 2019). Ainda nos TNBC, mutações do Gene BRCA1 são mais frequentemente nesse subtipo, nos tumores com imunofenótipo ER/HER2 negativos e nos pouco diferenciados (LAKHANI, et al., 1988; SIMON, MIRLACHER, SAUTER, 2003; SHEFFIELD, et al., 2016; WHO, 2019.). Neste trabalho, os resultados apresentados, mostraram uma razão de chance (OR) de 8.50 e 5,41, respectivamente, na análise de associação entre alto grau histológico e nuclear (G3) com o subtipo duplo negativo, o que determina maior chance do conjunto dessas características morfológicas em apresentar associação com esse imunofenótipo de pior prognóstico. Pela análise univariada pode-se identificar também a importância do estudo morfológico através da identificação de uma menor associação entre tumores de baixo grau histológico e nuclear (G1) com OR menores que 1 e o inverso também pode ser observado, através da maior associação de risco para tumores de pior prognóstico com valores de OR acima de 1 (Tabela 15 e 16).

Como visto anteriormente, o presente estudo apresentou dois grupos de classificação IHQ para carcinoma de mama, o Grupo 1 foi definido a partir dos critérios da conferência de St. Gallen (GOLDHIRSCH, et al., 2013) e se baseou na expressão dos quatro biomarcadores RE, RP, HER2 e Ki67, e assim categorizou cinco subtipos imuno-histoquímicos distintos (luminal A, luminal B/HER2-, luminal B/HER2+, HER2+ e TNBC). O Grupo 2 foi baseado em subtipos agrupados pelos biomarcadores RE e HER2 (WHO, 2019) e identificou quatro subtipos diferentes (RE+/HER2-, RE+/HER2+, RE-/HER2+, RE-/HER2-). Neste trabalho, foi avaliada a concordância entre os dois grupos de classificações e os resultados mostraram uma concordância que variou entre 99,48% a e 100%.

A utilização dessas duas classificações permitiu verificar que há possibilidade de selecionar carcinomas de mama de prognósticos distintos e correlacionar com os reconhecidos fatores preditivos e prognósticos.

Esse dado foi particularmente importante pelo resultado da concordância estatística absoluta. Mas, apesar dos resultados quase perfeitos entre os dados, autores sugerem que os marcadores imuno-histoquímicos clássicos, usados na clínica para classificação de tumores (ER, PR e HER2) não recapitulam totalmente os subtipos intrínsecos, demonstrando que a graduação dos ER, PR e HER2 isoladamente ou em combinação não são substitutos precisos do verdadeiro *status* de subtipo molecular intrínseco (PRAT and PEROU, 2010; PARKER, et al., 2009b).

Uma das limitações do presente estudo foi a avaliação do HER2, baseada exclusivamente no exame de IHQ, pois a complementação da pesquisa de amplificação



genética por metodologias *ISH* não foi realizada, devido a impossibilidade técnica. Neste estudo obtivemos 12.7% dos casos indeterminados (Tabela 10), um viés que leva a erros de análise. Outra limitação foi a não correlação dos resultados da IHQ com testes moleculares, para verificar subpopulações intrínsecas e a heterogeneidade tumoral. Por fim, considerou-se mais uma limitação à falta de história familiar, produzindo um viés de seleção, particularmente para os casos com risco de doença familiar que não foram estratificados no presente estudo.

A prevalência de subtipos em nossa população foi semelhante à observada nos países desenvolvidos. O carcinoma de mama tem mostrado alta prevalência na população feminina, com incidência e mortalidade crescentes. Assim, é um problema de saúde pública mundial e há necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico desses tumores e o possível uso na prática clínica é de fundamental importância. Além disso, a compreensão das correlações entre os parâmetros clínicos clássicos, radiológicos e anatomopatológicos com as características imunofenotípicas associadas aos produtos de expressão proteica são determinantes para unificar e estabelecer protocolos que ajudem a direcionar mais rapidamente o diagnóstico, com resultados mais precisos e tratamentos individualizados. O conhecimento dos mecanismos básicos envolvidos no crescimento tumoral é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas, especialmente para as formas da doença para as quais as opções terapêuticas atuais têm progressão de impacto e prognóstico. É notória a associação direta entre um diagnóstico rápido e preciso e o sucesso terapêutico no tratamento desses tumores, o que traz benefícios tanto na taxa de sobrevivência global quanto no tempo livre da doença, o que resulta em melhora da qualidade de vida dos pacientes.

Nos resultados observados, o carcinoma de mama pode ser agrupado dentro de uma sequência de subtipos definidos por, pelo menos, dois biomarcadores (ER e HER2). A combinação de características morfológicas com o uso desses biomarcadores pode ajudar a determinar subtipos com diferentes desfechos clínicos e respostas às terapias. Entretanto, as características morfológicas podem variar consideravelmente tanto entre grupos de mulheres como entre populações celulares da mesma paciente, pois o carcinoma de mama é um grupo de doenças distintas com grande e reconhecida heterogeneidade tumoral. Os esforços mundiais para melhorar a compreensão da heterogeneidade dos tumores em relação ao padrão histológico e genômico são fundamentais para a detecção de potenciais ferramentas para aplicação clínica.

Nesta fase do estudo, observou-se alta concordância ao agrupar casos utilizando dois ou quatro biomarcadores, mostrando que na rotina laboratorial é possível aplicar ferramentas economicamente acessíveis, como o IHC.

Acredita-se que mesmo com extensas pesquisas sobre técnicas avançadas de biologia molecular, os resultados apresentados neste estudo podem contribuir para que médicos assistentes, em regiões com poucos recursos, possam categorizar pacientes com carcinoma invasivo da mama seguindo subtipos definidos por biomarcadores para fins de tratamento com base no status HER2 e do RE, conforme previsto pela OMS, e, como consequência, pode trazer benefícios socioeconômicos globais.

## **5. ESTUDO PROSPECTIVO**

### **5.1. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.1.1. Delineamento do estudo**

Foi realizado um estudo prospectivo do tipo analítico longitudinal e transversal em pacientes com nódulos de mama.

#### **5.1.2. Cultura Celular e Validação de Anticorpos**

Para determinar a concentração mais adequada de anticorpos a serem utilizados nas etapas subsequentes do trabalho, houve a necessidade de titular os anticorpos que não estavam validados. Para isso foram utilizadas células de linhagens derivadas de tumores de mama MDA-MB231 (linhagem de células de carcinoma de mama triplo negativo) e MCF-7 (linhagem de células de carcinoma de mama com fenótipo luminal A) além das células SiHa (linhagem celular de carcinoma cervical) (ATCC, Manassas, EUA). Como as linhagens celulares utilizadas possuem um fenótipo conhecido, considerou-se mais seguro realizar a titulação com essas células, uma vez que o perfil de expressão das células oriundas das biópsias era desconhecido.

Para validar o anti-PDL1, foi utilizado como controle positivo as células MDA-MD-231, pois possuem o fenótipo “triplo-negativo”, o qual está altamente relacionado com a expressão de PDL-1 pelas células tumorais. A padronização da marcação com o anti-CK19 foi realizada com as células de linhagem MCF-7, que reconhecidamente expressa o antígeno CK19, e as células SiHa foram utilizadas como controle negativo.

Todas as células foram mantidas em garrafas para cultura celular contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco®), 100 U/ml de penicilina (Gibco®), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco®) e 10 mM de tampão HEPES (Gibco®) em pH 7,2. As células foram mantidas em incubadora com atmosfera úmida de 5 % de CO<sub>2</sub> à 37 °C e o meio trocado a cada 2 ou 3 dias para manutenção da viabilidade celular.

Antes dos experimentos de titulação dos anticorpos as células (1 x 10<sup>5</sup> células) foram tratadas com tripsina (0,25%) durante 5 a 15 minutos com o objetivo de desagregá-las. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida a um tubo tipo falco com meio de

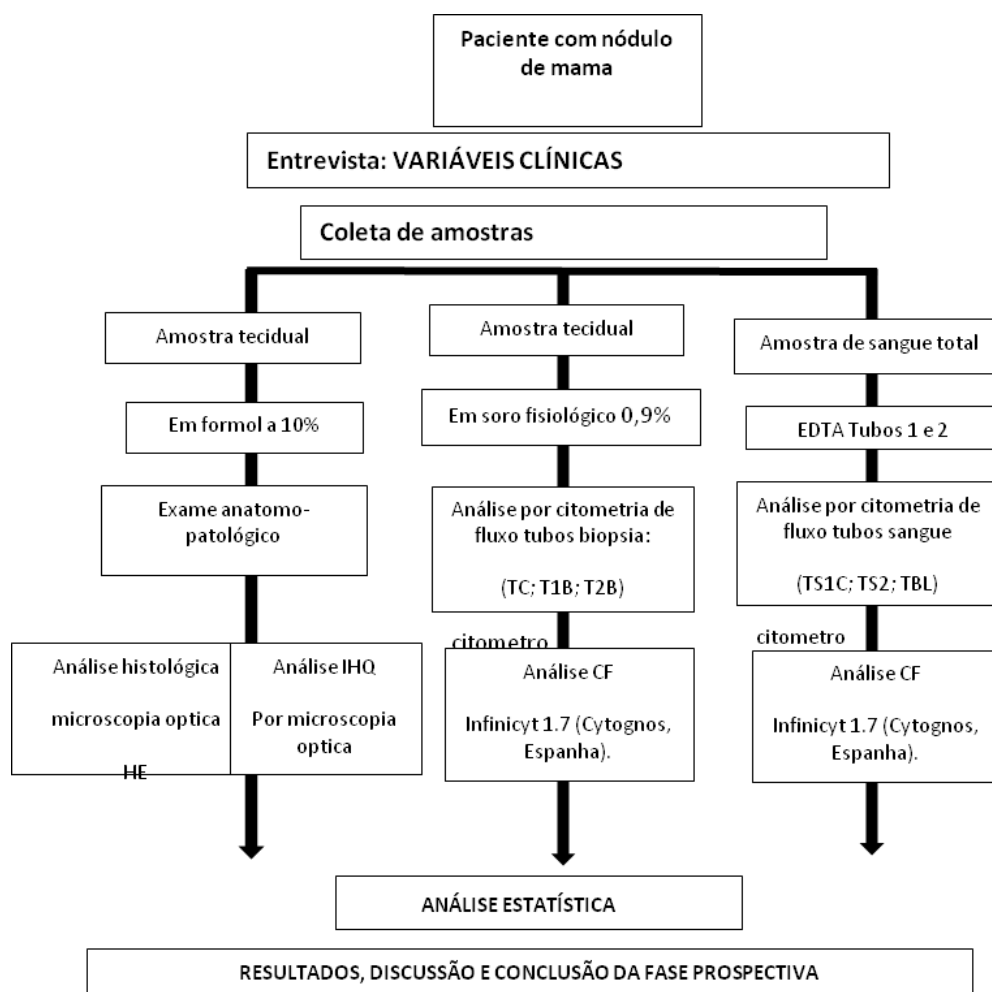
cultura para de evitar perda da viabilidade celular pela tripsina, pois a mesma dissolve a matriz extracelular. Depois da centrifugação para remover o meio de cultura contendo tripsina, o *pellet* celular foi ressuscitado com tampão salina-fosfato (PBS) e essa suspensão foi utilizada a marcação dos anticorpos.

Cada uma das suspensões celulares obtidas foi marcada com anticorpos monoclonais específicos, dependendo do padrão de expressão das linhagens. As células MDA-MD-231 foram marcadas com 20 µl de anticorpo anti-PDL-1 (Clone MiH1BD Pharmingen) e as células MCF-7 e SiHa foram marcadas com 2,5 e 5 µL de anticorpo anti-CK19 (Clone A53 B/A2 Invitrogen). Como o antígeno CK19 está localizado no citoplasma, e, assim inacessível às técnicas de marcação direta, foi utilizado protocolo de fixação e permeabilização da membrana celular, conforme estabelecido pela utilização de kit FIX&PERM (BD).

Em geral, para células de linhagem de carcinoma de mama e amostras de sangue periférico ou tecido mamário, a marcação foi realizada de acordo com o protocolo experimental, utilizando-se 100 µl de suspensão celular marcadas com os anticorpos contra os antígenos de superfície das células, homogeneizados em vortex e incubados por 15 minutos. Depois, acrescentou-se 1 ml de solução lisante (nos tubos com marcadores direcionados apenas a antígenos da membrana celular) ou 100 µl de reagente de fixação (tubos para análise de antígenos intracitoplasmáticos) seguido de nova incubação por 15 minutos. Posteriormente, à suspensão, foi acrescentado 4 ml de PBS e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2.000 RPM para separação do *pellet* celular e remoção dos resíduos de reagente de fixação e lisante. Após essa etapa, os tubos marcados apenas para antígenos localizados na superfície celular foram ressuscitados com 300 µl de PBS, homogeneizados para aquisição no citômetro de fluxo. Para os tubos para marcação intracelular (anti-CK19), após a remoção do PBS contendo reagente de fixação, foi adicionado 100 µl do reagente de permeabilização, seguido dos anticorpos contra os antígenos intracitoplasmáticos e em seguida foram incubados novamente por 15 minutos. Após este período, adicionou-se aos tubos 4 ml de PBS e os mesmos foram centrifugados novamente por 5 minutos a 2.000 RPM. Finalmente, a solução PBS (contendo os resíduos de reagente de permeabilização) foi removida e o *pellet* de células foi ressuscitado com 300 µl de PBS para aquisição no citômetro de fluxo FACS Canto II com o software FACS Diva (Becton Dickinson (BD), San Jose, Ca, USA). A análise dos dados foi realizada no software de análise Infinicyt 1.7 (Cytognos, Espanha).

Abaixo observa-se o fluxograma da metodologia do experimento, desde a fase de seleção dos pacientes, entrevista com coleta das variáveis clínicas, preparo das amostras,

sequência de análises, análise estatística, finalizando com a conclusão da fase prospectiva do estudo em amostras humanas.



### 5.1.3. Caracterização da população do estudo

As pacientes foram divididas em dois grupos segundo o diagnóstico radiológico de BI-RADS®. O grupo controle compreendeu as pacientes com BI-RADS® 3 e 4a por ter uma chance de risco de malignidade  $\leq 10\%$ , e o grupo de interesse foi composto por pacientes com BI-RADS® 4b, 4c e 5, pela chance de risco de malignidade  $> 10\%$  a  $\geq 95\%$ .

#### 5.1.4. Seleção das pacientes

Foram convidados para participar do estudo pacientes com indicação de realização de core biópsia de nódulo de mama, que estavam nos Serviços de Radiologia e Mastologia do Hospital Universitário (HU/EBSERH/UFSC), entre os dias 10 de fevereiro de 2020 e 29 de novembro de 2021.

Utilizando os critérios de inclusão que compreendeu mulheres com idade igual ou superior a 18 anos, com diagnóstico radiológico de BI-RADS®3, 4a, 4b, 4c e 5, encaminhadas para o procedimento de core biopsy de nódulos mamários, foram selecionados somente pacientes que concordaram em participar do estudo, e após entrevista e explicação sobre os objetivos, todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFSC sob o CAAE 52861715.0.0000.0121, APÊNDICE A).

As entrevistas foram realizadas individualmente, entre a pesquisadora (DSCV) e as pacientes, durante a permanência das mesmas nas salas de espera dos serviços onde seriam realizadas as coletas na instituição HU/EBSERH/UFSC.

As informações clínicas foram obtidas por meio de questionário elaborado pela pesquisadora e validado em entrevistas piloto, com voluntários (APÊNDICE B).

Todas as informações coletadas após as entrevistas foram transcritas em fichas numeradas consecutivamente.

Para o cálculo amostral, adotou-se um nível de confiança de 95% e um erro absoluto de 5%. Considerou-se que 5% das pacientes apresentariam alterações compatíveis com carcinoma de mama. Dessa forma, o tamanho amostral calculado foi de 80 pacientes. As pacientes serão divididas em dois grupos segundo o diagnóstico radiológico de Birads. O grupo controle compreenderá as pacientes com Birads 3 e 4a, e o grupo de interesse será composto por pacientes com Birads 4b, 4c e 5.

##### 5.1.4.1. Variáveis

As variáveis clínicas obtidas foram coletadas durante as entrevistas e no exame físico na sala de ultrassonografia e as variáveis das análises histopatológica, imuno-histoquímica e por citometria de fluxo foram coletadas após leitura e interpretação dos resultados.

### VARIÁVEIS CLÍNICAS

- Idade em anos completos
- Número de gestações
- História familiar para carcinoma de mama, ovário ou carcinoma de mama em familiar do sexo masculino
- Tempo de evolução do nódulo em meses
- Inspeção das mamas
- BI-RADS®, pelo ultrassom (US)
- Tamanho do nódulo, pelo US
- Localização do nódulo, pelo US
- Comprometimento axilar ao US
- Diagnóstico clínico de metástase a distância, por exames de imagem
- Multicentricidade tumoral: presente ou ausente, pelo US.

### VARIÁVEIS DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA:

- Metástases de linfonodo: presente ou ausente pela citologia;
- Grau histológico e nuclear: grau I, II e III;
- Linfócitos contados na área intratumoral e estromal;
- Invasão vascular (sanguínea e linfática): presente ou ausente;
- Subtipo histológico: carcinoma invasivo da mama sem outras especificações (CDI) x carcinoma lobular invasivo (CLI);

### VARIÁVEIS DA ANÁLISE POR IMUNOHISTOQUÍMICA:

- Ki 67: abaixo de 15% e acima 15%;
- PD-L1 (IHQ) presente > 1% ou ausente < 1%;
- PD1(IHQ) presente ou ausente;
- CTLA-4 (IHQ) presente ou ausente;
- CK 19 (IHQ) presente ou ausente;
- PAN CK (IHQ) presente ou ausente;
- CD 8 (IHQ) presente (2+ a 3+) ou ausente (0 a 1+);
- CD4 (IHQ) presente (2+ a 3+) ou ausente (0 a 1+);
- CD45 (IHQ) presente (2+ a 3+) ou ausente (0 a 1+);

- RE (IHQ) presente ou ausente / escore Allred 1 a 8;
- RP (IHQ/) presente ou ausente/ escore de Allred 1 a 8;
- HER 2 (IHQ) presente: escore 3+: indeterminado: escore 2+ e ausente: escore 0, 1+;
- Amplificação do HER presente ou ausente (SISH); quando escore HER2+ indeterminado: escore 2+.
- Classificação dos Subtipos por Imunofenótipos: Luminal A, Luminal B HER2 negativo (-), Luminal B HER 2 positivo (+, HER2+); TNBC;

#### VARIÁVEIS DA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

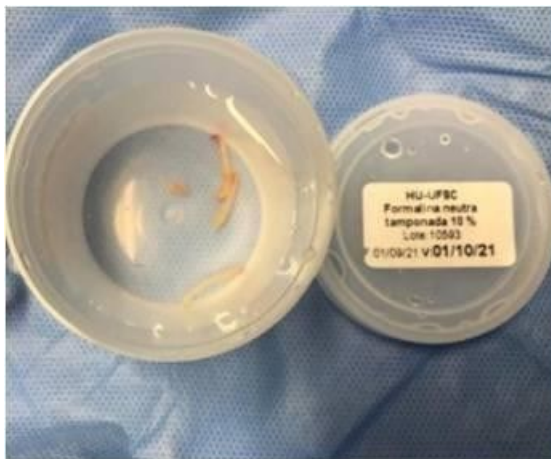
- PD-L1 (citometria de fluxo) números absolutos e relativos;
- PD1 (citometria de fluxo) números absolutos e relativos;
- CTLA-4 (citometria de fluxo) números absolutos e relativos;
- CK 19 (citometria de fluxo) presente ou ausente;
- PAN CK (citometria de fluxo) presente ou ausente;
- CD 8 (citometria de fluxo) números absolutos e relativos;
- CD4 (citometria de fluxo) números absolutos e relativos;
- CD45 (citometria de fluxo) números absolutos e relativos;

#### **5.1.5. Coleta da amostra de tecido e de sangue para análise em citômetro de fluxo**

Considerando que o diagnóstico anatomopatológico é prioridade acima de qualquer investigação, os seguintes critérios de seleção das amostras foram estabelecidos: a coleta de amostra para citometria fluxo foi ser realizada somente quando o paciente apresentava ao US um nódulo sólido  $\geq 1$  cm, e os três primeiros disparos de core foram destinados ao diagnóstico histológico, com amostra acondicionada em formol tamponado a 10%, como pode ser observado na Figura 29.



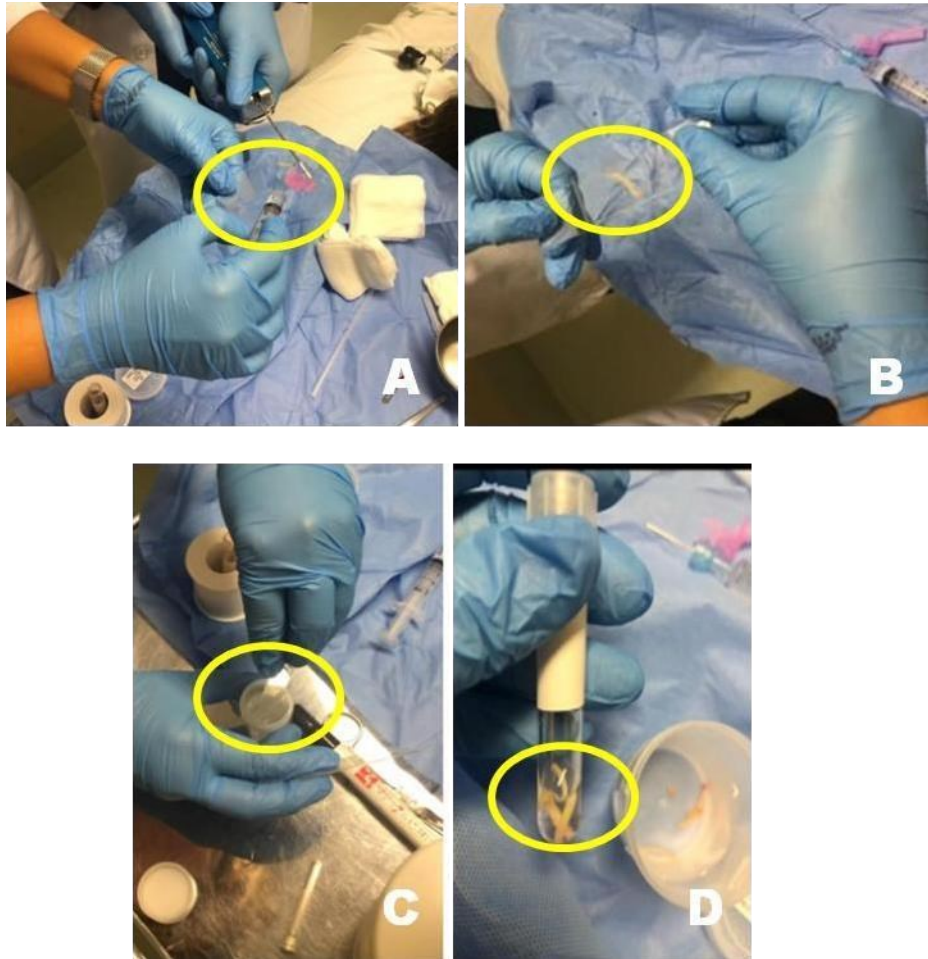
Figura 29. Amostra de tecido mamário em formol a 10% tamponado.



Representa frasco com três fragmentos de amostra do nódulo de mama, imersas em formol tamponado a 10% que pode permanecer por no mínimo 7 horas até 72 horas. Fonte: O Autor.

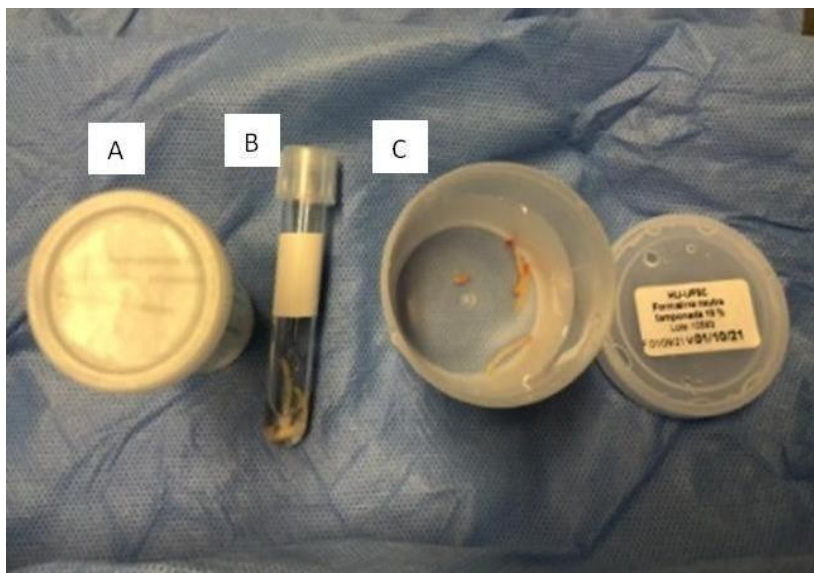
Após a seleção de amostras para o exame histológico, dois fragmentos da amostra foram retirados da paciente por core biópsia. Desses preparou-se o “imprint” para controle de amostra (Figura Painéis 30A e 30B). Imediatamente após a lâmina foi inserida em tubo com álcool a 70% para fixação da lâmina (Figura Painel 30C). Os fragmentos foram colocados em tubo com soro fisiológico a 0.9% (Figura Painel 30D) e acondicionados em uma caixa de isopor refrigerada. Imediatamente após esses procedimentos, as amostras foram encaminhadas aos laboratórios ULAP/HU/EBSERH e LOEH/CCS/UFSC. A Figura 31 representa de forma ilustrativa os meios de armazenamento e encaminhamento das amostras para exame histológico e para citometria de fluxo.

Figura 30. Preparo da amostra de tecido para citometria de fluxo.



Painel A e B representam a recepção a amostra tecidual e realização do “imprint” do fragmento de core biópsia. Na imagem C, o momento de colocação da lâmina em tubete com álcool a 70°, e em D a amostra de dois fragmentos de biópsia de agulha grossa em soro fisiológico. Fonte: O Autor.

Figura 31. Armazenamento da amostra tecidual de nódulos de mama.



Painel 31 A representa tubete com álcool, para armazenamento e fixação das lâminas de do “imprint” citológico. No Painel B, identifica-se o tubete de citometria com soro fisiológico e material de biópsia de nódulo de mama a fresco e no Painel C o frasco com amostra em formol a 10 % tamponado, para análise histológica.

Fonte: O Autor.

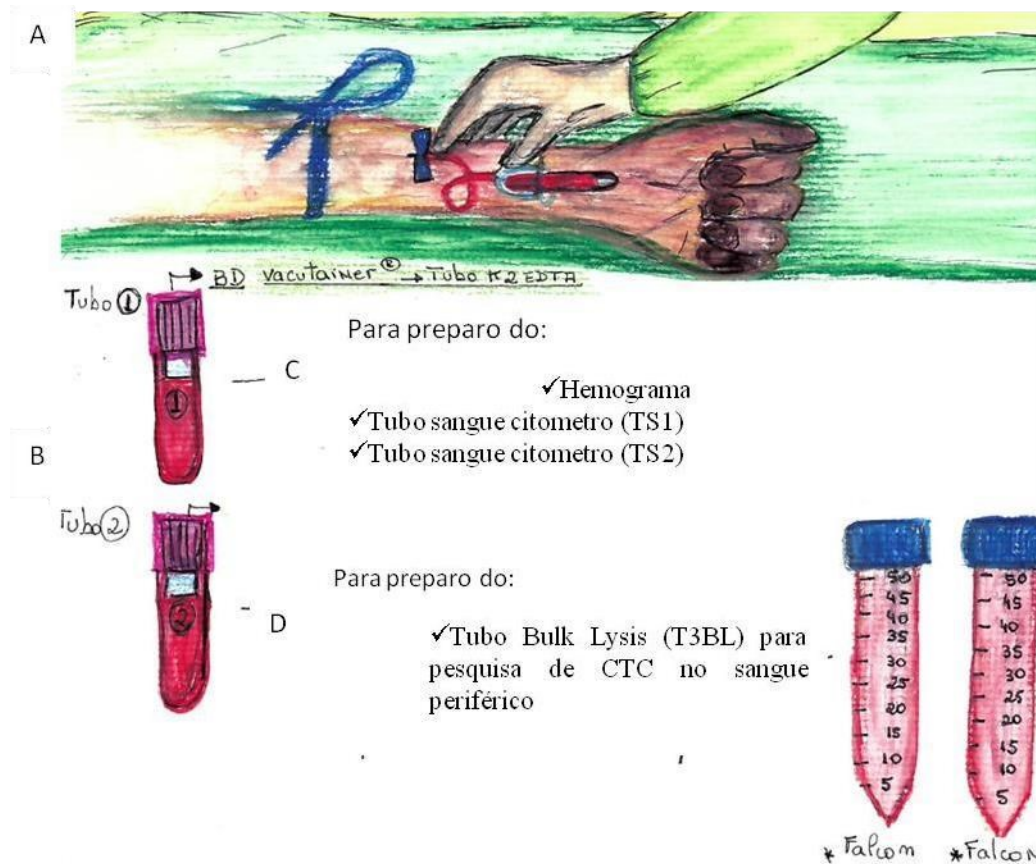
As amostras de sangue periférico foram coletadas em dois tubos contendo o anticoagulante EDTA/K3, conforme Figura 32. O primeiro tubo coletado (T1), teve a função de diminuir o risco de contaminação acidental por células epiteliais cutâneas durante a venopunção, e também foi utilizado para a realização do hemograma e dos tubos de análise por citometria de fluxo (TS1 E TS2) conforme exemplificados no Painel C da figura 33. O tubo 2 (T2) foi destinado para os experimentos que envolvia a citometria de fluxo para pesquisa de CTC no sangue periférico, denominado Tubo 3 Bulki Lysis (T3BK) (Figura 33 Painel D).

Figura 32. Tubos de venopunção.



Tubos de coleta sangue periférico, K2 EDTA “BD vacutainer®. Fonte o Autor.

Figura 33. Descreve os passos para coleta da amostra de sangue.



Painel A observa-se o posicionamento do braço para coleta de sangue venoso, no Painel B, há a representação dos dois tubos K2 EDTA, no Painel C o fluxo para o tubo 1 (TS1) e no Painel D o fluxo para o tubo 2 (TS2). Fonte: o Autor: Aquarela sobre papel canson, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>.

### 5.1.6. Maceração e preparo de amostra tecidual para análise em citômetro de fluxo

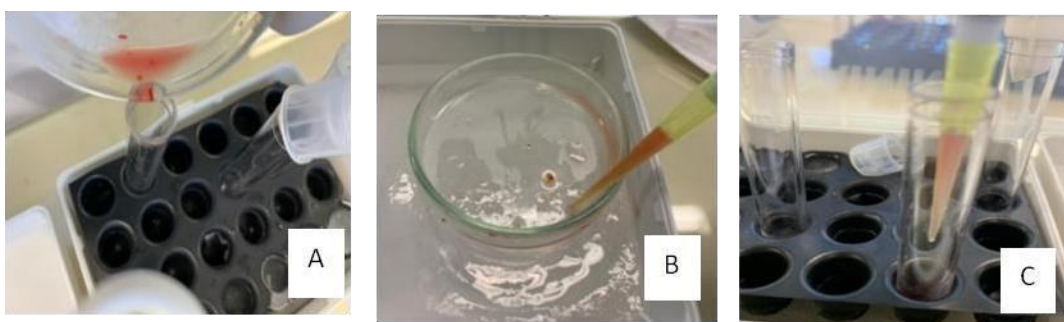
Para a realização da imunofenotipagem do tecido mamário é necessário à preparação da amostra a fim de se obter uma suspensão celular. Assim, as amostras de tecido mamário refrigeradas foram transferidas para placa de petri dentro de caixa de gelo (Figura 34 Painel A) e fragmentadas em pequenos pedaços com o auxílio de um bisturi (Figura 34 Painel B) e submetidas a dissociação manual em um tubo de ensaio contendo 100  $\mu$ L de PBS, utilizando-se um bastão de vidro (Figura 34 Painel C). Na Figura 35 Painel B e Painel C, identifica-se o processo de transferência com pipeta. Depois todo conteúdo é filtrado com filtro malha de 150 micrometros ( $\mu$ m) (Figura 36 Paineis A e B) para eliminar partículas do tecido cujo tamanho poderia causar entupimento no sistema de fluidos do citômetro de fluxo.

Figura 34. Processo de maceração manual.



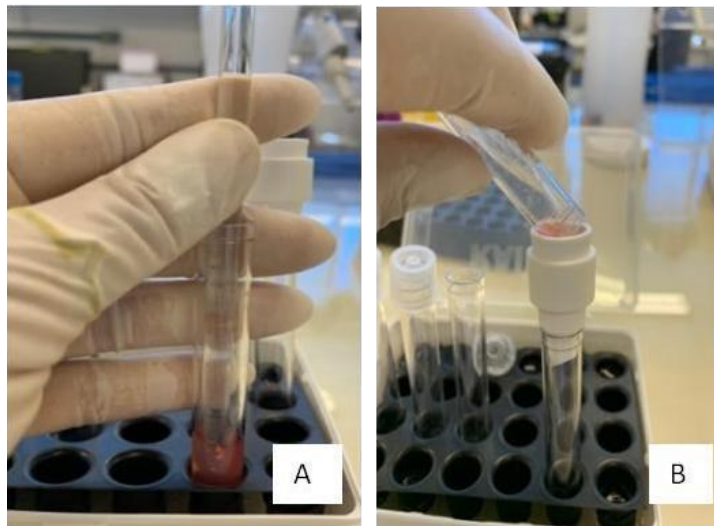
A figura representa o processo de maceração manual, com uso de lâmina de bisturi e soro fisiológico refrigerado em placa de gelo, para manter o material viável. Fonte: O Autor.

Figura 35. Transferência do material macerado para tubo de citômetro.



Painel A, B e C mostra o processo de transferência do material a fresco pos maceração om bisturi. Figura 35  
Fonte: O Autor.

Figura 36. Processos de maceração e filtragem.

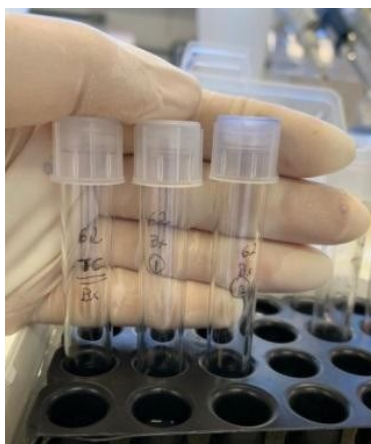


A figura representa a sequência de maceração (Painel A) e transferência de tubo com uso de filtro (Painel B).

Fonte: O Autor.

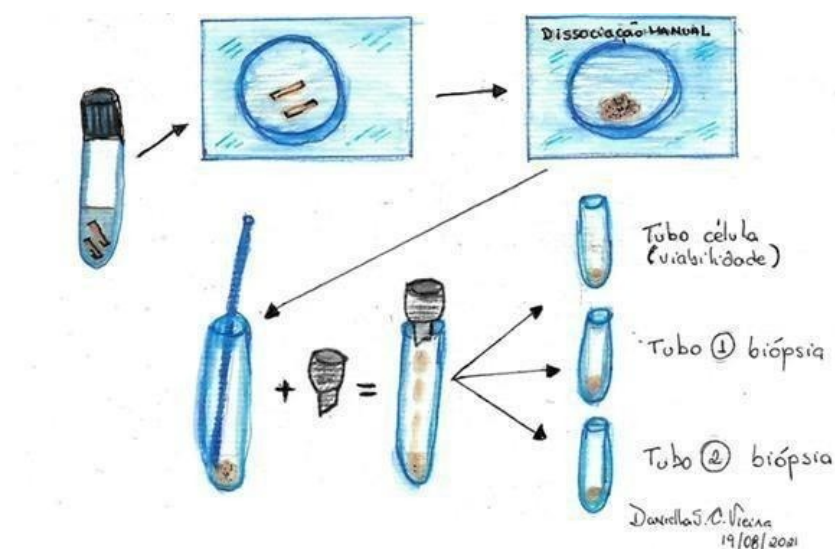
Após esse processo, três tubos de citômetro foram preparados e identificados conforme sequência a seguir de acordo com a metodologia padronizada para o estudo: Tubo célula (TC), Tubo 1 - biópsia (BX1) e Tubo 2 - biópsia (BX2) (Figura 37). O esboço da metodologia para amostras de biópsias de mama estão representadas na Figura 38. O TC foi incluído em todas as amostras analisadas, para verificação de viabilidade e detecção de células mortas pela marcação do 7AAD. O 7AAD é um ligante de DNA que penetra nas células danificadas, ligando-se ao DNA das células mortas, e, assim, pode ser utilizado como um indicador de viabilidade. Nos tubos BX1 e BX2, procedeu-se a marcação com anticorpos de interesse da suspensão celular, descritos na Tabela 18.

Figura 37. Sequência dos três tubos da análise do tecido para citometria de fluxo



A figura retrada os três tubos de preparo para a análise das variáveis na amostra tecidual por citometria de fluxo. Tubo célula (TC), Tubo 1 - biópsia (BX1) e Tubo 2 - biópsia (BX2). Fonte o Autor.

Figura 38. Figura esquemática da metodologia desenvolvida para amostras de mama para citometria de fluxo.



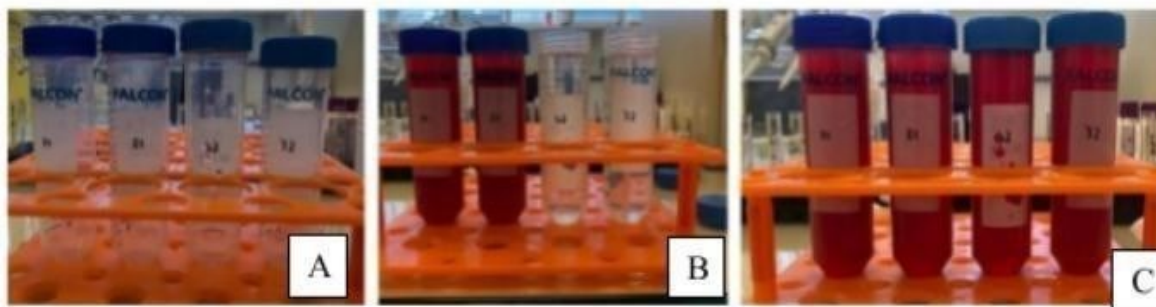
No desenho 38 observa-se a sequência de eventos metodológicos relacionados ao preparo da amostra tecidual do nódulo de mama, para citometria de fluxo, passando dos estágios de maceração, com dissociação celular, filtragem até a distribuição nos tubos de análise. Aquarela sobre papel canson, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>. Fonte: o Autor.

### 5.1.7. Preparo de amostra sangue para análise de CTC em citômetro de fluxo

Para a investigação das CTC, inicialmente foi utilizado apenas 2ml da amostra de sangue periférico, mas a partir da 12<sup>o</sup> coleta, para melhorar a sensibilidade do método, optou-se pela utilização de 2 tubos tipo Falcon (4 ml) por paciente (Figura 39). Em cada tubo tipo Falcon de 50mL, foi preparado a solução lisante PharmLyse (BD) (1:10), com 45 ml de água destilada e 5 ml volume de lisante concentrado, com adição de 2 ml de sangue periférico (TS2), totalizando 4 ml para os dois tubos tipo Falcon. Depois o procedimento foi realizado conforme descrito no APÊNDICE C, item: Metodologia “BULK LYSIS” – sangue periférico para Tubo 3 “BULK LYSIS” (T3BL): método doença residual mínima (DRM).

A marcação do T3BL para a investigação das CTC foi realizada de acordo com o painel previamente definido (Tabela 19). Como controle positivo do Tubo 3 “Bulk Lysis”, para a investigação de CTC CK19 positivas também foi utilizado o anticorpo anti-PAN CK na metodologia e o anticorpo anti-CD45 como controle negativo.

Figura 39. Preparo do Bulki Lysis (BL).



Painel A observa-se a sequência de quatro tubos que contém as soluções para preparo do BL, composto por água destilada e solução lisante BD Pharma Lyse™, no Painel C, os 4 tubos prontos, com solução de 50 ml de solução do BL e 2 ml de sangue em cada tubo. Fonte: o Autor.

### 5.1.8. Definição dos painéis de anticorpos para investigação dos biomarcadores por citometria de fluxo

Depois de titular e validar os anticorpos de interesse nas metodologias descritas acima e de padronizar os processos de preparo das amostras teciduais e de sangue periférico, os painéis de anticorpos foram organizados para responder os objetivos da pesquisa.

Para a avaliação da resposta imune no sangue periférico, o painel foi criado com base na pesquisa dos linfócitos B e T (TCD4 e TCD8), de acordo com o tubo LST (*de lymphoid screening tube*) modificado, estabelecido pelo Consórcio Euroflow (Tubo 1, Tabela 19). Os



marcadores de clonalidade B (Kappa e Lambda) não foram incluídos, pois não eram de interesse. Para investigar a expressão das proteínas PD1 e CTLA-4, os anticorpos que reconhecem esses antígenos foram incluídos no Tubo 2 (Tabela 19), respeitando a ordem de fluorescência dos marcadores do Tubo 1. Essa decisão foi tomada para que não houvesse variação na intensidade de fluorescência dos marcadores T que poderia interferir na análise da expressão da PD1 e CTLA-4. Dessa forma, o painel ficou determinado, conforme mostra a Tabela 19.

Para a avaliação das células neoplásicas circulantes, o painel foi definido utilizando-se como parâmetro a expressão do CD45, um antígeno pan-leucocitário e não expresso em células mamárias (PAULA et al., 2017) acrescido de dois marcadores presentes somente nas células metastáticas circulantes, e, não nos leucócitos, o CK19 e Pan CK (Tabela 19). Nos Tubos sangue 1 e 2 (TS1 e TS2), a marcação foi de acordo com o protocolo de marcação de anticorpos de membrana e foram adquiridos 200.000 eventos, e no Tubo sangue 3 (T3BL), foi utilizado o método para concentração de células *Bulk lysis* (BD<sup>®</sup>), e o protocolo de marcação adotado foi o de anticorpos intracelulares, com até 10 milhões de eventos adquiridos.

Como mencionado anteriormente, para as análises por citometria de fluxo é imprescindível que as células estejam viáveis, por isso, na investigação de marcadores em biópsias, um marcador de viabilidade celular, o 7-aminoactinomicina D (7-AAD) BD<sup>®</sup>, foi incluído no painel. Além disso, no painel para avaliação dos marcadores PD1 (CD279, clone EH 12.2H7), PDL-1 (CD 274, clone MiH1) e CTLA-4 (CD152, clone LD3 D10) dessas amostras, foi mantido a avaliação do CD45(clone Hi30) para identificar os leucócitos; o CD3, CD4 e CD8 para linfócitos T, CD16 para neutrófilos. O ajuste dos fluorocromos dos anticorpos foi realizado de acordo com a disponibilidade comercial dos anticorpos anti- PD1, anti-PDL-1 e anti-CTLA-4 e dos reagentes disponíveis no laboratório. Na avaliação do Tubo1 tecido (BX1) foi utilizado exclusivamente marcação de anticorpos de membrana e no Tubo2 tecido (BX2) aplicou-se o protocolo de marcação de anticorpos intracelulares, e foram adquiridos até 200.000 eventos.

Tabela 18. Painel de anticorpos com clones e concentração para amostras de tecido por Citometria de Fluxo:

Amostra tecido	FITC	PE	PERCP PC5.5	PC7	APC	APCH 7	PB	PO V500
<b>TUBO CÉLULA (7AAD + CD45) 50 µL de amostra + 50 µL de PBS (proceder marcação anticorpos de membrana)</b>								
Tubo biópsia 1	CD16 3 µL	PD1 (CD279) 20 µL	X	CTLA4 5 µL	CD3 5 µL	CD8 2 µL	CD4 1 µL	CD45 1 µL
Tubo biópsia 2	CK19 2.5 µL	PDL1 (CD274) 20 µL	X	CTLA4 5 µL	PAN CK 0,5 µL	X	CD3 1 µL	CD45 1 µL

As descrições são FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE phycoerythrin; PerCP: Peridini Chlorophyll; Protein Complex; PC7: Phycoerythrin Cyanin 7 (PC7); APC: allophycocyanin; PB: Pacific Blue; PO: Pacific Orange; Tubo célula (TC), Tubo 1 - biópsia (BX1) e Tubo 2 - biópsia (BX2).

Tabela 19. Painel de anticorpos com clones e concentração para amostras de sangue periférico por citometria de fluxo:

Amostra sangue	FITC	PE	PERCP PC5.5	PC7	APC	APCH 7	PB	PO/V500
Tubo sangue 1	CD8 3 µL	CD56 5 µL	CD5 2 µL	CD19/GD 1 µL/2 µL	CD3 5 µL	CD38 2 µL	CD20/CD4 3 µL/1 µL	CD45 1 µL
tubo sangue 2	CD8 3 µL	PD1 (CD279) 20 µL		CTLA4 (CD152) 5 µL	CD3 5 µL	CD14	CD4 1 µL	CD45 1 µL
tubo bulki lysis	CK19 2.5 µL				PAMCK 0,5 µL			CD45 1 µL

As descrições são FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE phycoerythrin; PerCP: Peridini Chlorophyll Protein Complex; PC7: Phycoerythrin Cyanin 7 (PC7); APC: allophycocyanin; PB: Pacific Blue; PO: Pacific Orange; Tubos sangue 1 e 2 (TS1 e TS2) e Tubo sangue 3 (T3BL).

A Figura 40, ilustra o mapa de anticorpos monoclonais utilizados na investigação dos tubos TS1, TS2 e T3BL, para amostras de sangue periférico.

Figura 40. Mapa de anticorpos monoclonais das amostras sangue.



A imagem 40 mostra a disposição do mapeamento de anticorpos monoclonais selecionados para a amostra sangue. Fonte: o Autor

Depois das marcações de todas as amostras de tecido e de sangue, a aquisição das amostras (até 200.000 eventos para os TC, BX1, BX2, T1S e T2S, e pelo menos 10 milhões de eventos para o T3BL) foi realizada no citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson (BD), San Jose, Ca, USA) e as análises foram realizadas utilizando-se o software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Espanha).

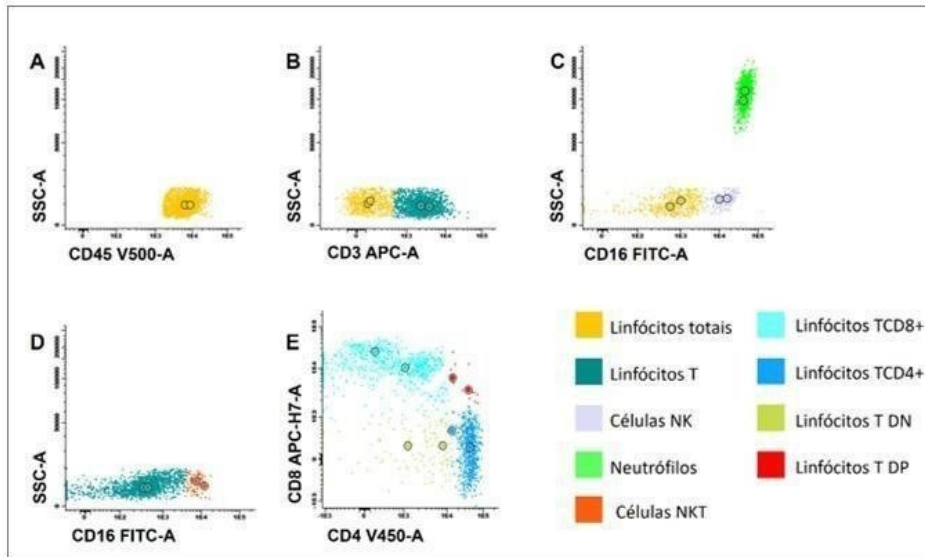
Os dados foram armazenados em arquivo e as variáveis numéricas foram transcritas para tabela Excel®.

### 5.1.9. Estratégia de identificação de leucócitos nas amostras teciduais e de sangue periférico

Para a identificação dos leucócitos presentes no material de biópsia por core, as amostras adquiridas no citômetro de fluxo foram analisadas no software Infinicyt 2.0 (Cytognos, Espanha) (Figura 41). Primeiramente, foram retirados os doublets (FSC-A x FSC-H) e os debris (SSC-A x FSC-A) (dados não mostrados). Os linfócitos foram selecionados devido a sua baixa complexidade interna (SSC-A) e alta expressão de CD45 (CD45++) (Figura 41, Painel A), e, posteriormente, os linfócitos foram separados em T (CD3+) (Figura 41, Painel B), células natural killer (NK), de acordo com a expressão de CD16 (CD16+) (Figura 41, Painel C). Pela expressão do CD16, também foram identificados os neutrófilos, que expressam CD16 de forma forte (++) e alta complexidade interna (SSC) (Figura 41, Painel C). A população de linfócitos T foi subdividida, primeiro, em células NKT (CD3+ CD16+) (Figura 41, Painel D). Os demais linfócitos T foram subdivididos de acordo com a

expressão de CD4 e CD8 em linfócitos TCD4 (CD4+), linfócitos TCD8 (CD8+), duplo-negativos (DN, CD8- CD4-) e duplo-positivos (DP, CD8+ CD4+) (Figura 41, Painel E).

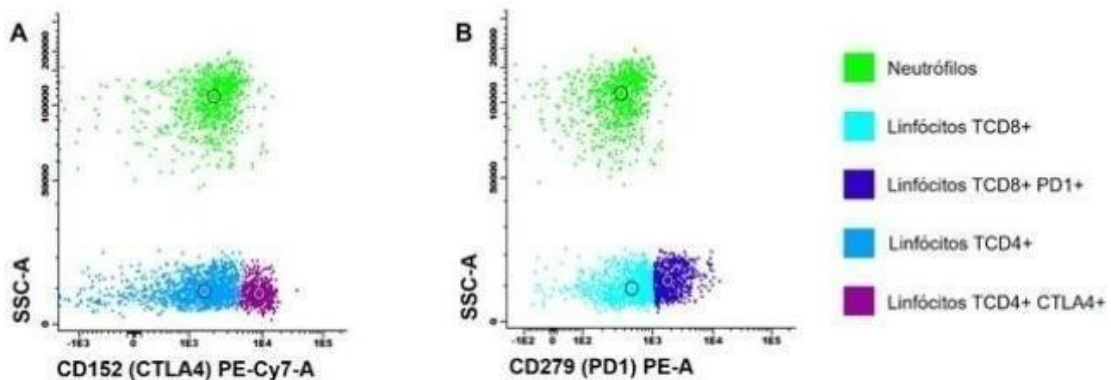
Figura 41. Identificação dos leucócitos presentes na biópsia core.



Primeiramente, os linfócitos foram separados de acordo com a expressão de CD45 (Painel A) e então subdivididos em linfócitos T (Painel B). Os demais linfócitos foram subdivididos em células NK de acordo com a expressão de CD16, que também permitiu a identificação dos neutrófilos (Painel C). Os linfócitos T foram subdivididos em NKT (Painel D) e de acordo com a expressão de CD4 e CD8 (Painel E). Fonte: o Autor

Os linfócitos teciduais TCD4+ e TCD8+ também foram avaliados de acordo com a expressão de CD279 (PD1) e CD152 (CTLA4), como demonstrado na Figura 42 (Painéis A e B).

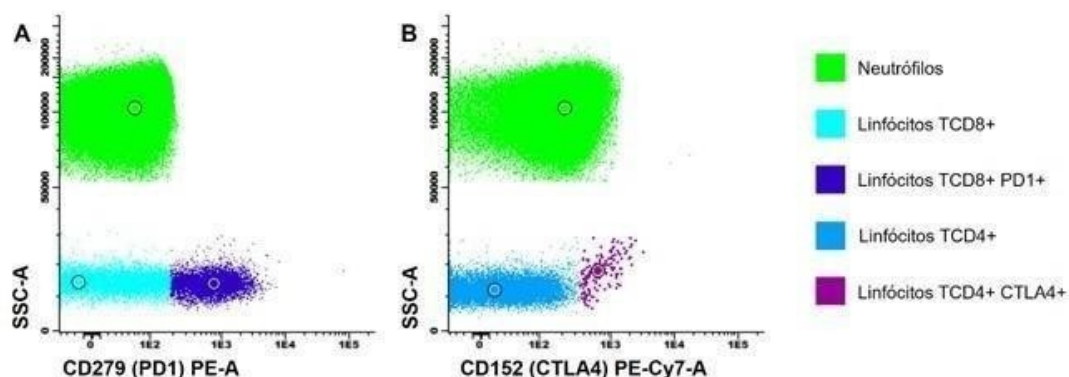
Figura 42. Expressão de CD152 e CD279 nos linfócitos intra tumorais



Expressão de CD152 nos linfócitos TCD4+ (Painel A) e CD279 nos linfócitos TCD8+ (Painel B) em amostras de biópsia core de mama. Em verde, encontram-se células negativas para esses marcadores (neutrófilos). Fonte: o Autor

A expressão do CD279 (PD1) e CD152 (CTLA4) também foi avaliada nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ do sangue periférico, conforme demonstrado na Figura 43 (Painéis A e B), cujo ponto de corte é semelhante ao da Figura 41.

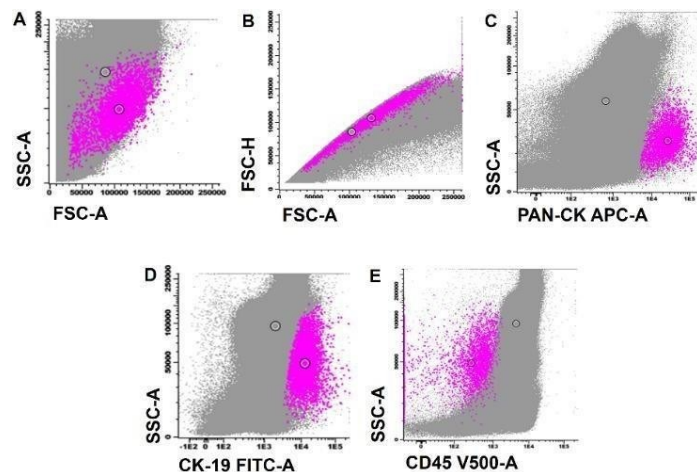
Figura 43. Expressão de CD279 e CD152 nos linfócitos do sangue periférico



Expressão de CD279 nos linfócitos TCD8+ (Painel A) e CD152 nos linfócitos TCD4+ (Painel B) em amostras de sangue periférico. Em verde, encontram-se células negativas para esses marcadores (neutrófilos). Fonte: o Autor

Para identificação de CTC no sangue periférico, as amostras adquiridas no citômetro de fluxo foram analisadas no software Infinicyt 2.0 (Cytognos, Espanha) (Figura 44). Inicialmente, foram retirados os doublets (FSC-A x FSC-H) e os debris (SSC-A x FSC-A) (Figura 44, Painéis A e B)). Foram consideradas como CTC, as células com alta complexidade interna (SSC-A) e tamanho (FSC-A) e que apresentaram expressão de PAN-CK e CK-19, negativas para CD45, conforme descrito na Figura 44 (Painéis C, D e E).

Figura 44. Identificação de células CK19 circulantes no sangue periférico.



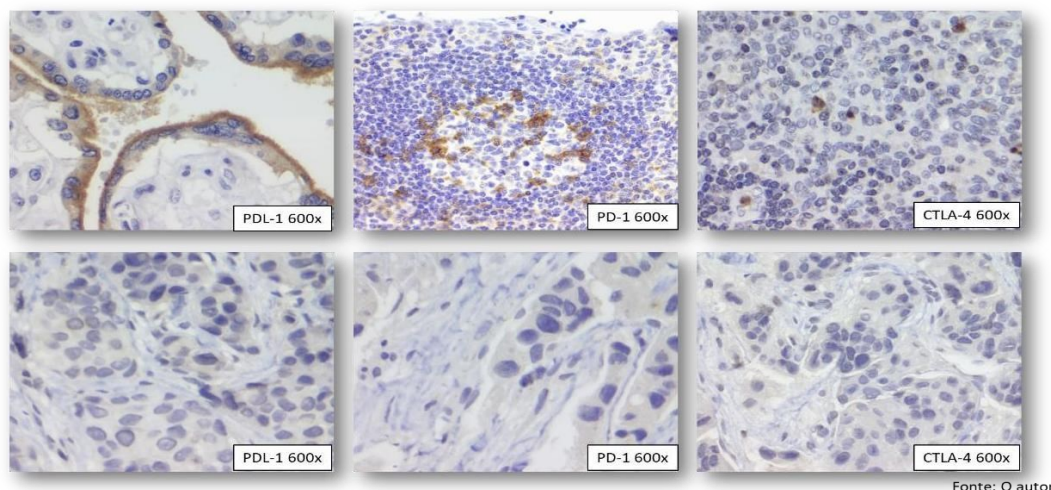
As células de mama circulantes (rosa) encontradas apresentaram alta complexidade interna (SSC-A) e tamanho (FSC-A, Painei A) e foram identificadas pela expressão de PAN-CK (Painei C) e CK-19 (Painei D), além da ausência da expressão de CD45 (Painei E). Fonte: O autor.

#### 5.1.10. Avaliação dos biomarcadores por imuno-histoquímica

A IHQ é o padrão ouro para o diagnóstico do carcinoma de mama com protocolos bem definidos e utilizados rotineiramente. No entanto, para este estudo, foram padronizados a marcação dos tecidos mamários com anti-PDL-1, anti-PD1 e anti-CTLA4.

Inicialmente, para validar e titular os anticorpos anti-PDL-1, anti-PD1 e anti-CTLA4, blocos doadores do arquivo da Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário (ULAP-HU/UFSC/EBSERH) foram utilizados como escolha dos casos de controle positivo. Conforme ilustrado na Figura 45, a marcação positiva na amostra placenta foi utilizada para avaliar a expressão do PDL-1, e para PD-1 e CTLA4 foram utilizados cortes de linfonodos.

Figura 45. Fotomicrografia dos Biomarcadores PDL1; PD1 e CTLA4.



A Figura apresenta as expressões positivas dos biomarcadores PDL1; PD1 e CTLA4, com cromógeno acastanhado sinalizando a imunomarcação positiva e na segunda fila a ausência de imunomarcação. Fonte: o Autor IHQ 600X. Fonte: o Autor

Para avaliação do PDL-1 (Clone 28.8, Abcam) adotou-se o escore positivo combinado (CPS) “modificado”, excluindo as células tumorais. Consideraram-se positivas expressões membrana acima de 1%, independente do grau de intensidade (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> e Pereira, et al., 2021).

Foram utilizados para controle negativo os blocos de casos doadores com diagnóstico de carcinoma de mama.

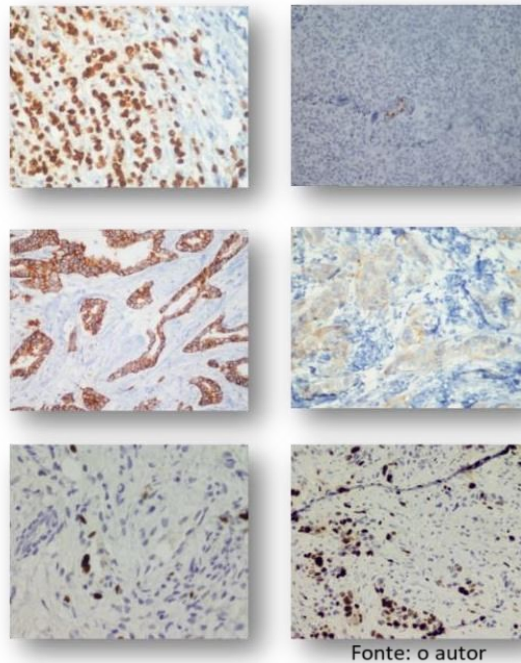
Os protocolos com os demais anticorpos utilizados CD4; CD8; CD45, CK-19, CTLA4, PD-1 e PAN CK encontram-se descritos no apêndice F, e, já são usados na rotina da ULAP-HU/UFSC/EBSERH, e as validações e titulações estão padronizadas.

Para fins desta pesquisa considerou-se expressão positiva ou negativa para a detecção dos anticorpos CTLA4, PD-1, e-caderina, CD4, CD8, CD45, CK19 e CKpool.

Os critérios IHQ para biomarcadores RE, RP, HER2 e Ki67, foram estabelecidos e mostrados na Figura 46. Para avaliação do RE e PR considerou-se positivo quando mais de 1% dos núcleos das células neoplásicas apresentassem marcação, e, negativo quando menos de 1% dos núcleos das células neoplásicas estivessem marcadas ou sem expressão (AMIN, et al., 2017). Para o HER2 foi considerado positivo (3+) quando 10% ou mais das células neoplásicas apresentassem com marcação forte e contínua da membrana celular; Indeterminado (2+) quando marcação fraco/moderado++ em mais de 10% das células neoplásicas, e, negativo quando apresentasse marcação fraca em menos de 10% ou ausência de expressão (AMIN, et al., 2017; WOLFF, et al., 2018; WHO, 2019). Para o Ki-67 considerou-se baixo índice de proliferação quando menos de 15% das células expressassem o

marcador, independente da intensidade, e alto índice, quando 15% ou mais células expressassem marcação nuclear (CHEANG, et al., 2009; AMIN, et al., 2017; SOLIMAN e YUSSIF, 2016; WHO, 2019).

Figura 46. Fotomicrografia dos Biomarcadores RH, HER2 e KI67



Em coloração acastanhada identificam-se as expressões positivas dos biomarcadores RH, HER2 e baixo Ki67. O cromógeno acastanhado sinalizando a imunomarcação positiva e na coluna a direita a ausência de imunomarcação dos biomarcadores RH, HER2 e alto Ki67. Fonte: o Autor IHQ 200X e 400X.

Com base nos objetivos estabelecidos e para determinar o padrão ouro do estudo, o painel da IHQ completou os padrões de investigação da CF, e o painel está descrito na Tabela 20.



Tabela 20. Painel de anticorpos com clones e concentração para amostras de tecido por imuno-histoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>clone</b>	<b>fabricante</b>	<b>controle</b>	<b>diluição</b>	<b>protocolo</b>
<b>RE</b>	6F-11	LEICA	Mama	1:50	semiautomatizado
<b>RP</b>	Y85	CELL MARQUE	Mama	1:50	semiautomatizado
<b>HER2</b>	Policlonal	DAKO	Ca de mama	1:500	semiautomatizado
<b>KI67</b>	SP6	SPRING	Tonsila	1:200	semiautomatizado
<b>CK19</b>	KS19.1	BIOCARE	Ca de cólon	1:50	semiautomatizado
<b>PAN CK</b>	AE1&AE3	CELL MARQUE	Pele	1:500	semiautomatizado
<b>CD8</b>	SP16	CELL MARQUE	Tonsila	1:300	semiautomatizado
<b>CD4</b>	EP204	CELL MARQUE	Tonsila	1:100	semiautomatizado
<b>CD45</b>	2B11&PD7/26	CELL MARQUE	Tonsila	1:500	semiautomatizado
<b>PDL-1</b>	28-8	ABCAM	Tonsila	1:400	semiautomatizado
<b>PD-1</b>	NAT-105	CELL MARQUE	Tonsila	1:10	semiautomatizado
<b>CTLA-4</b>	IHC004	GenomeMe	Tonsila	1:50	semiautomatizado

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona, HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, KI67: Marcador de Proliferação, CK19: citoqueratina 19, CK7: citoqueratina 7, PDL-1: ligante da morte programada-1, PD-1proteína da morte programada 1, CTLA-4: proteína 4 do linfócito T citotóxico.

As metodologias empregadas nas coletas e preparo das amostras histológicas e Imuno-histoquímicas da mama estão descritas no APÊNDICE D.

## 5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos após as entrevistas individuais foram transcritos em fichas numeradas consecutivamente. Todas as análises das variáveis das medidas de instrumentos e dos resultados da análise microscópica foram transcritas em fichas individuais e revisados manualmente, para a detecção de possíveis erros de seleção e preenchimento. Foi criado um banco de dados com codificação das variáveis utilizando Excel®. A digitação do banco foi realizada com conferência manual através da listagem dos dados, na ordem em que as pacientes foram incluídas no estudo. A revisão da consistência dos dados foi feita mediante tabelas descritivas, e em seguida, o arquivo gerado foi transportado para o programa MedCalc Software Ltd Diagnostic test evaluation calculator, version 20.027; “[https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php)” na sessão “Diagnostic test evaluation”. Para a realização da análise estatística, os dados foram descritos por meio de duas variáveis nominais sumarizadas. A análise descritiva dos dados clínicos e laboratoriais foi apresentada em frequências e associações com números absolutos e relativos e a idade em média. Calcularam-se medidas de acerto para avaliar o desempenho das variáveis em prever o desfecho pelos cálculos da sensibilidade (S), especificidade (E), razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), com intervalos de confiança de 95% (IC 95%). Para o cálculo dos testes os dados foram inseridos em uma tabela 2 x 2. Definiu-se como sensibilidade a proporção dos indivíduos com a doença, que têm um teste positivo para a doença, a especificidade como a proporção dos indivíduos sem a doença, que têm um teste negativo, o VPP do teste como a probabilidade de doença em um paciente com resultado positivo e o VPN a probabilidade de não ter a doença com resultado negativo. Para a análise estatística dos resultados da citometria de fluxo foi avaliada a normalidade da distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram expressos em mediana (mínimo - máximo). As variáveis contínuas foram comparadas por meio de análise de variância com teste post hoc de Bonferroni em caso de distribuição paramétrica. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com teste post hoc de Dunn-Bonferroni.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas últimas décadas houve uma revolução na área de inovação de equipamentos laboratoriais, e, com isso, uma sofisticação e aumento da cobertura diagnóstica. Dentre um dos equipamentos que vem trazendo inovações nessa área é o citômetro de fluxo, pelo qual é possível investigar o imunofenótipo das células envolvidas na resposta imune, das células patológicas presentes nas neoplasias hematológicas, e, mais recentemente, na área de oncologia. No entanto, para que esses equipamentos emitam resultados confiáveis, há necessidade de validação e padronização das metodologias a serem utilizadas. Nesse sentido, como neste trabalho uma das propostas era investigar a expressão de CK19, CTLA4, PD1 e PD-L1 em sangue periférico e tecido mamário por citometria de fluxo, metodologia inovadora para investigação desses biomarcadores, foi necessário a validação e padronização do método. Os resultados mostram que essa metodologia pode ser aplicada de forma eficiente após a titulação, padronização e validação dos reagentes e do equipamento; além da definição de um painel de anticorpos adequado.

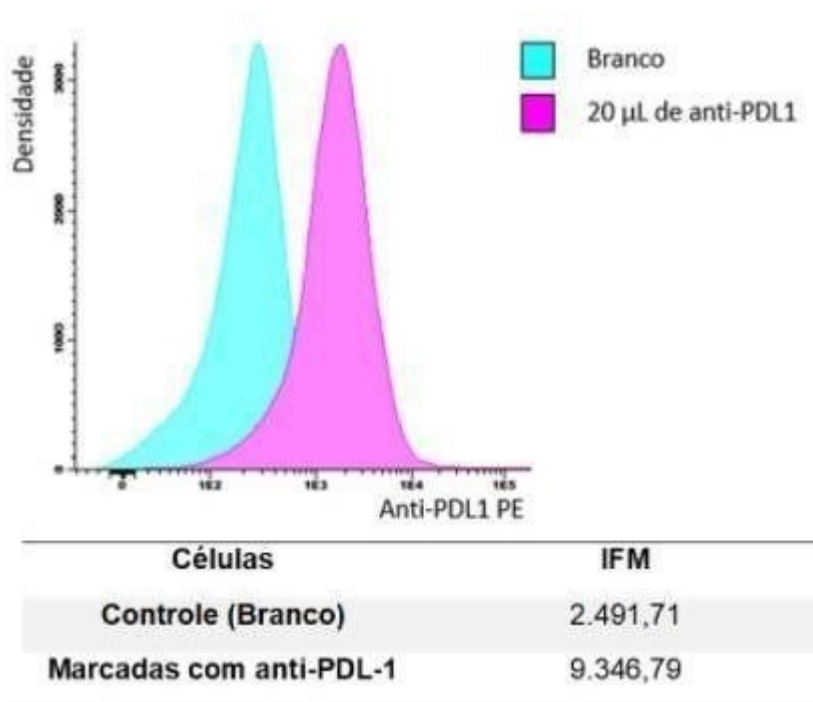
### 6.1. VALIDAÇÃO DOS BIOMARCADORES CK19, PDL-1, PD1 E -CTLA4 PARA CITOMETRIA DE FLUXO

A titulação dos anticorpos monoclonais é imprescindível para se obter a concentração ideal para separar a população de células positivas, que expressam determinado antígeno, daquelas negativas, ou seja, a melhor separação entre o sinal positivo e negativo, utilizando o cálculo do índice de marcação (IM), cuja fórmula é intensidade de fluorescência média (IFM) da população celular positiva para o marcador em estudo subtraída da IFM da população negativa. Assim, para separar a população positiva da negativa, foi comparado a IFM das células marcadas com anticorpos de interesse, em diferentes concentrações, com a IFM das células sem a marcação.

Apesar de alguns fabricantes fornecerem o volume de anticorpo recomendado nas bulas de seus produtos, a etapa de titulação é imprescindível para a qualidade das análises, pois há diferenças consideráveis de expressão antigênica entre as populações celulares. Sendo assim, inicialmente, foi avaliado a sensibilidade e especificidades de alguns anticorpos que ainda não haviam sido padronizados para utilização em citometria de fluxo, como o anti-PDL-1 e o anti-CK19.

Como pode ser observado na Figura 47, a marcação de superfície com o anti-PDL-1 (Clone MiH1, BD Pharmingen) causou aumento de aproximadamente quatro vezes da IFM nas células MDA-MD-231 marcadas em relação ao controle de células MCF-7 não marcadas (controle negativo). Como o aumento de IFM foi de aproximadamente quatro vezes e não deslocou muito para separar a população de células positivas das negativas no eixo x do histograma, foi decidido utilizar o volume de 20  $\mu\text{L}$  do anticorpo, que foi a concentração, recomendada pelo fabricante para os protocolos experimentais.

Figura 47. Validação do anticorpo anti-PDL-1 em células MDA-MB-231



Comparação entre as intensidades de fluorescência das células marcadas com anticorpos anti-PDL-1 e não marcadas. O histograma demonstra os dados de densidade populacional (eixo y) versus intensidade de fluorescência (eixo x). Abaixo os valores de fluorescência média de cada uma das populações. Fonte: O Autor.

O passo seguinte foi realizar a padronização da marcação do anticorpo anti-CK19 nas células de linhagem MCF-7, que reconhecidamente expressa o antígeno CK19.

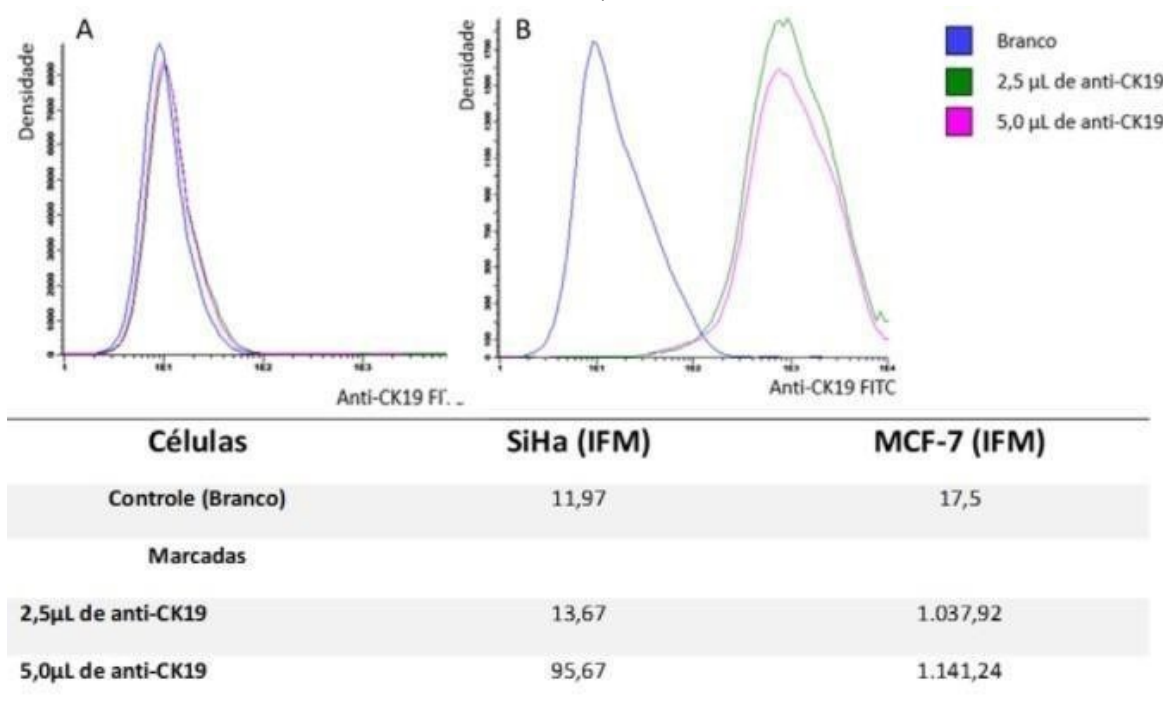
Assim, como a bula do anticorpo não continha informações sobre o volume de anticorpo a ser utilizado, foi realizada a titulação utilizando os volumes de 2,5 e de 5  $\mu\text{L}$  de anti-CK19 (Clone A53 B/A2 Invitrogen). Além das células MCF-7, também foram utilizadas as células SiHa, como controle negativo do CK19.

Como pode ser observado na Figura 48, Painel A, não houve aumento da fluorescência das células marcadas com anti-CK19 nas células SiHa, o que mostra a

especificidade do anticorpo pelo antígeno correspondente. Já na Figura 48, Painel B, pode-se observar o aumento da IFM depois da marcação das células MCF-7 com o anti-CK19 em relação as células não marcadas (controle negativo).

Ressalta-se que não houve muita diferença da IFM quando foi utilizado 2,5 ou 5  $\mu\text{L}$  de anticorpo, e, em ambos os volumes, a IFM das células positivas para o antígeno CK19 ficaram bem acima do controle negativo. Assim, por questões econômicas optou-se pela utilização de 2,5  $\mu\text{L}$ .

Figura 48. Validação e titulação do anticorpo anti-CK19 nas células SiHa (controle negativo) e MCF-7.



Comparação entre as intensidades de fluorescência das células marcadas com anticorpos anti-CK19 e não marcadas. Histograma com os dados de densidade populacional (eixo y) versus intensidade de fluorescência das células marcadas com anti-CK19 (eixo x). Painel A: células SiHa (controle negativo) e Painel B, células MCF-7, que expressam CK19. Abaixo os valores de fluorescência média de cada uma das populações. Fonte: O Autor.

Com as etapas descritas acima foi concluída a validação dos anticorpos e definido o painel de anticorpos a ser utilizado com as amostras das pacientes (APÊNDICE E). No entanto, ainda houve a necessidade de definir o número de células do sangue periférico a serem adquiridas pelo citômetro de fluxo de tal forma que fosse possível detectar células CK19 positivas, no sangue periférico.

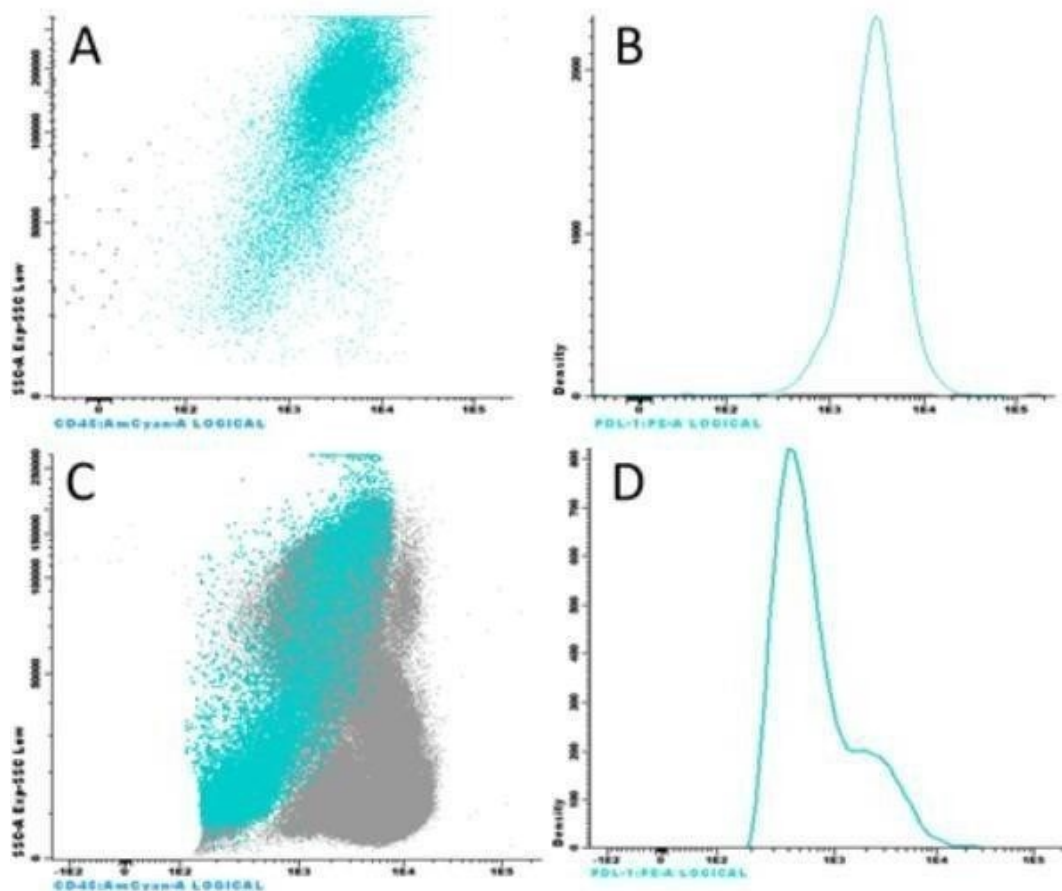
Para investigar a presença de êmbolos neoplásicos a partir da presença de células neoplásicas positivas para citoqueratinas, CK19 (Clone A53 B/A2, Invitrogen) e PAN CK

(Clone C-11, Invitrogen), no sangue periférico por citometria de fluxo, inicialmente foi necessário padronizar o número de células a serem adquiridas no citômetro de fluxo de tal forma que elas fossem detectadas, pois os êmbolos neoplásicos circulam em baixas quantidades.

Assim, como não existe um controle de células CK19 e PAN CK positivas no sangue periférico, foi utilizado o artifício de colocar 500.000 células de linhagem de carcinoma de mama (MDA-MB-231) em 3 mL de sangue periférico de doador voluntário, e, em 3 mL de PBS 0,9%. Os tubos foram marcados com anti-CD45 pan leucocitário (Clone Hi30 BD Biosciences) e anti-PDL-1 (Clone MiH1, BD Pharmingen), para os testes iniciais de detecção celular.

Nesta etapa, o anti-CK19 e o PAN CK não foram analisados, pois ainda não estavam disponíveis no laboratório, devido ao atraso no processo de importação pela empresa fornecedora. Entretanto, como pode ser observado na Figura 49, foi possível visualizar as células PDL-1 positivas no PBS 0,9% (Figura 49 Painéis A e B), e no sangue periférico (Figura 49 Painéis C e D), porém em baixas quantidades (30.000 eventos).

Figura 49. Detecção de Células MDA-MB-231 pela expressão de PDL-1 suspensas em PBS 0,9% e Sangue Periférico



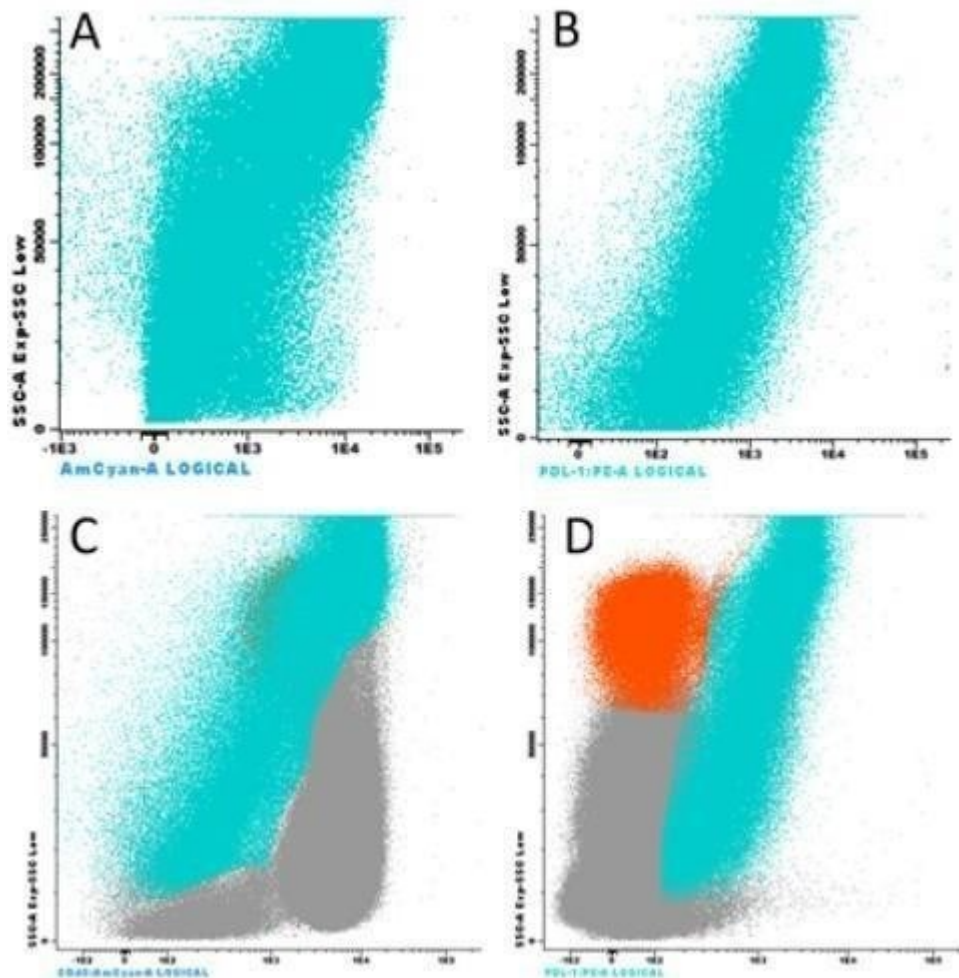
Os “Dot Plots” mostram a expressão de PDL1 nas células MDA-MB-231 suspensas em PBS 0,9% (Painel A) e em sangue periférico (Painel C). Os histogramas indicam a intensidade de fluorescência da expressão de PDL-1 nas células MDA-MB-231 suspensas em PBS 0,9% (Painel. B) e em sangue periférico (Painel D).

Fonte: O Autor.

Depois, o mesmo experimento foi repetido, porém com redução do tempo e da velocidade de centrifugação (1.200 rpm por 5 min), e as células foram ressuspensas num volume menor de sangue e PBS 0,9%, de aproximadamente 1 mL, vagorosamente, para evitar a formação de grumos. Além disso, mais cuidados foram tomados com a homogeneização. Assim, foi possível recuperar 229.000 das 500.000 células adicionadas no tubo com PBS e 234.000 células no tubo onde as células foram separadas utilizado-se Ficoll-Hypaque (Figura 50).

Esse resultado foi bom, porém como a metodologia de separação de células utilizado-se Ficoll-Hypaque é muito morosa, com necessidade de muitas lavagens de células, acredita-se que ainda há perda de muitas células, o que é importante quando se leva em conta que o número de células metastáticas no sangue periférico é muito escasso.

Figura 50. Detecção de Células MDA-MB-231 pela expressão de PDL-1 suspensas em PBS 0,9% e separadas por Ficoll-Hypaque



Os “Dot Plots” mostram a expressão de PDL1 nas células MDA-MB-231 suspensas em PBS 0,9% (Painel A) e separadas por Ficoll-Hypaque (Painel C), expressão de PDL-1 nas células MDA-MB-231 suspensas em PBS 0,9% (Painel B) e separadas por Ficoll-Hypaque (Painel D). Fonte: O Autor.

Numa outra etapa, células de um tumor de mama que foram isoladas de uma paciente doadora, foram adicionadas em 2 mL de sangue periférico (da mesma paciente doadora) e a outro tubo com PBS 0,9%. Depois separadas por Ficoll-Hypaque e pela metodologia *Bulk Lysis* (EuroFlow Standard Operating Protocol (SOP) for MRD panels, version 1.1.6 de 6 de maio de 2014). Foi possível concluir que a metodologia *Bulk Lysis* é mais eficiente em concentrar células, e, além disso é padronizada para investigação na clínica de células neoplásicas hematológicas de doença residual mínima detectável (dados não mostrados), e, por isso, foi selecionada como metodologia a ser utilizada neste estudo. Para uma maior sensibilidade do método, foi determinado a aquisição de  $5 \times 10^6$  células por tubo.



## 6.2. PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES DO ESTUDO

Na segunda etapa do estudo, 90 pacientes foram considerados elegíveis por apresentarem indicação de realização de core biópsia de nódulo de mama. Do total, uma paciente não aceitou participar do estudo, um era do sexo masculino e uma paciente tinha idade inferior a 18 anos. Sendo assim, de acordo com os critérios de inclusão, que compreendeu mulheres com idade igual ou superior a 18 anos e diagnóstico radiológico de BI-RADS® 3, 4a, 4b, 4c e 5, encaminhadas para realização de core biopsy, foram selecionados, de forma consecutiva, somente pacientes que concordaram em participar do estudo, e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

Do total de 87 mulheres entrevistadas, 25 foram excluídas pelos seguintes motivos: quatro amostras foram utilizadas para calibração dos instrumentos na primeira etapa do estudo prospectivo, três amostras foram paucicelulares e uma amostra foi excluída por erro de pipetagem no início da segunda etapa do estudo prospectivo, dois casos foram excluídos por dificuldade técnica de acesso da biópsia por core durante o exame de US, dois pacientes com estado demencial, acompanhados pelos seus tutores, não suportaram o exame por referirem dor, 11 pacientes não apresentaram conformidade entre o exame de imagem pré biópsia e o exame de imagem do momento da biópsia e foram excluídas por não terem indicação de core biópsia. Com essas exclusões, restaram 62 casos que foram incluídos no estudo, e, desses, 57 eram pacientes provenientes de atendimento ambulatorial nos serviços referidos anteriormente, e, cinco pacientes estavam internadas no Hospital Universitário.

Do total das amostras incluídas ( $n = 62$ ), 24,4% ( $n = 15$ ) não tiveram diagnóstico histológico de carcinoma de mama e 75,80% ( $n = 47$ ) receberam o diagnóstico de carcinoma da mama.

A média de idade da população do estudo foi de 52,9 anos, com variação entre 20 e 94 anos, conforme dados apresentados na Tabela 21. A paciente mais jovem com diagnóstico de câncer de mama tinha 28 anos e a mais velha 94 anos. Quando se avaliou a distribuição das doenças malignas e benignas em relação a variável idade, optou-se por dividir as pacientes em três 3 grupos distintos, conforme descrito por VIEIRA et al, 2021 (1), que discriminaram o Grupo 1 (Grupo ID1) as pacientes com idade inferior a 50 anos, Grupo 2 (Grupo ID2) pacientes com idade entre 50 e 69 anos e Grupo 3 (Grupo ID3) as pacientes com idade igualou superior a 70 anos. Como pode ser observado na Tabela 21, a maioria dos casos do estudo

ocorreu em mulheres dos Grupos ID1 e ID2, com frequência de 45,2% (n = 28) em ambas a categorias de idade. No grupo ID3 a frequência foi de 9.6% dos casos estudados.

O perfil epidemiológico do estudo retrospectivo e do estudo prospectivo, foram comparados aos padrões descritos na literatura mundial e nacional. Foi observado que carcinoma da mama foi diagnosticado em todas as mulheres do Grupo ID2, conforme Tabela 22 (100% do Grupo ID2) e em 83.33% nas mulheres do grupo ID3. Quando foi avaliado os 47 casos (100%) com diagnóstico de malignidade, as frequências de acordo com a faixa etária são 29.8% no Grupo ID1, 59.5% para o Grupo ID2 e 10.7% para o Grupo ID3, com alta frequência dos diagnósticos de malignidade no Grupo ID2. Um resultado semelhante foi observado no estudo retrospectivo, que identificou uma maior prevalência da doença entre mulheres dessa faixa etária (48.8%) VIEIRA, et al, 2021 (1). Como descrito na literatura, a maioria dos casos ainda ocorre em mulheres com idade a partir dos 50 anos (WHO, 2019). De fato, a incidência do câncer, de um modo geral, aumenta drasticamente com a idade, pelos riscos relacionados a senescência e pela tendência de redução da eficácia nos mecanismos de reparo celular. Além disso, no carcinoma da mama uma das consequências da idade elevada ao diagnóstico é a apresentação de subtipos tumorais mais agressivos (WHO, 2019; NIETO- JIMÉNEZ, et al., 2016; CABAÑAS, et al., 2021). Das 28 mulheres do Grupo ID 1, 14 (50%) tiveram diagnóstico de malignidade (Tabela 22). Apesar do CDI ser descrito como uma doença rara em mulheres jovens, a incidência de carcinoma de mama começa e ser mais expressiva a partir dos 40 anos de idade (WHO, 2019; INCA, acesso em 10/03/2022).

Na análise da variável inspeção das mamas, foi verificado que não houve alterações nas 15 pacientes com diagnóstico benigno, e, em 33 (70.2%) de 47 casos malignos (Tabela 22). Entretanto, em 29.8% (n = 14) dos casos malignos (n= 47) as mulheres apresentaram alterações de exame físico no “tempo 0” diagnóstico, independente do grupo idade. As principais alterações observadas foram as alterações na pele da mama e mamilo. Quando foi avaliado pelo grupo idade, foi identificado que 80% das mulheres do Grupo ID3 apresentaram sinais de hiperemia, distorções ou ulcerações cutâneas, que caracterizam o estágio clínico cT4. O câncer de mama cT4 é um tumor de qualquer tamanho, que invade a parede do tórax ou a pele, e podem ser classificados como do tipo não inflamatório ou do tipo inflamatório, o que representa, muitas vezes, um quadro de pior prognóstico (KIM, et al., 2015; CORSO, et al., 2021). É uma condição rara, afeta até 5% dos CDI, e é responsável por 7% da mortalidade (VERMEULEN PB, VAN GOLEN KL, DIRIX LY, 2010; DAWOOD, et al., 2011; POSTLEWAIT, et al., 2020; LIU, et al., 2017).

A variável história familiar positiva para câncer de mama, questionada em todas as pacientes, foi identificada em 38.3% (n = 18) das pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama (n = 47) (Tabela 22). Quando comparada pelos grupos idade (Grupo ID1, Grupo ID2 e Grupo ID3), foi observado que 42.8% (n = 6) das pacientes do Grupo ID 1 e 42.9% (n = 12) pacientes do Grupo ID2 tinham história familiar positiva. No Grupo ID3 nenhuma paciente referiu história familiar positiva. O histórico familiar de carcinoma de mama é um dos fatores de risco, pois a ocorrência da doença pode ser potencializada. Estima-se que 5 a 10% dos casos de carcinoma de mama estejam relacionados ao risco genético, tornando importante o aconselhamento e mapeamento genético dessas mulheres, com indicação de delineamento histórico de até três gerações. As pacientes de risco, deve iniciar os exames preventivos mais precocemente, de acordo com as recomendações descritas do item 2.2.3.2 (RECOMENDAÇÕES PARA ACOMPANHAMENTO DE PACIENTE DE RISCO).

Tabela 21. Dados demográficos da amostra.

Grupo idade	Casos do estudo	Idade (anos)
	% (N)	menor idade e maior idade
<b>Grupo ID1</b>	45.2 (28)	20 - 49
<b>Grupo ID2</b>	45.2 (28)	50 - 69
<b>Grupo ID3</b>	9.6 (06)	70 - 94
<b>Total</b>	100 (62)	20 - 94

N: número de casos; Grupos foram divididos de acordo com as faixas etárias, em anos. Grupo ID1= Grupo 1 idade <50 anos; Grupo ID2= Grupo 2 idade: 50-69 anos; Grupo ID3= Grupo 3 idade: ≥70 anos.

Para a análise da categoria BI-RADS® (BIRADS), descrita nas Tabelas 22 e 23 e coletada de todas as pacientes do estudo, o critério de avaliação foi comparar a categoria numérica da variável com o diagnóstico de benignidade e malignidade. Como pode ser observado, todas as pacientes com a categoria B3 e B4a (risco de malignidade entre 0 e ≤ 10%) tiveram o diagnóstico de benignidade. No outro extremo foi observado que 100% dos casos B5 (risco de malignidade ≥ 95%) tiveram o diagnóstico de malignidade. Destacam-se os B4b e B4c (Tabela 23) com frequência de 80% e 92.3%, respectivamente, nas pacientes do estudo.

O sistema de classificação é uma das ferramentas clínicas mais importantes na comunicação entre equipe multidisciplinar no diagnóstico e acompanhamento da doença (MILANI, et al., 2007; FRANKEL, et al., 2011 MAGNY, SHIKHMAN AND KEPPKE,

2022). Esse sistema proposto pelo Colégio Americano de Radiologia em 1986, foi publicado quase uma década depois, em 1993. A principal função foi padronizar a avaliação do risco de câncer de mama, que pode variar de 0 até mais que 95%, conforme descrita anteriormente na Tabela 1 (MAGNY, SHIKHMAN AND KEPPKE, 2022).

O rastreamento por mamografia para o grupo sem risco é indicado para mulheres com idade entre 50 e 69 anos, e, não preconizado para os grupos de mulheres do Grupo ID 1 (com idade  $\leq 50$  anos) e mulheres do Grupo ID3 ( $\geq 70$  anos) de acordo com as políticas públicas mundiais (WHO, 2019). Como pode ser observado na Tabela 22, a frequência da doença por faixa etária foi de 50.0% no Grupo ID1 e 83.33% no Grupo ID3, o que mostra um panorama muito assustador, pois são grupos de mulheres muito vulneráveis, e que apresentam maior probabilidade de diagnóstico tardios, com doenças clinicamente mais avançadas ao “tempo 0” do diagnóstico pela falta do controle do rastreio mamográfico. Esse panorama foi observado na nossa amostra (Figura 15).

Tabela 22. Frequência das variantes clínicas pelos grupos idade entre doença benigna e doença maligna

<b>Doença</b>	<b>Grupo ID1</b> % (N)	<b>Grupo ID2</b> % (N)	<b>Grupo ID3</b> % (N)	<b>Total</b> % (N)
Benignos	50,00(14)	00,00(00)	16,66(01)	24,19(15)
Malignos	50,00(14)	100,00(28)	83,33(05)	75,81(47)
Total	100(28)	100(28)	100(06)	100(62)

<b>Doença maligna</b>	<b>Grupo ID1</b> % (N)	<b>Grupo ID2</b> % (N)	<b>Grupo ID3</b> % (N)	<b>Total</b> % (N)
Inspeção +	28.6 (04)	21.4 (06)	80.0 (04)	29.8 (14)
Inspeção -	71.4 (10)	78.6 (22)	20.0 (01)	70.2 (33)
Total	100.00 (14)	100.00(28)	100.00(05)	100.00(47)

<b>Doença maligna</b>	<b>Grupo ID1</b> % (N)	<b>Grupo ID2</b> % (N)	<b>Grupo ID3</b> % (N)	<b>Total</b> % (N)
História Familiar +	42.8 (06)	42.9 (12)	00.0 (00)	38.3 (18)
História Familiar -	57.2 (08)	57.1 (16)	100.0 (05)	61.7 (29)
Total	100.0 (14)	100.0 (28)	100.0 (05)	100.0 (47)

<b>Doença maligna</b>	<b>Grupo ID1</b> % (N)	<b>Grupo ID2</b> % (N)	<b>Grupo ID3</b> % (N)	<b>Total</b> % (N)
BI-RADS 3	00.0(00)	00.0(00)	00.0(00)	00.0(00)
BI-RADS4a	00.0(00)	00.0(00)	00.0(00)	00.0(00)

BI-RADS 4b	21.4 (03)	3.6 (01)	00.0(00)	8.0 (04)
BI-RADS 4c	28.6 (04)	21.4 (06)	40.0(02)	25.0(12)
BI-RADS 5	50.0 (07)	75.0 (21)	60.0(03)	67.0 (31)
Total	100.0 (14)	100.0 (28)	100.0 (05)	100.0(47)

No item Doença: Benignos (não carcinoma invasivo da mama), Maligna (carcinoma invasivo da mama) Grupo ID1: mulheres com idade menor que 50 anos; GrupoID2: mulheres com idade entre 50 e 69 anos; Grupo ID3: mulheres com idade de 70 anos ou mais. Distribuição da doença maligna com inspeção das mamas: Inspeção +: alteração macroscópica da pele da mama e Inspeção -: ausência de alteração macroscópica da pele da mama, e a relação com o grupo idade (Grupo ID 1: mulheres com idade menor que 50 anos; Grupo ID 2: mulheres com idade entre 50 e 69 anos; Grupo ID 3: mulheres com idade de 70 anos ou mais.) - Distribuição da doença benigna e maligna e a variável história familiar: Grupo HF 1: mulheres com história positiva de familiar com carcinoma de mama ou ovário, ou carcinoma de mama em familiar masculino e Grupo HF 2: mulheres com história negativa de familiar com carcinoma de mama ou ovário, ou carcinoma de mama em familiar masculino) em relação ao grupo idade (Grupo ID 1: mulheres com idade menor que 50 anos; Grupo ID 2: mulheres com idade entre 50 e 69 anos; Grupo ID 3: mulheres com idade de 70 anos ou mais.). as categorias BI-RADS® com relação ao diagnóstico de benignidade e malignidade e as frequências das distribuições de carcinoma de mama. Através dos grupos de BI-RADS® 3; 4a; 4b; 4c e 5, descritos na Tabela 1.

Tabela 23. Distribuição da doença benigna e maligna pelo BI-RADS®:

Diagnósticos	BI-RADS® 3	BI-RADS® 4a	BI-RADS® 4b	BI-RADS® 4c	BI-RADS® 5	Total % (N)
	% (N)	% (N)	4b % (N)	% (N)	% (N)	
<b>Benignos</b>	100.00 (01)	100.00 (12)	20.00 (01)	7.70 (01)	00.00 (00)	24.20 (15)
<b>Malignos</b>	00.00 (00)	00.00 (00)	80.00 (04)	92.30 (12)	100.00 (31)	75.80 (47)
<b>total</b>	100.00 (01)	100.00 (12)	100.00(05)	100.00 (13)	100.00 (31)	100.00(62)

A Tabela apresenta as categorias BI-RADS® com relação ao diagnóstico de benignidade e malignidade e as frequências das distribuições de carcinoma de mama. Através dos grupos de BI-RADS® 3; 4a; 4b; 4c e 5, descritos na Tabela 1.

### 6.3. PERFIL HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

Em relação as características histológicas das amostras, identificamos como tipo histológico predominante o CDI NST com prevalência de 85% (n = 40) seguido pelo CLI, presente em 15% (n = 7) dos casos. As variáveis Grau Histológico combinado de Nottinham e Grau Nuclear foram apresentadas conforme Vieira et al, 2021(1), e estão descritas na Tabela 24. Como exposto, pode-se observar que as variáveis morfológicas mais prevalentes foram grau histológico 2 (G2) e grau nuclear 3 (G3) com frequência de 42,5% e 55,4%, respectivamente. No estudo retrospectivo, a frequência dos tipos histológicos foi 92.5% e 7,5% para CDI e CLI, respectivamente. O G2 histológico e o G3 nuclear foram os mais incidentes na amostra, presentes em 42,55% e 55,31% dos casos, respectivamente. Os resultados do estudo prospectivo, com exceção do grau nuclear, corroboram com os dados da

literatura que descrevem a faixa etária entre 50 e 69 anos com a de maior incidência para o carcinoma de mama, e maior prevalência nas categorias grau histológico 2 e o tipo histológico CDI NST (WHO, 2019). Na série histórica de 24 anos, descrito por VIEIRA, et al., 2021, (1) a maior frequência foi G2 histológico (46.2%, n = 617) e o G2 nuclear (50.8%, n = 678). A graduação histológica dos tumores é um fator prognóstico consistente para orientar a terapia adjuvante nos carcinomas invasivos (WHO, 2019). O grau histológico 3 é considerado um fator de mau prognóstico, e está associado com a indiferenciação nuclear e maior agressividade da doença (VIEIRA, et al., 2008; DING, et al., 2019; WHO, 2019).

Tabela 24. Frequência entre grau histológico e nuclear

	Grau Histológico	Grau Nuclear
	% (N)	% (N)
<b>G1</b>	17.0 (8)	12.7 (6)
<b>G2</b>	42.5 (20)	31.9 (15)
<b>G3</b>	40.5 (19)	55.4 (26)
<b>Total</b>	100 (47)	100 (47)

N: número de casos; variável grau histológico (G1= Grau 1/ bem diferenciado; G2= Grau 2/moderadamente diferenciado; G3= Grau 3/mal diferenciado) e variável grau nuclear (G1= Grau 1/baixo grau; G2= Grau 2/grau intermediário; G3 Grau 3/ alto grau).

#### 6.4. ANÁLISE CONJUNTA DOS BIOMARCADORES RE, RP, HER2, KI67 E PDL1 NO TECIDO MAMÁRIO

A expressão dos biomarcadores demonstrada na Tabela 25 revela que 72,3 % dos casos estudados foram positivos para RE, 68% para RP e 23,4% (n= 11) apresentou superexpressão da oncoproteína HER2. De acordo com a literatura, o RE pode estar presente em 60 a 75% dos carcinomas invasivos da mama (SORLIE T, 2004; BRAUN, et al., 2013), e sua análise deve ser realizada em todos os tumores primários da mama, por ser um fator prognóstico e preditivo importante, para o tratamento adjuvante (PRAT e PEROU, 2010; AHN, et al., 2015, AMIN, et al., 2017; WHO, 2019). O RP, presente em até 65% dos casos de carcinoma de mama tem maior associação com a sobrevida global (BRAUN, et al., 2013; BURSTEIN, et al., 2014). A superexpressão da oncoproteína HER2 está presente em 20 a 30 % dos tumores de mama, e, está associada a tumores de pior prognóstico, e com o fator preditivo a resposta a terapia alvo (PRAT AND PEROU, 2010; NG, et al., 2015; WHO, 2019; SHAK S., 1999).

Quando os critérios da conferência de St Gallen foram utilizados, o qual inclui a avaliação do índice proliferativo pelo Ki67 aos biomarcadores RE, RP e HER2, foi identificado que o subtipo luminal foi o mais incidente, presente em 57.5% (Tabela 26).

Quando o subtipo luminal foi estratificado em luminal A e luminal B Her (-), foi constatado que 47 % (n= 22) da população amostral foi do tipo luminal B/HER2-, e 10.5% (n= 5) foi do subtipo luminal A.

O TNBC foi o segundo subtipo mais prevalente, identificado em 19% (n= 9) dos casos, seguido pelo luminal B/HER 2+ com 15 % (n= 7) dos casos.

A comparação dos resultados atuais com o estudo retrospectivo, que determinou a prevalência num intervalo de tempo de 24 anos, foi observado um padrão onde 23.4% de casos foram to subtipo luminal A, 32.0% foram luminal B/HER2+, 9.9% luminal B/HER2+, 6,7% HER2+ e 14,1%TNBC (Tabela 10).

De acordo com a literatura, o luminal A, inicialmente era o subtipo mais comum, porém, com a aplicação dos critérios do consenso de St Gallen (GOLDHIRSCH, et al., 2013), o subtipo mais comum passou a ser o Luminal B (GOLDHIRSCH, et al., 2013; AHN, et al., 2015). A partir desse rearranjo, o tipo luminal A foi posicionado no grupo de tumores indolentes, de melhor prognóstico e mais sensível à terapia endócrina e os subtipos luminal B (tanto HER2- quanto o HER2+) por apresentarem índice proliferativo alto (CHEANG, et al., 2009; NIELSEN, et al., 2010), entraram na categoria dos tumores de pior prognóstico, com baixa resposta a terapia endócrina (AHN, ta al., 2015; FOULKES, SMITH, REIS-FILHO, 2010).

Tabela 25. Frequência dos biomarcadores RE, RP e HER2 nas amostras de carcinoma invasivo da mama

	<b>RE</b> % (N)	<b>RP</b> % (N)	<b>HER2</b> % (N)
<b>Positive</b>	72,3 (34)	68.0 (32)	23.4 (11)
<b>Negative</b>	27.7 (13)	32.0 (15)	76.6 (36)
<b>Equivocal</b>	00.0(00)	00.0(00)	00.0 (00)
<b>Total</b>	100 (47)	100 (47)	100 (47)

Grupo variável Biomarcadores RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; com base em resultados imuno-histoquímicos.

Tabela 26. Prevalência dos subtipos RE, RP, HER2 e Ki67 nas amostras de carcinoma invasivo da mama de acordo com a Conferência de St Gallen

Subtipos	RE	RP	HER2+	Ki-67	% (N)
<b>Luminal A</b>	+	+/-	-	baixo	10.6 (5)
<b>Luminal B/HER2-</b>	+	+/-	-	alto	47.0 (22)
<b>Luminal B/HER2+</b>	+	+/-	+(3+)	qualquer	19.2 (9)
<b>HER2+</b>	-	-	+(3+)	qualquer	4.2 (2)
<b>TNBC</b>	-	-	-	qualquer	19.2 (9)
<b>Indeterminado</b>	+/-	+/-	+(2+)	qualquer	0 (0)
<b>Não classificado</b>	-	+	qualquer	qualquer	0 (0)
<b>Total</b>					100 (47)

IHC: subtipos imuno-histoquímicos; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; Ki67: Marcador de Proliferação; TNBC: carcinoma de mama triplo negativo; +: positivo; -: negativo; +/-: positivo ou negativo; +(3+): positivo se pelo menos 10% das células tumorais apresentaram um escore de coloração da membrana celular de 3+; N: número de casos.

Um dos objetivos do estudo foi a avaliação do PDL-1 por IHQ e a avaliação da sua expressão com os imunofenótipos baseados nos critérios da conferência de St Gallen. Como pode ser observado na Tabela 27, o anticorpo PDL-1 (clone 28.8, ABCAM) foi avaliado por IHQ em todos os 62 casos, entretanto, em um caso maligno (TNBC) não foi possível realizara análise pela escassez de amostra core. Dos 61 casos analisados, todos os benignos não expressaram o PDL-1 (n = 14), no entanto, em relação aos casos malignos (n = 46), 21.74% da amostra analisada foi positiva com o seguinte padrão de expressão: sete amostras expressaram PDL-1 + (1+) e três amostras PDL-1 ++ (2+).

Quando os imunofenótipos foram associados com a expressão do PDL1, foi observado que não há associação entre o subtipo luminal A e a expressão de PDL1. Dos casos positivos, três foram luminais B HER-, três casos de luminal B/HER2+ e quatro casos foram TNBC (Tabela 27). Nossos resultados corroboram aos da literatura, que descrevem os casos positivos para PDL-1 tumores de pior prognóstico, com alto índice proliferativo, TNBC, HER2 positivo e com invasão vascular presente (GHEBEH, et al., 2006; SOLIMAN, et al., 2014;



MITTENDORF, et al., 2014; PARK, et al., 2015; SUN, et al., 2016; BECKERS, et al., 2016; KWAPISZ D, 2021).

A PDL-1 é uma proteína envolvida com a supressão do sistema imunológico, a sua superexpressão pelas células tumorais pode levar a um mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro, o que justifica a sua associação com os subtipos de pior prognóstico (CHEN AND MELLMAN, 2013; QIN et al., 2015; MINGHUI et al., 2017).

Como pode ser observado na Tabela 28, todos os casos positivos para o PDL-1 apresentaram o alto índice proliferativo (Ki67). Como citado anteriormente, tumores de mama que expressam PDL-1 são propensos a estarem associados aos índices proliferativos mais elevados, com receptores hormonais de estrogênio e de progesterona negativos e subtipo TNBC (KARNIK, et al, 2018, KWAPISZ D, 2021). Neste estudo, seis casos apresentaram RH positivo, associados ao alto índice proliferativo, e 50 % desses, tiveram associação com superexpressão do HER 2+ (luminal B HER21+). Em relação ao subtipo TNBC, os resultados mostraram uma frequência de 40% (Tabela 27). De acordo com a literatura, de 20 a 58% dos casos TNBC expressam PDL1, e, a maioria dos estudos mostra expressão geral entre 10 e 20 % em relação a todos os subtipos (MITTENDORF, et al., 2014; ALI, et al., 2015; HUANG, et al., 2019; Dill, et al., 2017; Mori, et al., 2017; QUE. et al., 2017), os nossos resultados mostram uma frequência de 21.74% em relação a todos os subtipos (n = 46) (Tabela 27).

Tabela 27. Distribuição do PDL-1 por subtipos tumorais por IHQ.

Subtipos	PDL-1 positivo % (N)	PDL-1 negativo % (N)	PDL-1 não realizado % (N)
Luminal A	00.0(00)	13.9 (05)	00.0(00)
Luminal B/HER2-	30.0(03)	52.8 (19)	00.0(00)
Luminal B/HER2+	30.0(03)	16.7 (06)	00.0(00)
HER2+	00.0(00)	5.5 (02)	00.0(00)
TNBC	40.0(04)	11.1(04)	100.0(01)
Total	100.0(10)	100.0 (36)	100.0(01)

IHC: subtipos imuno-histoquímicos; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; Ki67: Marcador de Proliferação; TNBC: carcinoma de mama triplo negativo; N: número de casos

Tabela 28. Aspectos clínicos e laboratoriais das pacientes com PDL-1 positivo

Identificação	CTC	axila +	Metástase a distância	PDL-1 linfócitos	Invasão vascular	Ki67	Imunofenótipo
Caso 9	Não	Não	Não	Presente	Não	Alto	TNBC
Caso 36	Não	Sim	Não	Presente	Não	Alto	Luminal B/HER2+
Caso 37	Não	Não	Não	Presente	Não	Alto	Luminal B/HER2-
Caso 42	Não	Não	Não	Presente	Sim	Alto	TNBC
Caso 44	Não	Sim	Não	Presente	Não	Alto	Luminal B/HER2-
Caso 46	Não	Sim	Não	Presente	Sim	Alto	TNBC
Caso 47	Não	Sim	Não	Presente	Não	Alto	Luminal B/HER2+
Caso 51	Não	Não	Não	Presente	Não	Alto	Luminal B/HER2-
Caso 55	Não	Não	Não	Presente	Sim	Alto	Luminal B/HER2+
Caso 59	Não	Sim	Não	Presente	Não	Alto	TNBC

Identificação, número do caso de acordo com a posição da coleta, CTC, células tumorais circulantes no sangue periférico, Axila += metástase axilar identificada pelo exame US, PDL-1 linfócitos= expressão positiva de PDL-1 nos linfócitos, Invasão vascular= detectada pelo exame histológico, Ki-67= marcador do índice proliferativo tumoral por imuno-histoquímica, Imunofenótipo; subtipos de acordo com a Conferência de St Gallen.

Depois, foram comparados os subtipos tumorais do carcinoma de mama de pior e melhor prognósticos, avaliados pelo imunofenótipo (não luminal A, luminal A) com a expressão de PDL-1 (Tabela 28) e foi possível constatar que 10 pacientes (21.74 % dos casos malignos) com subtipos de pior prognóstico expressavam o marcador. Na avaliação da importância da IHQ para comparar os subtipos de pior prognóstico não luminal A com o Luminal A com a expressão do PDL-1 (Tabela 29), foi observado uma Sensibilidade (S) de 100%, Especificidade (E) de 13,89%, Razão de Verossimilhança Positiva (RVP) de 1,16; Razão de Verossimilhança Negativa (RVN) de 0,00, Valor Preditivo Positivo (VPP) de 0,23%, Valor Preditivo Negativo (VPN) de 100,00% e Acurácia de 14,06%. Ainda na mesma Tabela, pode-se observar que quando foi analisado o desempenho da IHQ para avaliar os subtipos de pior prognóstico de forma individual em relação ao luminal A, os resultados mostraram valores de sensibilidade de 100% em todas as análises, mas a melhor acurácia foi em relação ao resultado TNBC, com valor de 55.64% (alta) com RVN 0.00 (acurácia ótima).

Tabela 29. Descrição dos grupos de associação de pior prognóstico e a expressão do PDL1.

Grupo de associação	S	E	RVP	RVN	VPP	VPN	Acurácia
Grupo 1	100.0%	13.89%	1.16	0.00	0.23%	100.0%	14.6%
Grupo 2	100.0%	20.83%	1.26	0.00	0,25%	100.0%	20.99%
Grupo 3	100.0%	38.46%	1,63	0.00	0,32%	100.0%	38.58%
Grupo 4	100.0%	55.56%	2.25	0.00	0,45%	100.0%	55.64%

Grupo 1: subtipos doença não luminal A X luminal A; Grupo 2: subtipo doença Luminal B HER2- x luminal A; Grupo 3: Subtipo HER2+X luminal A; Grupo 4: Subtipo TNBC X luminal A. Sensibilidade (S), Especificidade (E), Razão de Verossimilhança Positiva (RVP); Razão de Verossimilhança Negativa (RVN), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) e Acuracia (A).

#### 6.5. AVALIAÇÃO DOS LEUCÓCITOS EM SANGUE PERIFÉRICO (SP) E EM AMOSTRAS DE BIÓPSIA DE PACIENTES COM CDI E SUA RELAÇÃO COM OS SUBTIPOS TUMORAIS

Como visto anteriormente, o sistema imune tem um papel importante tanto na progressão da doença quanto no tratamento do câncer de mama (CHUNG et al., 2017). O valor prognóstico dos linfócitos intratumorais tem sido demonstrado no carcinoma de mama (DENKERT et al., 2010; LOI et al., 2013). Além disso, o microambiente tumoral e o aumento do infiltrado inflamatório intratumoral está relacionado com taxas de resposta patológica completa (pCR) e com a melhora na sobrevida (DENKERT et al., 2010; MAHMOUD et al., 2011; MOHAMMED et al., 2012; LEE et al., 2013), especialmente nos casos de TNBC (LOI et al., 2014; IBRAHIM et al., 2014). Considerando o exposto, neste trabalho, também foi avaliado os valores relativos e absolutos dos leucócitos das amostras de sangue periférico (SP) e amostras teciduais e a sua relação com a malignidade e subtipos de tumorais.

A análise relativa e absoluta da população leucocitária e de subtipos de linfócitos foi avaliada em SP e no tecido mamário das amostras de core. A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos para a avaliação das células do sistema imune nas amostras de SP. As pacientes foram subdivididas em casos benignos (controle) e malignos (CDI). A partir dessa análise, foi possível observar que de todos os tipos de células analisadas somente os linfócitos T gama delta (GD) apresentaram redução nos valores relativos ( $P = 0,011$ ) e absolutos ( $P = 0,025$ ), nas amostras de pacientes com neoplasias malignas quando comparadas às pacientes controle (casos benignos). Entre os componentes do microambiente tumoral, pode-se incluir os linfócitos T GD. Essa população celular apresenta um potencial único, pois reconhecem as células tumorais de forma independente à apresentação do antígeno MHC, e, assim podem

iniciar rapidamente a resposta imune, pois possuem a capacidade de ligar a resposta imune inata e adaptativa, isso sugere que possam ter um papel promissor na imunoterapia (MORROW, ROSEWEIR AND EDWARDS, 2019). No entanto, há trabalhos que mostram que os LT GD também podem ter um papel pró-tumorigênico (MA, et al., 2012; REI, et al., 2014; RONG, et al., 2016). Em especial, no câncer de mama, há trabalhos que sugerem que a eficácia dos linfócitos T GD contra tumores possa estar relacionada aos subtipos moleculares (MORROW, ROSEWEIR AND EDWARDS, 2019). Baseado nisso, numa próxima etapa do trabalho foi avaliado a associação dos leucócitos com os subtipos de CDI.

Tabela 30. Leucócitos presentes no sangue periférico das pacientes com CDI, comparados de acordo com a malignidade.

Variável	Benigno	Maligno	P
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	7395 (3350 – 9670)	7230 (4350 – 15830)	0,619
Neutrófilos (%Leucócitos)	62,31 (45,84 – 88,95)	62,88 (38,36 – 82,17)	0,722
Neutrófilos/mm <sup>3</sup>	4422,72 (1688,06 – 8601,46)	4461,63 (1825,94 – 10555,07)	0,578
Monócitos (%Leucócitos)	7,53 (3,44 – 14,64)	6,83 (3,33 – 10,73)	0,403
Monócitos/mm <sup>3</sup>	533,05 (252,49 – 976,50)	473,25 (195,47 – 1218,52)	0,767
Eosinófilos (%Leucócitos)	1,39 (0,44 – 13,65)	1,45 (0 – 9,29)	0,860
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	96,31 (36,04 – 952,77)	90,21 (0 – 1171,47)	0,897
Basófilos (%Leucócitos)	0,50 (0,15 – 1,39)	0,61 (0,02 – 1,33)	0,668
Basófilos/mm <sup>3</sup>	33,14 (14,50 – 125,10)	45,20 (1,17 – 166,29)	0,404
Linfócitos totais (%Leucócitos)	26,83 (3,85 – 40,74)	25,62 (7,95 – 51,49)	0,457
Linfócitos totais/mm <sup>3</sup>	1754,75 (372,29 – 3666,60)	1865,39 (584,72 – 3711,46)	0,527
Linfócitos T (%Leucócitos)	17,91 (2,99 – 27,31)	17,49 (5,24 – 35,64)	0,627
Linfócitos T/mm <sup>3</sup>	1208,22 (289,13 – 2457,90)	1218,36 (375,72 – 2707,36)	0,638
Linfócitos TCD4 (%Leucócitos)	11,09 (1,61 – 19,18)	11,48 (2,06 – 20,75)	0,407
Linfócitos TCD4/mm <sup>3</sup>	681,51 (155,69 – 1726,20)	744,46 (110,00 – 1852,56)	0,419
Linfócitos TCD8 (%Leucócitos)	4,57 (1,33 – 12,84)	4,98 (1,43 – 21,34)	0,911
Linfócitos TCD8/mm <sup>3</sup>	298,33 (105,43 – 956,58)	307,86 (91,61 – 1099,64)	0,867
<b>Linfócitos T GD (%Leucócitos)</b>	<b>0,90 (0,25 – 4,20)</b>	<b>0,59 (0 – 3,61)</b>	<b>0,011*</b>
<b>Linfócitos T GD/mm<sup>3</sup></b>	<b>64,80 (19,10 – 293,16)</b>	<b>39,98 (0 – 240,83)</b>	<b>0,025*</b>
Linfócitos T DP (%Leucócitos)	0,12 (0,02 – 0,61)	0,17 (0,02 – 1,60)	0,409
Linfócitos T DP/mm <sup>3</sup>	9,60 (1,93 – 54,90)	14,51 (1,07 – 117,76)	0,354
Linfócitos T DN (%Leucócitos)	0,14 (0,03 – 0,69)	0,09 (0,01 – 1,45)	0,076

Linfócitos T DN /mm <sup>3</sup>	10,17 (2,90 – 51,40)	6,77 (0,95 – 77,43)	0,092
Linfócitos B (%Leucócitos)	2,64 (0,16 – 5,73)	2,56 (0,49 – 6,71)	0,482
Linfócitos B/mm <sup>3</sup>	180,04 (11,17 – 399,95)	191,08 (26,16 – 518,68)	0,570
Linfócitos B maduros (%Leucócitos)	2,62 (0,11 – 5,66)	2,54 (0,47 – 6,71)	0,455
Linfócitos B maduros/mm <sup>3</sup>	178,85 (7,68 – 395,07)	188,87 (25,10 – 518,68)	0,570
Plasmablastos (%Leucócitos)	0,04 (0,01 – 0,14)	0,03 (0 – 0,16)	0,135
Plasmablastos/mm <sup>3</sup>	3,15 (0,67 – 15,30)	2,15 (0 – 16,85)	0,103
NK (%Leucócitos)	3,36 (0,20 – 8,05)	3,72 (1,15 – 11,81)	0,389
NK /mm <sup>3</sup>	231,83 (19,34 – 724,50)	265,59 (54,39 – 692,99)	0,281
NK 56++ (%Leucócitos)	0,14 (0,02 – 0,20)	0,15 (0,04 – 4,14)	0,310
NK 56++/mm <sup>3</sup>	8,77 (1,93 – 15,30)	11,48 (2,93 – 320,02)	0,364
NKT (%Leucócitos)	1,57 (0,13 – 5,14)	1,20 (0,19 – 6,84)	0,748
NKT/mm <sup>3</sup>	94,86 (12,57 – 382,93)	84,14 (16,23 – 503,42)	0,583
Relação TCD4/TCD8	1,81 (0,74 – 3,97) a	2,04 (0,37 – 8,27)	0,643
Relação N/L	2,40 (1,12 – 23,10)	2,48 (0,74 – 10,18)	0,781
Monócitos CD56+ (%monócitos)	6,63 (2,14 – 12,68)	8,13 (0 – 21,23)	0,167

As diferenças foram testadas pelo teste de Mann-Whitney. \*P ≤ 0,05 foi considerado significativo. GD: gamma/delta; DP: duplo positivo; DN: duplo negativo; NK: natural killer; NKT: natural killer T; relação N/L: relação neutrófilo/linfócito; TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

Assim, além de subdividir as pacientes em casos benignos e malignos, os leucócitos e populações linfocitárias também foram comparados em relação aos subtipos de CDI (luminal A, luminal B HER2-, HER2+ agrupando os subtipos luminal B HER2+ e HER2+ e oTBNC).

Como pode ser observado na Tabela 31, não foram observadas diferenças significativas, com excessão dos valores da relação CD4/CD8 das pacientes com CDI do subtipo Luminal A quando comparadas tanto aos casos benignos quanto aos demais subtipos tumorais. Essas pacientes apresentaram relação CD4/CD8 superior aos demais grupos (P = 0,017). Ao analisar a relação CD4/CD8 em comparação aos subtipos tumorais, pode-se

observar que os subtipos mais agressivos, apresentaram maior expressão de CD8 na circulação periférica em relação ao CD4 (circulatório). Conseqüentemente houve uma diminuição da relação CD4/CD8 no sangue periférico nos tumores de pior prognóstico. A alta relação do CD4/CD8 observada no subtipo luminal A pode estar relacionada a característica de menor agressividade desse subtipo. As células CD4+ (Th1) e CD8+ estão relacionadas com a atividade antitumoral e explicações sobre a associação entre as proteínas imunológicas e o infiltrado inflamatório peritumoral tem importância clínica (BATES, et al., 2006; MAHMOUD et al., 2011; GU-TRANTIEN et al., 2013; CHUNG et al., 2017). Os linfócitos intratumorais, principalmente linfócitos T tem um papel muito importante nas repostas imunes tumorais, e em geral os CD8+ são um bom indicador prognóstico (NAITO, et al., 1998; SCHUMACHER, et al., 2001; FUKUNAGA, et al., 2004; HIRAOKA, et al., 2006; MATSUMOTO, et al., 2016).

Tabela 31. Leucócitos presentes no sangue periférico das pacientes com CDI, comparados de acordo com o subtipo de neoplasia.

Variável	Benigno	Luminal A	Luminal B	HER2+	TBNC	P
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	7395 (3350 - 9670)	7850 (5870 - 10530)	6830 (4350 - 13550)	7270 (5310 - 12090)	5680 (4810 - 15830)	0,924
Neutrófilos (%Leucócitos)	62,31 (45,84 - 88,95)	62,23 (48,39 - 82,17)	63,92 (38,36 - 80,94)	61,57 (51,59 - 72,31)	67,84 (54,63 - 77,44)	0,977
Neutrófilos/mm <sup>3</sup>	4422,72 (1688,06 - 8601,46)	4381,16 (3640,03 - 7377,32)	4449,34 (1825,94 - 9796,71)	4527,92 (2828,64 - 8430,36)	3876,03 (2736,96 - 10555,07)	0,997
Monócitos (%Leucócitos)	7,53 (3,44 - 14,64)	6,87 (3,33 - 8,97)	6,84 (4,57 - 10,71)	6,80 (4,98 - 10,73)	6,74 (4,65 - 10,71)	0,907
Monócitos/mm <sup>3</sup>	533,05 (252,49 - 976,50)	602,45 (195,47 - 665,50)	484,72 (216,16 - 929,53)	449,61 (293,54 - 782,22)	463,49 (242,26 - 1218,52)	0,981
Eosinófilos (%Leucócitos)	1,39 (0,44 - 13,65)	0,85 (0 - 2,15)	1,6 (0,45 - 9,29)	1,40 (0,22 - 5,98)	1,37 (0,44 - 3,10)	0,793
Eosinófilos/mm <sup>3</sup>	96,31 (36,04 - 952,77)	58,59 (0 - 175,01)	94,55 (34,72 - 1171,47)	93,19 (15,99 - 496,94)	84,04 (24,99 - 264,42)	0,851
Basófilos (%Leucócitos)	0,50 (0,15 - 1,39)	0,74 (0,02 - 0,97)	0,61 (0,22 - 1,23)	0,59 (0,03 - 1,33)	0,55 (0,20 - 1,22)	0,993
Basófilos/mm <sup>3</sup>	33,14 (14,50 - 125,10)	63,23 (1,17 - 81,08)	44,20 (13,88 - 88,93)	43,79 (1,67 - 160,80)	46,80 (17,04 - 166,29)	0,889
Linfócitos totais (%Leucócitos)	26,83 (3,85 - 40,74)	28,53 (14,48 - 41,06)	26,56 (7,95 - 51,49)	26,03 (20,86 - 41,07)	23,17 (10,46 - 37,30)	0,920
Linfócitos totais/mm <sup>3</sup>	1754,75 (372,29 - 3666,60)	2345,65 (849,98 - 3342,28)	1835,67 (584,72 - 3711,46)	1996,92 (1410,93 - 2612,05)	1688,38 (1114,48 - 3179,06)	0,651
Linfócitos T (%Leucócitos)	17,91 (2,99 - 27,31)	20,77 (10,32 - 33,26)	18,11 (5,24 - 35,64)	16,70 (13,05 - 29,53)	16,07 (7,12 - 26,93)	0,907
Linfócitos T/mm <sup>3</sup>	1208,22 (289,13 - 2457,90)	1729,93 (605,78 - 2707,36)	1202,32 (375,72 - 2570,94)	1336,17 (918,67 - 1883,62)	1123,24 (657,05 - 2407,54)	0,638

Linfócitos TCD4 (%Leucócitos)	11,09 (1,61 – 19,18)	17,66 (6,68 – 20,08)	10,94 (2,06 – 20,75)	11,50 (6,94 – 14,93)	10,00 (4,53 – 16,83)	0,297
Linfócitos TCD4/mm <sup>3</sup>	681,51 (155,69 – 1726,20)	1478,90 (392,12 – 1637,41)	764,63 (110,00 – 1852,56)	764,63 (110,00 – 1852,56)	633,14 (240,50 – 1312,39)	0,163
Linfócitos TCD8 (%Leucócitos)	4,57 (1,33 – 12,84)	3,03 (1,88 – 11,49)	5,13 (1,43 – 21,34)	4,36 (2,91 – 17,29)	5,42 (2,22 – 10,08)	0,637
Linfócitos TCD8/mm <sup>3</sup>	298,33 (105,43 – 956,58)	202,01 (175,51 – 935,29)	288,29 (91,61 – 1009,38)	239,26 (195,51 – 1099,64)	349,69 (239,48 – 901,15)	0,673
Linfócitos T GD (%Leucócitos)	0,90 (0,25 – 4,20)	0,50 (0,19 – 0,80)	0,60 (0 – 3,61)	0,59 (0,01 – 1,94)	0,80 (0,24 – 2,83)	0,077
Linfócitos T GD/mm <sup>3</sup>	64,80 (19,10 – 293,16)	31,44 (20,01 – 65,12)	41,47 (0 – 171,84)	40,92 (0,56 – 161,21)	40,08 (24,55 – 240,83)	0,202
Linfócitos T DP (%Leucócitos)	0,12 (0,02 – 0,61)	0,22 (0,05 – 0,66)	0,21 (0,02 – 1,60)	0,17 (0,06 – 1,36)	0,19 (0,04 – 0,57)	0,863
Linfócitos T DP/mm <sup>3</sup>	9,60 (1,93 – 54,90)	14,67 (4,70 – 53,72)	18,55 (1,07 – 117,76)	13,45 (3,91 – 72,22)	9,52 (2,27 – 46,49)	0,834
Linfócitos T DN (%Leucócitos)	0,14 (0,03 – 0,69)	0,08 (0,06 – 0,23)	0,09 (0,01 – 1,45)	0,08 (0,03 – 1,25)	0,13 (0,06 – 0,61)	0,203
Linfócitos T DN /mm <sup>3</sup>	10,17 (2,90 – 51,40)	5,83 (4,70 – 18,72)	7,47 (0,95 – 77,43)	5,25 (2,32 – 69,62)	9,54 (5,36 – 34,65)	0,241
Linfócitos B (%Leucócitos)	2,64 (0,16 – 5,73)	2,85 (1,69 – 3,46)	2,52 (0,49 – 6,71)	3,09 (1,30 – 6,04)	2,48 (1,63 – 4,81)	0,785
Linfócitos B/mm <sup>3</sup>	180,04 (11,17 – 399,95)	213,42 (99,20 – 347,49)	162,10 (26,17 – 518,68)	233,92 (94,51 – 384,14)	197,39 (92,58 – 231,36)	0,616
Linfócitos B maduros (%Leucócitos)	2,62 (0,11 – 5,66)	2,76 (1,58 – 3,41)	2,48 (0,47 – 6,71)	2,76 (1,58 – 3,41)	2,47 (1,63 – 4,80)	0,766
Linfócitos B maduros/mm <sup>3</sup>	178,85 (7,68 – 395,07)	210,93 (92,75 – 330,64)	160,20 (25,10 – 518,68)	230,83 (93,06 – 384,14)	196,39 (92,58 – 230,88)	0,613
Plasmablastos (%Leucócitos)	0,04 (0,01 – 0,14)	0,08 (0,02 – 0,16)	0,03 (0 – 0,15)	0,04 (0,01 – 0,05)	0,01 (0 – 0,13)	0,093
Plasmablastos/mm <sup>3</sup>	3,15 (0,67 – 15,30)	4,90 (1,63 – 16,85)	2,05 (0 – 12,54)	2,61 (0,73 – 3,32)	1,00 (0 – 6,77)	0,102
NK (%Leucócitos)	3,36 (0,20 – 8,05)	1,92 (1,53 – 3,97)	3,66 (1,15 – 11,81)	3,99 (1,97 – 6,42)	3,79 (1,49 – 9,33)	0,425
NK /mm <sup>3</sup>	231,83 (19,34 – 724,50)	170,09 (96,27 – 265,59)	280,68 (54,39 – 692,99)	285,42 (170,17 – 468,02)	241,97 (134,46 – 486,09)	0,490
NK 56++ (%Leucócitos)	0,14 (0,02 – 0,20)	0,14 (0,05 – 0,31)	0,15 (0,04 – 4,14)	0,14 (0,05 – 0,31)	0,15 (0,13 – 0,25)	0,780
NK 56++/mm <sup>3</sup>	8,77 (1,93 – 15,30)	12,44 (2,93 – 25,23)	9,30 (3,37 – 320,02)	9,78 (3,09 – 36,89)	9,66 (6,25 – 34,07)	0,922
NKT (%Leucócitos)	1,57 (0,13 – 5,14)	1,86 (0,20 – 3,20)	0,96 (0,21 – 6,84)	1,77 (0,56 – 6,27)	1,69 (0,13 – 5,14)	0,894
NKT/mm <sup>3</sup>	94,86 (12,57 – 382,93)	122,02 (21,06 – 260,48)	72,42 (16,23 – 503,42)	122,02 (21,06 – 260,48)	83,21 (25,90 – 210,98)	0,718
<b>Relação TCD4/TC8</b>	<b>1,81 (0,74 – 3,97) a</b>	<b>4,33 (1,74 – 8,27) b</b>	<b>2,04 (0,37 – 5,91) a</b>	<b>2,84 (0,65 – 4,25) a</b>	<b>1,47 (0,69 – 3,52) a</b>	<b>0,017*</b>
Relação N/L	2,40 (1,12 – 23,10)	2,33 (1,18 – 5,67)	2,40 (0,74 – 10,18)	2,46 (1,26 – 3,47)	2,98 (1,49 – 7,40)	0,971
Monócitos CD56+ (%monócitos)	6,63 (2,14 – 12,68)	6,54 (4,87 – 15,80)	7,02 (1,25 – 21,23)	9,89 (0 – 12,01)	8,34 (2,14 – 12,68)	0,347

As diferenças foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com o teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. \* $P \leq 0,05$  foi considerado significativo. Letras diferentes indicam valores que são significativamente diferentes entre si. GD: gamma/delta; DP: duplo positivo; DN: duplo negativo; NK: *natural killer*; NKT: *natural killer T*; relação N/L: relação neutrófilo/linfócito; TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

As mesmas análises foram realizadas nas amostras de tecido, descritas na Tabela 32. No entanto, nem todas as populações leucocitárias foram observadas nessas amostras, pois nem todos os leucócitos estão presentes no infiltrado intratumoral. Como é possível observar na Tabela 32, as amostras malignas (CDI) apresentaram menores valores relativos de células NKT ( $P = 0,028$ ) e maiores valores da relação CD4/CD8 ( $P = 0,009$ ) quando comparadas às amostras benignas (controle). Em relação ao aumento tecidual do NKT, a principal associação é com o aumento de estímulo da resposta inata, de forma rápida e inespecífica, com uma provável associação relação com prognóstico, que deve ser investigada em estudos futuros.

Em relação ao aumento individual da concentração tecidual do CD4 e CD8, não houve diferenças estatísticas (conforme Tabela 32). Porém na avaliação da relação CD4/CD8 o resultado foi significativo. Esse resultado está associado a existência de uma possível mobilização e estímulo aumentados para a produção de CD8, para recrutar linfócitos T CD8 teciduais. Como consequência há diminuição da resposta T citotóxica (CD8) na destruição celular no ambiente tumoral. Como citado anteriormente, o valor prognóstico dos linfócitos intratumorais tem sido comprovado no carcinoma de mama (DENKERT et al., 2010; LOI et al., 2013; BYRNE, et al., 2020). Estudos indicam que o aumento do infiltrado inflamatório intra tumoral está relacionado com taxas de resposta patológica completa (pCR) e com a melhora na sobrevida (DENKERT et al., 2010; MAHMOUD et al., 2011; MOHAMMED et al., 2012; LEE et al., 2013), especialmente nos casos de TNBC (LOI et al., 2014; IBRAHIM et al., 2014). Nos resultados do presente estudo, a diminuição de Linfócitos TCD8+ tecidual e o aumento significativo da relação CD4/CD8, podem estar relacionados com um panorama não favorável em relação à resposta preditiva e prognóstica das pacientes do estudo.

Tabela 32. Leucócitos presentes nas amostras de tecido das pacientes com nódulos de mama, comparados de acordo com a malignidade.

Variável	Benigno	Maligno	P
Neutrófilos (% leucócitos)	9,72 (0,79 – 43,85)	12,73 (0,50 – 64,70)	0,754
Linfócitos totais (% leucócitos)	90,27 (56,15 – 99,21)	85,38 (35,30 – 99,50)	0,710
Linfócitos T (% leucócitos)	55,04 (23,89 – 78,57)	61,58 (23,74 – 92,91)	0,389



Linfócitos TCD4 (% leucócitos)	19,67 (10,40 – 39,90)	30,55 (1,80 – 63,50)	0,104
Linfócitos TCD8 (% leucócitos)	32,35 (9,80 – 43,76)	24,33 (10,16 – 72,10)	0,291
Linfócitos T DP (% leucócitos)	0,00 (0 – 2,87)	0,32 (0 – 15,46)	0,628
Linfócitos T DN (% leucócitos)	1,21 (0 – 5,43)	1,32 (0 – 9,75)	0,610
NK (% leucócitos)	10,11 (2,17 – 24,01)	4,63 (0,31 – 29,64)	0,299
<b>NKT (% leucócitos)</b>	<b>1,55 (0,33 – 36,17)</b>	<b>1,33 (0 – 17,26)</b>	<b>0,028*</b>
<b>Relação TCD4/TCD8</b>	<b>0,72 (0,48 – 1,32)</b>	<b>1,15 (0,42 – 3,36)</b>	<b>0,009*</b>

As diferenças foram testadas pelo teste de Mann-Whitney. \*P ≤ 0,05 foi considerado significativo. GD: gamma/delta; DP: duplo positivo; DN: duplo negativo; NK: *natural killer*; NKT: *natural killer* T; relação N/L: relação neutrófilo/linfócito; TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

Ao comparar as mesmas variáveis em relação ao subtipo de neoplasia, a única diferença observada foi na porcentagem de linfócitos T DN, onde as pacientes com CDI luminal B apresentaram menores valores de linfócitos T DN quando comparadas às pacientes com o subtipo TBNC (P = 0,042, Tabela 33). O restante dos grupos não apresentou diferença significativa entre si quando comparadas as subpopulações leucocitárias.

As células T DN (CD45+, CD3+ e CD4 -, CD8-, pro-T ou timócito), são um tipo de linfócito imaturo presente no córtex do timo, em processo de maturação e diferenciação para linfócitos T CD4+ e CD8+ (GARCÍA RODRÍGUEZ MC, 1984). Essa população foi descrita na análise imunológica do microambiente tumoral de amostras de câncer de pulmão, e foi detectada em 1,4% da população (STANKOVIC, et al., 2019). Não foram encontrados dados na literatura associando as células T DN em câncer de mama nas bases de dados pesquisadas, o que torna a descoberta de difícil interpretação dos resultados no contexto da investigação do presente estudo.

Tabela 33. Leucócitos presentes nas amostras de teciduais das pacientes com CDI, comparados de acordo com o subtipo de neoplasia.

Variável	Benigno	Luminal A	Luminal B	HER2	TBNC	P
Neutrófilos (% leucócitos)	9,72 (0,79 – 43,85)	17,74 (4,6 – 39,58)	16,85 (1,66 – 64,70)	3,54 (0,50 – 42,89)	11,49 (6,71 – 37,95)	0,243
Linfócitos totais (% leucócitos)	90,27 (56,15 – 99,21)	82,26 (60,42 – 95,36)	83,15 (35,30 – 98,34)	96,46 (57,11 – 99,50)	88,51 (62,05 – 93,29)	0,372
Linfócitos T (% leucócitos)	55,04 (23,89 – 78,57)	73,13 (47,63 – 79,32)	47,85 (23,74 – 84,30)	73,00 (34,83 – 92,91)	61,58 (38,17 – 77,09)	0,110
Linfócitos TCD4 (% leucócitos)	19,67 (10,40 – 39,90)	34,01 (31,2 – 39,8)	24,89 (1,80 – 58,70)	33,56 (19,20 – 63,50)	25,21 (15,20 – 53,60)	0,236
Linfócitos TCD8 (% leucócitos)	32,35 (9,80 – 43,76)	33,77 (11,83 – 46,41)	22,27 (10,16 – 72,10)	35,46 (14,06 – 47,08)	21,81 (15,44 – 34,08)	0,254
Linfócitos T DP (% leucócitos)	0,00 (0 – 2,87)	0,40 (0 – 1,02)	0,32 (0 – 3,80)	0,33 (0 – 15,46)	0,14 (0 – 1,87)	0,914
<b>Linfócitos T DN (% leucócitos)</b>	<b>1,21 (0 – 5,43) a, b</b>	<b>1,57 (0,31 – 8,62) a, b</b>	<b>0,81 (0 – 3,57) a</b>	<b>1,34 (0,15 – 9,75) a, b</b>	<b>2,76 (0,68 – 5,63) b</b>	<b>0,042*</b>
NK (% leucócitos)	10,11 (2,17 – 24,01)	4,88 (0,85 – 8,02)	5,77 (0,53 – 27,53)	2,67 (0,31 – 29,64)	5,97 (2,60 – 29,17)	0,753
NKT (% leucócitos)	1,55 (0,33 – 36,17)	1,97 (0,56 – 3,88)	1,15 (0 – 17,26)	0,89 (0,15 – 7,12)	2,09 (0,37 – 6,74)	0,083
Relação TCD4/TCD8	0,72 (0,48 – 1,32)	1,15 (0,67 – 3,36)	1,16 (0,04 – 2,53)	0,90 (0,41 – 2,43)	1,18 (0,79 – 3,12)	0,093

As diferenças foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com o teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. \*P ≤ 0,05 foi considerado significativo. Letras diferentes indicam valores que são significativamente diferentes entre si. GD: gamma/delta; DP: duplo positivo; DN: duplo negativo; NK: *natural killer*; NKT: *natural killer T*; relação N/L: relação neutrófilo/linfócito; TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

## 6.6. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD1 E CTLA-4 NOS LINFÓCITOS T

Além da quantificação dos subtipos linfocitários, nas amostras de SP e das amostras teciduais, os linfócitos TCD4 e TCD8 também foram avaliados de acordo com a expressão dos marcadores CD279 (PD1) e CD152 (CTLA-4).

A Tabela 34 mostra os resultados obtidos na avaliação da expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T das amostras de SP. Com base nisso, é possível observar que as amostras malignas apresentam uma redução na expressão de CTLA-4 tanto em linfócitos TCD4 ( $P = 0,045$ ) quanto linfócitos TCD8 ( $P = 0,016$ ) quando comparadas às amostras benignas. Em relação à expressão de PD1, também foi observada uma redução na expressão desse marcador nas amostras provenientes de neoplasias malignas, tanto em linfócitos TCD4 ( $P = 0,001$ ) quanto TCD8 ( $P = 0,024$ ).

Tabela 34. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T do sangue periférico das pacientes com CDI, comparadas de acordo com a malignidade.

Variável	Benigno	Maligno	P
T CD4 CTLA-4 (%TCD4)	3,08 (0,52 – 7,69)	1,75 (0,22 – 8,86)	0,045*
T CD4 PD1 (%TCD4)	32,51 (14,82 – 43,74)	19,59 (4,69 – 59,13)	0,001*
T CD8 PD1 (%TCD8)	25,18 (10,86 – 54,67)	15,81 (4,73 – 76,67)	0,016*
T CD8 CTLA-4 (%TCD8)	3,62 (1,23 – 88,90)	2,00 (0 – 14,53)	0,024*

As diferenças foram testadas pelo teste de Mann-Whitney. \* $P \leq 0,05$  foi considerado significativo. TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

Na sequência, também foi avaliado se as alterações nas expressões de CTLA-4 e PD1 variavam de acordo com o subtipo de neoplasia. Como é possível observar na Tabela 35 e Figura 51, as pacientes com CDI subtipo luminal A apresentaram menor expressão de PD1 tanto em linfócitos TCD4 (Figura 51 Painel A;  $P = 0,032$ ) quanto linfócitos TCD8 (Figura 51 Painel B;  $P = 0,002$ ), quando comparadas às amostras benignas. Além disso, as pacientes com CDI HER2+ apresentaram redução na expressão de CTLA-4 em linfócitos TCD8 quando comparadas às amostras benignas (Figura 51 Painel C;  $P = 0,021$ ). Os demais subtipos tumorais não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (amostras benignas).

O linfócito T é a célula mais importante na defesa antitumoral e as expressões das proteínas PD-1 e as moléculas coestimuladoras negativas CTLA-4, que estão na sua superfície, são reguladores da imunidade tumoral. O CTLA-4 limita a atividade das células T jovens durante as respostas imunológicas e o PD-1 reduz a atividade das células T em tecidos periféricos (FIFE and BLUESTONE, 2008). A interação esperada do CTLA-4 com moléculas ligantes, resulta na diminuição da atividade dos linfócitos T, bloqueando-os, da mesma forma que as interações do PD-1 com PD-L1 e PD-L2 reduzem a resposta imune de células T (FIFE and BLUESTONE, 2008). A relação diminuída da molécula CTLA-4 não seria esperado em

amostra onde 89.3% (n total = 47) são tumores não luminal A (subtipos de pior prognóstico). O sistema imunológico pode atacar células normais e células anormais do corpo e usando os pontos de verificação que podem ser ativados ou inibidos. Muitas vezes os tumores usam esses pontos, para se protegerem do sistema imunológico, evitando que a resposta imunológica atue sobre as células tumorais. A imunoterapia tem como alvo esses pontos de controle, reestabelecendo as ligações das células do sistema imune no combate às células tumorais (KENAN AND TOLANEY, 2020).

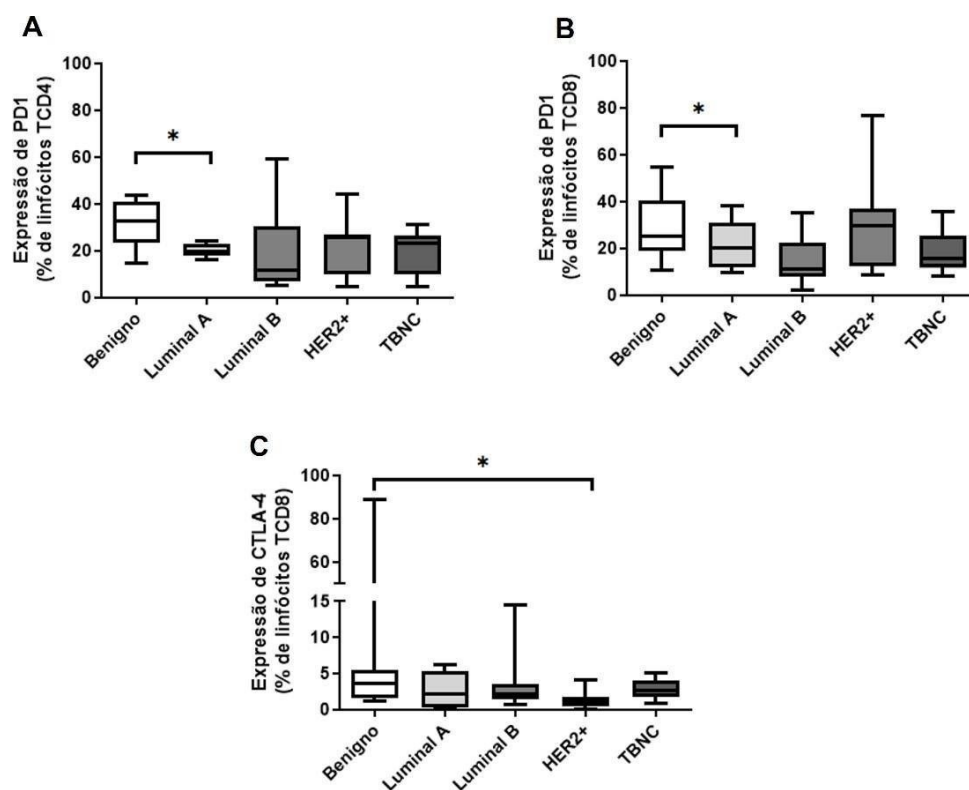
A ligação do PD-1 ao PDL-1 (presente nas células imunes e em algumas células tumorais) impede o ataque das células T a outras células do corpo, e inibe a resposta imune antitumoral, causando uma evasão da resposta imune. Em contrapartida, a alta expressão dessas proteínas, indica uma grande resposta à imunoterapia pelos anticorpos monoclonais que têm como alvo PD1 e PDL1, pelo bloqueio das ligações entre essas duas proteínas. Esse estímulo da resposta imunológica antitumoral útil é um mecanismos util no controle dos tumores imuno responsivos (KENAN AND TOLANEY, 2020; BASSEZ, et al., 2021).

Tabela 35. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T sangue periférico das pacientes com CDI, comparada de acordo com o subtipo de neoplasia.

Variável	Benigno	Luminal A	Luminal B	HER2+	TBNC	P
T CD4 CTLA4 (%TCD4)	3,08 (0,52 – 7,69)	1,06 (0,22 – 4,64)	1,54 (0,68 – 6,43)	1,32 (0,67 – 3,68)	2,78 (1,03 – 8,86)	0,063
T CD4 PD1 (%TCD4)	32,51 (14,82 – 43,74) a	19,77 (16,17 – 24,46) a, b	11,59 (5,08 – 59,13) b	25,59 (4,69 – 44,27) a,b	23,00 (4,71 – 31,42) a, b	0,032*
T CD8 PD1 (%TCD8)	25,18 (10,86 – 54,67) a	20,05 (9,61 – 38,33) a, b	11,39 (4,73 – 35,34) b	29,69 (8,96 – 76,67) a	15,97 (8,49 – 35,53) a, b	0,002*
T CD8 CTLA4 (%TCD8)	3,62 (1,23 – 88,90) a	2,14 (0,33 – 6,17) a, b	2,14 (0,71 – 14,53) a, b	1,07 (0 – 4,10) b	2,73 (0,91 – 5,09) a, b	0,021*

As diferenças foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com o teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. \*P ≤ 0,05 foi considerado significativo. Letras diferentes indicam valores que são significativamente diferentes entre si. TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

Figura 51. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T sangue periférico das pacientes com CDI, comparada de acordo com o subtipo de neoplasia.



Painel A: Expressão de PD1 em linfócitos TCD4 de acordo com o subtipo de CDI. Painel B: Expressão de PD1 em linfócitos TCD8 de acordo com o subtipo de CDI. Painel C: Expressão de CTLA-4 em linfócitos TCD8 de acordo com o subtipo de CDI. As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. \* $P < 0,05$ . Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. Fonte: O autor.

Os mesmos parâmetros da Tabela 34 foram avaliados nos linfócitos T infiltrados no tecido tumoral. A Tabela 36 demonstra a expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T encontrados nas amostras teciduais das pacientes do estudo, e avaliados de acordo com a malignidade. No entanto, não houve diferença significativa na expressão desses marcadores quando comparadas as amostras benignas e malignas.

Tabela 36. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T infiltrados no tecido tumoral das pacientes com CDI, comparada de acordo com a malignidade.

Variável	Benigno	Maligno	P
T CD4 CTLA4 (%TCD4)	2,75 (0 – 6,76)	2,09 (0 – 27,42)	0,699
T CD4 PD1 (%TCD4)	35,00 (7,69 – 66,08)	29,68 (0,14 – 74,12)	0,261
T CD8 CTLA4 (%TCD8)	2,29 (0 – 45,01)	2,73 (0 – 44,21)	0,814
T CD8 PD1 (%TCD8)	31,02 (1,91 – 72,37)	21,01 (0 – 63,57)	0,190

As diferenças foram testadas pelo teste de Mann-Whitney. \*P ≤ 0,05 foi considerado significativo. TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

Além disso, também não foram encontradas diferenças significativas nesses marcadores ao subdividir as pacientes de acordo com o subtipo de CDI (Tabela 37).

Tabela 37. Expressão de PD1 e CTLA-4 nos linfócitos T infiltrados no tecido tumoral das pacientes com CDI, comparada de acordo com o subtipo de neoplasia.

Variável	Benigno	Luminal A	Luminal B	HER2	TBNC	P
T CD4 CTLA4 (%TCD4)	2,75 (0 – 6,76)	7,73 (0,50 – 18,86)	1,97 (0 – 7,48)	2,06 (0 – 12,00)	3,74 (0 – 27,42)	0,516
T CD4 PD1 (%TCD4)	35,00 (7,69 – 66,08)	34,00 (19,63 – 40,58)	23,68 (0,14 – 59,84)	40,00 (1,03 – 63,07)	28,29 (3,09 – 74,12)	0,531
T CD8 CTLA4 (%TCD8)	2,29 (0 – 45,01)	5,18 (4,25 – 15,85)	1,26 (0 – 39,10)	3,45 (0 – 43,83)	2,86 (0 – 44,21)	0,266
T CD8 PD1 (%TCD8)	31,02 (1,91 – 72,37)	28,68 (13,45 – 42,88)	15,71 (0 – 55,44)	25,61 (3,50 – 63,57)	21,29 (1,17 – 40,63)	0,488

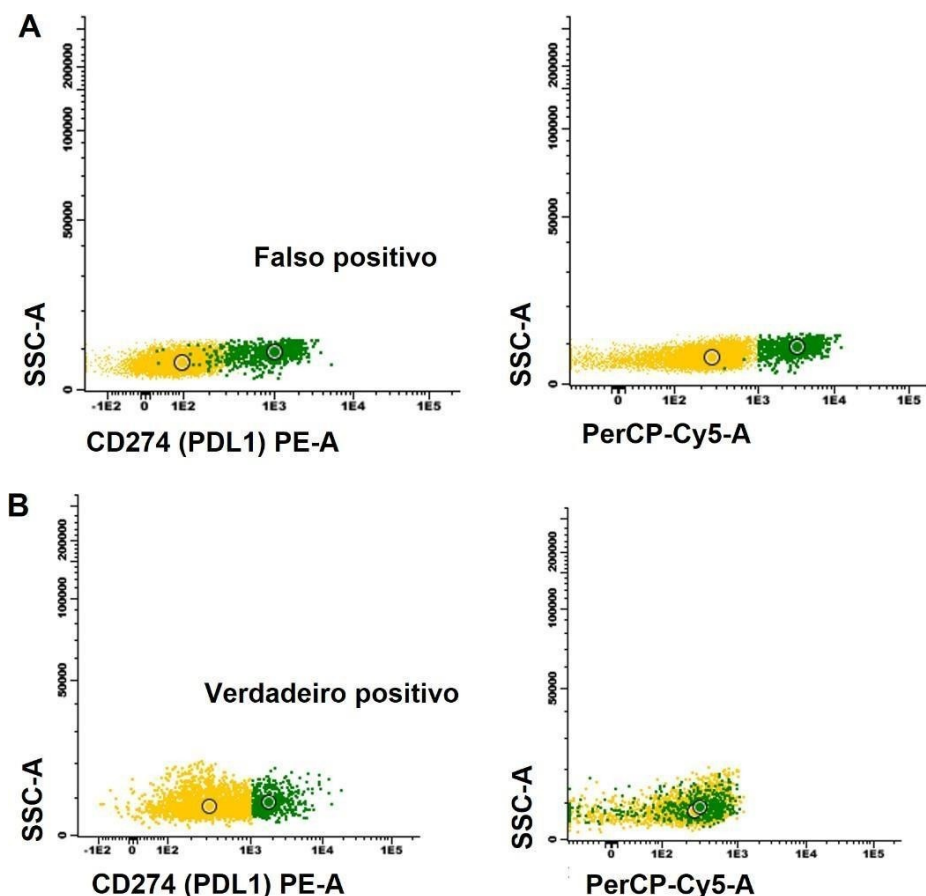
As diferenças foram testadas pelo teste de Kruskal-Wallis, com o teste *post-hoc* de Dunn-Bonferroni. \*P ≤ 0,05 foi considerado significativo. Letras diferentes indicam valores que são significativamente diferentes entre si. TCD8: linfócitos T CD8+; TCD4: linfócitos T CD4+.

## 6.7. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PDL-1 NOS LINFÓCITOS EM AMOSTRAS TECIDUAIS

A expressão de PDL-1 foi avaliada nos linfócitos infiltrados na amostra tumoral. A avaliação de PDL-1 nos linfócitos foi um desafio, devido a autofluorescência da amostra para esse marcador. Na Figura 52 é possível observar o resultado de uma paciente com resultado falso positivo para a expressão de PDL-1 (Figura 52 Painel A) e um caso verdadeiramente positivo (Figura 52 Painel B). Na Figura 52 Painel A, apesar das células PDL1+ (em verde) apresentarem a expressão para o marcador de interesse (CD274), as mesmas células apresentaram autofluorescência em canais não marcados com anticorpo, como o representado pelo PerCP-Cy5, o que indica um resultado falso positivo. Já na Figura 52 Painel B, as células

PDL1+ não apresentam autofluorescência em canais não marcados, o que indica um verdadeiro positivo.

Figura 52. Avaliação da expressão de PDL-1 em linfócitos totais infiltrados no tecido tumoral.



Em amarelo estão representados os linfócitos totais. As células destacadas em verde apresentam expressão para o marcador PDL1. O painel A representa a amostra de uma paciente que apresentou resultado falso positivo, uma vez que as células PDL1+ também se encontram positivas no canal PerCP-Cy5, onde não foi adicionado nenhum anticorpo. Já no Painel B, é possível observar um caso verdadeiramente positivo, onde os linfócitos em verde, que apresentam expressão de PDL1, não apresentam autofluorescência em PerCP-Cy5.

Como comentado acima, das duas pacientes que apresentaram expressão de PDL-1 em linfócitos, um dos casos se tratava de uma paciente com amostra benigna, onde 12,90% dos linfócitos totais infiltrados apresentaram a expressão de PDL1. O segundo caso positivo foi de uma paciente com CDI TBNC, onde 20,30% dos linfócitos expressaram PDL1. Os resultados obtidos não são suficientes para conclusões, possivelmente por relação ao tamanho amostral para essa variável, ou por baixa sensibilidade do clone estudado por CF (Clone MiH1, BD). Entretanto a associação entre o PD-L1 e os subtipos mais agressivos do carcinoma de mama é um importante tema de investigação na área da pesquisa clínica (WU et al., 2015; QIN et al., 2015; MUENST et al., 2014; LI et al., 2016, MAZEL et al., 2015; SALMANINEJAD et al., 2019; SCHÜTZ et al., 2017). Com evidências de que essa proteína

possa ser um biomarcador significativo nos carcinomas de mama de pior prognóstico (MINGHUI et al., 2017). A presença da superexpressão está associada aos casos mais agressivos, com imunofenótipo TNBC e com a diminuição da sobrevida (ALI et al., 2015, MAZEL et al., 2015; SCHÜTZ et al., 2017; SALMANINEJAD et al., 2019).

#### 6.8. CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTC) NO SANGUE PERIFÉRICO VENOSO PELA EXPRESSÃO DA CK19 POR CF

A pesquisa de CTC por CF foi realizada em 62 amostras do estudo (mulheres com CDI, n = 47 e mulheres sem CDI n = 15. Foram detectadas CTC (CK19+) em três casos com doença maligna, o que representa 6.38% dos casos com CDI analisados. Ao observarmos os resultados, na Tabela 38, identificam-se dados robustos, na avaliação da CTC e as variáveis aplicadas.

Na avaliação de presença de malignidade e pesquisa de CTC, a análise de desempenho da CF para detecção dessas células mostrou S de 100,00%, E de 12,00%, RVP de 1,14, RVN de 0,00, VPP,23%, VPN 100,00% com Acurácia de 12,18%. Quando foi avaliado a variável histológica de invasão vascular nos casos com diagnóstico CDI, e comparadas a investigação das CTC por CF, foi observado que duas pacientes com invasão vascular positiva apresentaram CTC detectadas por CF. A análise da variável “metástase a distância” (cM1) no “tempo 0” diagnóstico, independente do tamanho do tumor primário comparada ao teste, foi o resultado mais impactante do estudo. Nessa avaliação, três de quatro pacientes foram detectadas as CTC por CF. Os valores obtidos para a análise dessa variável foram Sensibilidade (S) de 100,00%, Especificidade (E) de: 97,73%, Razão de Verossimilhança Positiva (RV+): 44,00; Razão de Verossimilhança Negativa (RV-): 0,00, Valor Preditivo Positivo (VPP) de 8,09%, Valor Preditivo Negativo (VPN) de 100,00%, com Acurácia de 97,73%. Na análise dos imunofenótipos de pior prognóstico (não luminal A) com os de melhor prognóstico (luminal A) comparado a detecção de CTC, foi constatado que as três pacientes com presença dessas células estavam agrupadas no subtipo não luminal A, com S de 100,00% E: 11,36% RV+: 1,13; RV-: 0,00; VPP: 0,23% VPN: 100,00% e Acurácia de 11,54%. E na análise do desfecho mais grave do paciente com câncer, óbito, em relação a análise de CTC, mostrou S de 100,00%, E 90,00%, RVP de 10,00, RVN de 0,00, VPP de 1,96%, VPN de 100,00% e acurácia de 90,02%



Os resultados descritos acima mostram valores de acúrcia considerados ótimos na análise estatística para a detecção de CTC por CF em três de quatro pacientes com metástase a distância (cM1) no diagnóstico “tempo 0”. Com base nos achados pode-se afirmar que a detecção de células tumorais circulantes (CTC) no sangue periférico por CF não diminui o tempo de detecção de metástase em paciente clinicamente sem metástase (pacientes cM0). Mas pode ser usada como um possível instrumento de acompanhamento prognóstico das pacientes com resultado negativo de CTC pela CF, para controle oncológico de acompanhamento de mulheres cM0, com alta Especificidade e Acurácia.

Um das principais causas de metástases são as células dormentes, que ficam na circulação, escondidas, silenciosas, assintomáticas e indetectáveis. Quando elas reentram no ciclo celular, elas adquirem a capacidade de proliferar e de desenvolver recorrência da doença (EVANS AND LIN, 2015). As células dormentes ou êmbolos podem permanecer em estado de "dormência ou latência" num estágio G0 do ciclo celular por muitos anos (FEHM et al., 2008). Ainda que o uso de tecnologias de biologia molecular e pesquisas de anticorpos possam detectar células na medula óssea em até 40% das mulheres com diagnóstico de carcinoma de mama (WIEDSWANG et al., 2003; DIEL et al., 1996; BRAUN et al., 2000; GEBAUER et al., 2001; COTE et al., 1991), permanece um grande desafio clínico o tratamento eficaz de doenças malignas devido à incapacidade de detectar células neoplásicas dormentes na corrente sanguínea (SOSA, et al., 2014). Como exposto, conforme descrito por EVANS AND LIN, 2015, o método proposto não detectou a população de células dormentes na fase G0, porém foi possível detectar células circulantes CK19+ (CTC) em fases proliferativas do ciclo celular no sangue periférico, como mostra a Figura 53.

Figura 53. Êmbolos vasculares e o ciclo celular.

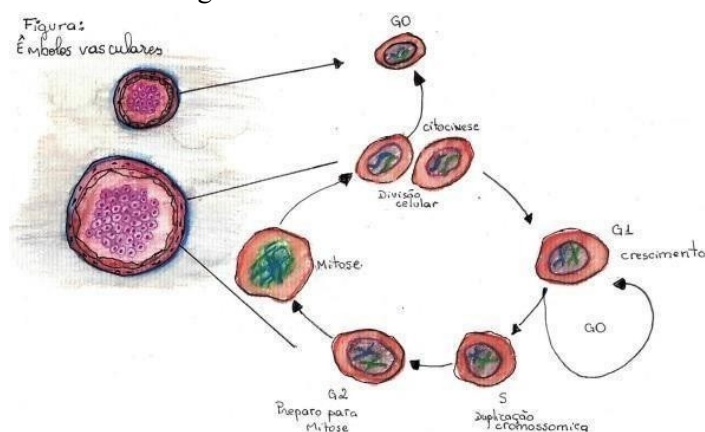


Figura esquemática relacionada a detecção de células CTC no sangue periférico pelo método CF e a possível relação com a fase proliferativa do ciclo celular e a população de células dormentes da fase G0. Fonte: o Autor.

A detecção e a relevância prognóstica CTCs em pacientes com carcinoma de mama metastático ou em pacientes com doença em estágio inicial fornece evidências adicionais de progressão que podem ocorrer (KIMBUNG, et al., 2015; ZHANG, et al., 2012). Como citado anteriormente, a metástase tumoral é um grande desafio clínico, responsável pela grande maioria das mortes relacionadas ao carcinoma. Embora apenas 5-10% dos pacientes com carcinoma de mama recém-diagnosticados apresentem carcinoma que metastatizou para partes distantes do corpo (CARDOSO, et al., 2012 GUPTA AND MASSAGUE, 2006; KIMBUNG, et al., 2015), no nosso estudo 8,51% das pacientes apresentaram metástase ao recém-diagnóstico ou “tempo 0” diagnóstico.

A maioria das metástases são detectadas anos ou décadas após o diagnóstico e o tratamento do tumor primário, as CTCs, células tumorais disseminadas na medula óssea ou mesmo DNA de tumor livre de células circulantes (ctDNA) podem ser mais relevantes para fins de previsão da progressão da doença e monitoramento da resposta ao tratamento (DAWSON, et al., 2013; BIDARD, et al., 2014). Estima-se que até 30% das pacientes com carcinoma de mama com linfonodo negativo e uma fração ainda maior de pacientes com doença com linfonodo positivo desenvolverão doença metastática apesar de receberem tratamento padrão (CARDOSO, et al., 2012; PETO, et al., 2012). Essas estimativas associadas ao fato de que a doença recorrente à distância deve geralmente ser vista como uma doença “incurável” indica alta carga clínica do carcinoma de mama metastático e ressaltam a demanda urgente por melhores estratégias de intervenção clínica para mais de meio milhão de mulheres em todo o mundo que ainda morre desta doença anualmente (IARC, 2014, WHO, 2019).

Há algum tempo já se reconhece que a disseminação do carcinoma de mama é um processo organotrópico não aleatório (PAGET, 1989). E a carga tumoral metastática é um importante fator prognóstico, avaliado pelo número de lesões metastáticas e pela localização anatômica. Pacientes com lesões únicas tem maior sobrevida que as pacientes com múltiplas lesões (LARGILLIER, et al., 2008). Das 47 pacientes do estudo com diagnóstico de CDI, quatro apresentaram metástase a distância, sendo um deles com metástase múltiplas, e todas tiveram desfecho óbito em menos de seis meses. Dessas, duas pacientes eram do Grupo ID1, abaixo de 50 anos, portanto fora do grupo de screening para diagnóstico de carcinoma de mama pela OMS, e duas do Grupo ID2 (entre 50 e 69 anos).

Tabela 38. Desempenho do teste de avaliação de CTC com variáveis clínicas e anatomopatológicas.

Variáveis do Teste	S	E	RVP	RVN	VPP	VPN	ACURÁCIA
CTC x CDI	100.0%	12.0%	1.14	0.00	0.23%	100.0%	12.18%
CTC x invasão vascular	66.67%	70.45%	2.26	0.47	0.45%	99.91%	70.45%
CTC x cT/cM1	100.0%	97.73%	44.00	0.00	8.09%	100.0%	97.73%
CTC x não luminal A	100.0%	11.36%	1.13	0.00	0.23%	100.0%	11.54%
CTC X mcT	100.0%	89.36%	7.33	0.00	1.45%	100.0%	86.39%
CTC X Óbito	100.0%	90.0%	10.0	0.00	1.96%	100.0%	90.02%

Tabela de análise de desempenho: CTC (células tumorais circulantes, no sangue periférico por citometria de fluxo); CDI (carcinoma invasivo da mama); invasão vascular (achado histológico de embolus vasculares); cM1 (estadio clínico para metástase a distância); não Luminal A subtipos de pior prognóstico pela Conferência de St Gallen; mcT (variável clínica de multicentricidade tumoral); óbito (morte até 6 meses do diagnóstico da doença primária); Sensibilidade (S), Especificidade (E), Razão de Verossimilhança Positiva (RVP); Razão de Verossimilhança Negativa (RVN), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) e Acurácia (A).

A variável “desfecho óbito”, foi incluído neste estudo, a partir da informação de quatro óbitos em decorrência da doença, durante o período de coleta de dados, e registrados até 29 de novembro de 2021. As quatro pacientes do estudo que foram a óbito tinham metástase a distância no “tempo 0” do diagnóstico da doença primária. Os óbitos ocorreram em menos de 6 meses do diagnóstico.

Finalmente, o conjunto de resultados obtidos com essa investigação mostra a importância da avaliação conjunta dos biomarcadores RE, RP, HER2, Ki-67, CK19, CD8, CD4, CD45, CTLA4, PD1 e PD-L1 para o diagnóstico, prognóstico e avaliação do risco de metástase em pacientes com carcinoma invasivo da mama foi realizada e os resultados mostraram que é possível, após titulação, validação e padronização, empregar as metodologias propostas nos pacientes com carcinoma da mama.

Como principal resultado podemos citar a pesquisa de células tumorais circulantes (CTC) no sangue periférico por citometria de fluxo identificou CTC em 3 pacientes com doença maligna metastática. O desfecho final dessas pacientes, óbito em menos de 6 meses do diagnóstico, indica um panorama de doença com progressão extremamente rápida e de comprometimento sistêmico ao diagnóstico. Esse resultado difere da hipótese inicial, de possível detecção de células dormentes em pacientes clinicamente sem metástase (cM0), mas por outro lado a Especificidade e alta Acúrcia permitem defender que o resultado negativo é

um indicador de bom prognóstico. É um excelente método de acompanhamento de doença metastática negativa, com alta Especificidade e alta Sensibilidade.

Pelo fato da maioria das metástases serem detectadas anos ou décadas após o diagnóstico da doença primária, a metodologia de coleta sanguínea para a pesquisa de CTC, proposta nesse estudo, poderia ajudar no monitoramento e acompanhamento clínico de pacientes com câncer de mama. Entretanto são necessários mais resultados para responder questões a respeito da evolução das pacientes. Uma das propostas é realizar um estudo de coorte prospectiva, como perspectivas futuras.

Nosso grupo acredita que a CF possa ser uma importante ferramenta para o diagnóstico do carcinoma de mama quando utilizada em associação com outros métodos já estabelecidos na prática oncológica. E com base nos resultados observados nesse estudo, reconhecemos a possibilidade da utilização como instrumento complementar à clínica no acompanhamento das pacientes com câncer de mama como um possível papel de marcador de prognóstico de doença sistêmica.

Através da análise dos dados encontrados, identificamos a necessidade de expandir estratégias públicas de atenção à saúde para triagem de casos de carcinoma de mama em mulheres que atualmente não preenchem os critérios para rastreamento estabelecidos.

Assim é possível concluir que o desenvolvimento e padronização de exames por citometria de fluxo podem trazer resultados mais rápidos, sensíveis e precisos que auxiliam no diagnóstico e acompanhamento das pacientes com carcinoma de mama como ferramenta complementar, no seguimento de metástase e na avaliação de prognóstico das neoplasias da mama. E quando associado às técnicas já estabelecidas por métodos imuno-histoquímicas, pode ser de grande importância para o aumento da cobertura diagnóstica, com benefício para as pacientes.

## 7. CONCLUSÕES

### 7.1. CONCLUSÕES DO ESTUDO RETROSPECTIVO

- A frequência de CDI em mulheres atendidas no HU/EBSERH/UFSC entre os anos de 1994 a 2018 foi de 1335 casos.
  
- A frequência dos subtipos imunohistoquímicos do CDI no período de 24 anos de acordo com a Conferência de St Gallen foi:
  - Luminal A 23.4%
  - Luminal B HER2 (-) 32.0%
  - Luminal B HER2 (+) 9.9%
  - HER2 (+) 6.7%
  - TNBC 14.1%
  
- As prevalências de subtipos de CDI de acordo com a faixa etária no período de 24 anos foram:
  - **Grupo idade 1:** 30.7 % (Luminal A); 33.7 % (Luminal B/HER2-); 50.8 % Luminal B/HER2+, 24.7% (Luminal B/HER2+) e 38.8 % (TNBC)
  - **Grupo idade 2:** 48.2 % (Luminal A); 52.5 % (Luminal B/HER2-); 40.9 % Luminal B/HER2+, 57.3 % (Luminal B/HER2+) e 42.6 % (TNBC)
  - **Grupo idade 3:** 21.1% (Luminal A); 13.8 % (Luminal B/HER2-); 8.3 % Luminal B/HER2+, 18.0 % (Luminal B/HER2+) e 18.6% (TNBC)
  
- As prevalências de subtipos de CDI de acordo com as características morfológicas de grau histológico no período de 24 anos foram:
  - **Grau histológico 1:** 51.7 % (Luminal A); 22.2 % (Luminal B/HER2-); 12.9 % Luminal B/HER2+, 7.9% (Luminal B/HER2+) e 5.3 % (TNBC)
  - **Grau histológico 2:** 46.3 % (Luminal A); 53.9 % (Luminal B/HER2-); 53.0 % Luminal B/HER2+, 42.7 % (Luminal B/HER2+) e 22.9 % (TNBC)
  - **Grau histológico 3:** 1.9 % (Luminal A); 23.9 % (Luminal B/HER2-); 34.1% Luminal B/HER2+, 49.4 % (Luminal B/HER2+) e 71.8 % (TNBC)

- As prevalências de subtipos de CDI de acordo com a faixa etária e características morfológicas de grau nuclear no período de 24 anos foram:
  - **Grau nuclear 1:** 29.1 % (Luminal A); 11.9 % (Luminal B/HER2-); 4.6 % Luminal B/HER2+, 3.4 % (Luminal B/HER2+) e 3.2 % (TNBC)
  - **Grau nuclear 2:** 60.1 % (Luminal A); 60.9% (Luminal B/HER2-); 44.7 % Luminal B/HER2+, 37.1 % (Luminal B/HER2+) e 27.7 % (TNBC)
  - **Grau nuclear 3:** 10.8 % (Luminal A); 27.2 % (Luminal B/HER2-); 50.7 % Luminal B/HER2+, 59.5 % (Luminal B/HER2+) e 69.1% (TNBC)

## 7.2. CONCLUSÕES DO ESTUDO PROSPECTIVO

- A expressão do PDL1 por IHQ está associada a subtipos de pior prognóstico e ao alto índice de proliferação tumoral;
- A avaliação do PDL1 por IHQ apresenta alta sensibilidade, porém baixa especificidade;
- De todos os leucócitos presentes no sangue periférico, somente a população de linfócitos T GD apresentaram-se reduzidos nas amostras de pacientes com CDI;
- Nas amostras de tecido mamário (amostra tecidual) foi observada diminuição das células NKT e aumento da relação de linfócitos TCD4/CD8;
- A população de linfócitos T DN está ligeiramente aumentada no subtipo de CDI de bom prognóstico (Luminal A), aumentado nos subtipos de tumores de pior prognóstico (HER2+ e TBNC) e diminuído no subtipo Luminal B HER2-;
- Os linfócitos TCD4 e TCD8 no sangue periférico de pacientes com CDI apresentaram variável expressão (aumento e diminuição) dos biomarcadores CTLA4 e PD1 quando comparadas ao controle normal, entretanto, essas diferenças não foram semelhantes no tecido mamário;
- As células CTC foram detectadas em 6.38 % dos casos com CDI analisados e em 100% dos casos com metástase a distância (cM1).

## REFERÊNCIAS

AHR, A; HOLTRICH, U; SOLBACH, C, *et al.*; **Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling.** J Pathol 2001; 195: 312–20.

ALESKANDARANY MA, GREEN AR, RAKHA EA, MOHAMMED RA, ELSHEIKH SE, POWE DG, PAISH EC, MACMILLAN RD, CHAN S, AHMED SI, ELLIS IO. **Growth fraction as a predictor of response to chemotherapy in node-negative breast cancer.** Int J Cancer. 2010 Apr 1;126(7):1761-9. doi: 10.1002/ijc.24860. PMID: 19711345.

AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF. **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(7):3983-8.

ALI HR, GLONT SE, BLOWS FM, PROVENZANO E, DAWSON SJ, LIU B, HILLER L, DUNN J, POOLE CJ, BOWDEN S, EARL HM, PHAROAH PD, CALDAS C. **PD-L1 protein expression in breast cancer is rare, enriched in basal-like tumours and associated with infiltrating lymphocytes.** Ann Oncol. 2015 Jul;26(7):1488-93. doi: 10.1093/annonc/mdv192. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25897014.

ALIX-PANABIÈRES C, VENDRELL JP, SLIJPER M, PELLÉ O, BARBOTTE E, MERCIER G, JACOT W, FABBRO M AND PANTEL K. **Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer.** Breast Cancer Research 2009, 11:R39 (doi:10.1186/bcr2326).

ALMEIDA AMPT, MARQUINI HR, LEITE RM, NAI GA. **Prevalência de cancer de mama e associação com seus fatores prognósticos e preditivos.** Colloquium Vitae, jan/jun 2012 4(1):27-37. Doi: 10.5747/cv.2012.v04. n1.v059.

ALMOG N. **Molecular mechanisms underlying tumor dormancy.** Cancer Lett. 2010; 294:139-46.

ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research.** London: Chapman and Hall, 1991.

AMERICAN COLLEGE OF RADIOLOGY. Disponível em: <https://www.acr.org/Clinical-Resources/Reporting-and-Data-Systems/BI-RADS®>. Acesso em 16 fev. 2022.

AMIN MB, EDGE S, GREENE F, *et al.*, eds. **AJCC Cancer Staging Manual.** 8th ed. New York, NY: Springer; 2017.

ANOTHASINTAWEE, T.*et al.* **Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis.** Asia-Pacific Journal of Public Health, Hong Kong, v. 25, n. 5, p.368-387,2013 Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1010539513488795>. Acesso em: 14 jun. 2021.

AREF AR, CAMPISI M, IVANOVA E, *et al.* **3D microfluidic ex vivo culture of organotypic tumor spheroids to model immune checkpoint blockade.** Lab Chip. 2018;18(20):3129-3143. doi:10.1039/c8lc00322j

ARONER, S.A., COLLINS, L.C., SCHNITT, S.J. *et al.* **Columnar cell lesions and subsequent breast cancer risk: a nested case-control study.** *Breast Cancer Res* 12, R61 (2010). <https://doi.org/10.1186/bcr2624>

ASSELIN-LABAT M L, VAILLANT F, SHERIDAN J M, *et al.* **Control of mammary stem cell function by steroid hormone signaling.** *Nature* 2010. 10;4657299798–802. [PubMed] [Google Scholar]

AUTIER, PHILIPPE; **Breast cancer screening.** *European Journal of Cancer*, Sept, 2011, Vol.47, p.S133-S46.

AVERSA, C *et al.* **Metastatic breast cancer subtypes and central nervous system metastases.** *Breast (Edinburgh, Scotland)* vol. 23,5 (2014): 623-8. doi: 10.1016/j.breast.2014.06.009

AZOURY SC, STRAUGHAN DM, SHUKLA V. **Immune Checkpoint Inhibitors for Cancer Therapy: Clinical Efficacy and Safety.** *Curr Cancer Drug Targets.* 2015;15(6):452-462. doi:10.2174/156800961506150805145120

BAPTISTA MZ, SARIAN LO, DERCHAIN SF, PINTO GA, VASSALLO J. **Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer.** *Hum Pathol.* 2016; 47:78-84.

BARROS ACSD, LEITE KRM. **Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea.** *Rev Bras Mastologia.* 2015;25(4):146-55.

BATES GJ, FOX SB, HAN C, LEEK RD, GARCIA JF, HARRIS AL, BANHAM AH. **Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse.** *J Clin Oncol.* 2006; 24(34):5373–80. doi:10.1200/Jco.2006.05.9584

BECKERS, R K, SELINGER, C I, VILAIN, R, MADORE, J, WILMOTT, J S, HARVEY, K, HOLLIDAY, A, COOPER, C L, ROBBINS, E, GILLETT, D, KENNEDY, C W, GLUCH, L, CARMALT, H, MAK, C, WARRIER, S, GEE, H E, CHAN, C, MCLEAN, A, WALKER, E, MCNEIL, C M, BEITH, J M, SWARBRICK, A, SCOLYER, R A & O'TOOLE, S A. **Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome.** *Histopathology* vol. 69,1 (2016): 25-34. doi:10.1111/his.12904

BERTUCCI F, BERNARD K, LORIOD B, CHANG YC, GRANJEAUD S, BIRNBAUM D, *et al.* **Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples.** *Hum Mol Genet.* 1999;8(9):1715-22.

BERTUCCI F, BIRNBAUM D, GONÇALVES A. **Proteomics of breast carcinoma: principles and potential clinical applications.** *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(10):1772-86.

BIDARD F.C, PEETERS DJ, FEHM, T, *et al.* **Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data.** *The Lancet. Oncology* vol. 15,4 (2014): 406-14. doi:10.1016/S1470-2045(14)70069-5

BINDEA G, MLECNIK B, FRIDMAN WH, GALON J. **The prognostic impact of anti-cancer immune response: a novel classification of cancer patients.** *Semin Immunopathol.* 2011; 33(4):335–340. doi:10.1007/s00281-011-0264-x.



BIRNBAUM D, BERTUCCI F, GINESTIER C, TAGETT R, JACQUEMIER J, CHARAFE-JAUFFRET E. **Basal and luminal breast cancers: basic or luminous?** *Int J Oncol.* 2004;25(2):249-58.

BÖCKER W, MOLL R, POREMBA C, HOLLAND R, VAN DIEST PJ, DERVAN P, *et al.* **Common adult stem cells in the human breast give rise to glândular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept.** *Lab Invest.* 2002;82(6):737-46.

BOECKER W, WEIGEL S, HANDEL W, STUTE P. **The normal breast.** In: Boecker W, ed. **Preneoplasia of the Breast: A New Conceptual Approach to Proliferative Breast Disease.** Munich: Elsevier; 2006:2-27.

BOICHUK S, PARRY JA, MAKIELSKI KR, LITOVCHICK L, BARON JL, ZEWE JP, WOZNIAK A, MEHALEK KR, KORZENIEWSKI N, SENEVIRATNE DS, *et al.* **The DREAM complex mediates GIST cell quiescence and is a novel therapeutic target to enhance imatinib-induced apoptosis.** *Cancer Res.* 2013; **73**:5120-29.

BOULOS FI, DUPONT WD, SIMPSON JF, *et al.* **Histologic associations and long-term cancer risk in columnar cell lesions of the breast: a retrospective cohort and a nested case-control study.** *Cancer.* 2008;113(9):2415-21. doi:10.1002/cncr.23873

BRAUN L, MIETZSCH F, SEIBOLD P, SCHNEEWEISS A, SCHIRMACHER P, CHANG-CLAUDE J, *et al.* **Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic relevance of progesterone receptor loss.** *Mod Pathol.* 2013 Sep;26(9):1161-71. doi: 10.1038/modpathol.2013.60. Epub 2013 Apr 5. PMID: 23558572.

BRAUN S, PANTEL K, MULLER P, JANNI W, HEPP F, KENTENICH CR, *et al.* **Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer .** *N Engl J Med* 2000; 342:525–33.

BREAST CANCER ASSOCIATION CONSORTIUM *et al.* **Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women.** *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 384, n. 5, p. 428-39, Feb 2021. DOI 10.1056/NEJMoa1913948. Disponível em: [https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1913948?](https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1913948? ArticleTools=true) ArticleTools true. Acesso em: 14 jun. 2021.

BRIGHT, CJ, REA, DW, FRANCIS, A *et al.* **Comparison of quadrant-specific breast cancer incidence trends in the United States and England between 1975 and 2013.** 2016, *Cancer Epidemiology*, 44. pp. 186-194. ISSN 1877-7821

BRISKEN C PS, PARK S, VASS T, LYDON J P, O'MALLEY B W, WEINBERG R A. **A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(9):5076–5081.

BROWN JR, DIGIOVANNA MP, KILLELEA B, LANNIN DR, RIMM DL. **Quantitative assessment Ki-67 score for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *Lab Invest.* 2014 Jan;94(1):98-106. doi: 10.1038/labinvest.2013.128. Epub 2013 Nov 4. PMID: 24189270.

BUISSERET L, GARAUD S, DE WIND A, *et al.* **Tumor-infiltrating lymphocyte composition organization and PD-1/PD-L1 expression are linked in breast cancer.** *Oncolmmunology* 2017, vol 6, no.1 e1257452-1/12.

BUITRAGO, F., UEMURA, G., SENA, MCF. **Fatores prognósticos em carcinoma de mama.** Ciências Saúde - 22 Sup 1: S69-S82, 2011.

BULL WORLD HEALTH ORGAN. **Lactation.** 1989;67 Suppl (Suppl):19-40. PMID: 20604468; PMCID: PMC2491196.

BULLWINKEL J, BARON-LÜHR B, LÜDEMANN A, WOHLLENBERG C, GERDES J, SCHOLZEN T. **Ki67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells.** J Cell Physiol. 2006 Mar;206(3):624-35. doi: 10.1002/jcp.20494. PMID: 16206250.

BURNSIDE ELIZABETH S *et al.* **The ACR BI-RADS® Experience: Learning from History.** J Am Coll Radiol. 2009; 6:851-60.

BURSTEIN HJ, TEMIN S, ANDERSON H, BUCHHOLZ TA, DAVIDSON NE, GELMON KE, *et al.* **Adjuvant Endocrine Therapy for Women with Hormone Receptor–Positive Breast Cancer : American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update.** Journal of Clinical Oncology. Vol 32, Num2. July 20, 2014, 2255-70.

BURSTEIN MD, TSIMELZON A, POAGE GM, COVINGTON KR, CONTRERAS A, FUQUA SA, *et al.* **Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer .** Clin Cancer Res 2015; 21:1688-98.

BUTLER TP, GULLINO PM. **Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocancer.** Cancer Res 1975; 35:512–6.

CABAÑAS MORAFRAILE E, PÉREZ-PEÑA J, FUENTES-ANTRÁS J, MANZANO A, PÉREZ-SEGURA P, PANDIELLA A, GALÁN-MOYA EM, OCAÑA A. **Genomic Correlates of DNA Damage in Breast Cancer Subtypes.** Cancers (Basel). 2021 Apr 27;13(9):2117. doi: 10.3390/cancers13092117. PMID: 33925616; PMCID: PMC8123819.

CADY, B. **Use of primary breast carcinoma characteristics to predict lymph node metastases.** Cancer vol. 79,10 (1997): 1856-61; discussion 1862-4. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19970515)79:10<1856: aid-cncr2>3.0.co;2-e

CALLAGY G, CATTANEO E, DAIGO Y, HAPPERFIELD L, BOBROW LG, PHAROAH PD, *et al.* **Molecular classification of breast cancers using tissue microarrays.** Diagn Mol Pathol. 2003;12(1):27-34

CARDOSO F, COSTA, A, NORTON, L, *et al.* **1st International consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1).** Breast (Edinburgh, Scotland) vol. 21,3 (2012): 242-52. doi: 10.1016/j.breast.2012.03.003

CARIATI M, PURUSHOTHAM AD. **Stem cells and breast cancer.** Histopathology. 2008;52(1):99-107.

CARR JA, HAVSTAD S, ZARBO RJ, DIVINE G, MACKOWIAK P, VELANOVICH V. **The association of HER-2/neu amplification with breast cancer recurrence.** Arch Surg. 2000; 135: 1469-74.

CERIANI R L. **Fetal mammary gland differentiation in vitro in response to hormones (I). Morphological findings.** Dev Biol. 1970;21(4):506-29.

CHEANG MC, CHIA SK, VODUC D, GAO D, LEUNG S, SNIDER J, WATSON M, DAVIES S, BERNARD PS, PARKER JS, PEROU CM, ELLIS MJ, NIELSEN TO. **Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.** J Natl Cancer Inst. 2009 May 20;101(10):736-50. doi: 10.1093/jnci/djp082. Epub 2009 May 12.

CHEMNITZ JM, PARRY RV, NICHOLS KE, JUNE CH, RILEY JL. **SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation.** Journal of Immunology. 2004; 173 (2): 945–54.

CHEN DS, IRVING BA, HODI FS. **Molecular pathways: next-generation immunotherapy—inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1.** Clin Cancer Res. 2012; 18:6580-7.

CHEN DS, MELLMAN I. **Oncology meets immunology: the cancer -immunity cycle.** Immunity. 2013; 39:1-10.

CHU PG, WEISS LM: **Keratin expression in human tissues and neoplasms.** Histopathology 2002, 40:403-39.

CHUNG YR, KIM HJ, JANG MH, PARK SY. **Prognostic value of tumor infiltrating lymphocyte subsets in breast cancer depends on hormone receptor status.** Breast Cancer Res Treat. 2017; 161:409–420 DOI 10.1007/s10549-016-4072-9.

CIRQUEIRA MB, MENDONÇA CR, NOLL M, SOARES LR, DE PAULA CARNEIRO CYSNEIROS MA, PAULINELLI RR, MOREIRA MAR, FREITAS-JUNIOR R. **Prognóstico Papel da Expressão PD-L1 em Cancer de Mama Invasivo: Revisão Sistemática e Meta-Análise.** Cancer es (Basileia). 2021 Dez 3;13(23):6090. doi: 10.3390/cancer es13236090.

CIRQUEIRA MB, MOREIRA MAR, SOARES LR, FREITAS, JÚNIOR R. **Subtipos moleculares do cancer de mama.** FEMINA. 2011; vol (39):499-503

CLARK GM. **Prognostic and predictive factors.** In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S, editors. Diseases of breast. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.461-70

CORSO G, KAHLER-RIBEIRO-FONTANA S, PAGAN E, BAGNARDI V, MAGNONI F, MUNZONE E, BOTTIGLIERI L, VERONESI P, GALIMBERTI V. **Ten-year outcome results of cT4 breast cancer after neoadjuvant treatment.** J Surg Oncol. 2021 Dec;124(8):1242-1250. doi: 10.1002/jso.26662. Epub 2021 Sep 1.

COTE RJ, ROSEN PP, LESSER ML, OLD LJ, OSBORNE MP. **Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases.** J Clin Oncol 1991;9: 1749–56.

COULOMBE PA, OMARY MB: **'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function, and regulation of keratin intermediate filaments.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14:110-22.

CUNHA G RYP, YOUNG P, CHRISTOV K. *et al.* **Mammary phenotypic expression induced in epidermal cells by embryonic mammary mesenchyme.** *Acta Anat (Basel)* 1995;152(3):195-204. [PubMed] [Google Scholar]

CURIGLIANO G, BURSTEIN HJ, WINER EP, *et al.* **De-escalating and escalating treatments for early stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017.** *Annals of Oncology* [Internet].

DABBS, D., CARTER, G., FUDGE, M. *et al.* **Molecular alterations in columnar cell lesions of the breast.** *Mod Pathol* 19, 344–9 (2006).  
<https://doi.org/10.1038/modpathol.3800538>

DANIEL CW, STRICKLAND P, FRIEDMANN Y. **Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth.** *Dev. Biol.* 1995; 169 (2): 511-9

DAWOOD S, MERAJVER SD, VIENS P, *et al.* **International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment.** *Ann Oncol.* 2011;22(3):515-23.

DAWSON SJ, TSUI DW, MURTAZA M, *et al.* **Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer** *N. Engl. J. Med.*, 368 (2013), pp. 1199-209.

DENARDO DG, COUSSENS LM. **Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression.** *Breast Cancer Res.* 2007; 9(4):212. doi:10.1186/bcr1746.

DENG G, LU Y, ZLOTNIKOV G, THOR AD, SMITH HS. **Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast cancers.** *Science.* 1996 Dec 20;274(5295):2057-9. doi: 10.1126/science.274.5295.2057. PMID: 8953032.

DENKERT C, LOIBL S, NOSKE A, ROLLER M, MULLER BM, KOMOR M, BUDCZIES J, DARB-ESFAHANI S, KRONENWETT R, HANUSCH C, VON TORNE C, WEICHERT W, ENGELS K, SOLBACH C, SCHRADER I, DIETEL M, VON MINCKWITZ G. **Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2010; 28(1):105–13. doi:10.1200/JCO.2009.23.7370

DIEL IJ, KAUFMANN M, COSTA SD, HOLLE R, VON MINCKWITZ G, SOLOMAYER EF, *et al.* **Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status.** *J Natl Cancer Inst* 1996;88: 1652–8.

DILL EA, GRU AA, ATKINS KA, FRIEDMAN LA, MOORE ME, BULLOCK TN, CROSS JV, DILLON PM, MILLS AM. **PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors.** *Am J Surg Pathol.* 2017 Mar;41(3):334-42. doi: 10.1097/PAS.0000000000000780. PMID: 28195880.

DING YC, *et al.* **Molecular subtypes of triple-negative breast cancer in women of different race and ethnicity.** *Oncotarget.* 2019; 10(2): 198–208. doi: 10.18632/oncotarget.26559

DOMAGALA W, MARKIEWSKI M, HAREZGA B, DUKOWICZ A, OSBORN M. **Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in breast cancer: its relationship with vimentin and p53 protein.** *Clin Cancer Res.* 1996 Jan;2(1):147-54. PMID: 9816101

DROPE, J.*et al.* **The Tobacco Atlas.** Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies, 2018. Disponível em: <<https://tobaccoatlas.org/topic/deaths/>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

DUFLOTH RM. **Cancer de mama hereditário em mulheres brasileiras: mutações dos genes de BRCA1 e BRCA2, polimorfismos dos genes de reparo do DNA e caracterização imunoistoquímica pela técnica de tissue microarray [tese].** Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2004.

DUNKLER D, MICHIELS S, SCHEMPER M. **Gene expression pro ling: does it add predictive accuracy to clinical characteristic in cancer prognosis?** *Eur J Cancer.* 2007;43(4):745-51.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG). **Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials.** *Lancet* 2005; 365:1687-717.

EIERMANN W, REZAI M, KÜMMEL S, KÜHN T, WARM M, FRIEDRICHS K, SCHNEEWEISS A, MARKMANN S, EGGEMANN H, HILFRICH J, JACKISCH C, WITZEL I, EIDTMANN H, BACHINGER A, HELL S, BLOHMER J. **The 21-gene recurrence score assay impacts adjuvant therapy recommendations for ER-positive, node-negative and node-positive early breast cancer resulting in a risk-adapted change in chemotherapy use.** *Ann Oncol.* 2013 Mar;24(3):618-24. doi: 10.1093/annonc/mds512. Epub 2012 Nov 7.

ELSTON CW, ELLIS IO. **Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.** *Histopathology.* 1991;19(5):403-10.

ENDERLING H, NAVA ALMOG, LYNN HLATKY. **Systems biology of tumor dormancy.** In: Cohen IR, A, editors. **Lajtha, J.D. Lambris, R. Paoletti Advances in experimental medicine and biology.** New York: Springer Science; 2013. p. 290.

EVANS EB, LIN SY. **New insights into tumor dormancy: Targeting DNA repair pathways.** *World J Clin Oncol.* 2015 Oct 10;6(5):80-8. doi: 10.5306/wjco. v6.i5.80. PMID: 26468441; PMCID: MC4600194.

FAN, C., OH, D.S., WESSELS, L., WEIGELT, B., NUYTEN, D.S.A., NOBEL, A.B., VAN'T VEER, L.J., PEROU, C.M., 2006. **Concordance among gene-Expression-Based predictors for breast cancer.** *N.Engl. J. Med.* 355, 560e569.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. (FEBRASGO). **Manual de Orientação Mastologia**. São Paulo, 2010. 216 p.

FEHM T, MUELLER R, *et al.* **Tumor cell dormancy: implications for the biology and treatment of breast cancer**. *APMIS* 116: 742–53, 2008. ISSN 0903-4641.

FEUERER M, ROCHA M, BAIL L, UMANSKY V, SOLO-MAYEREF, BASTERTG, *et al.* **Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients**. *Int J Cancer* 2001; 92:96–105

FIDLER IJ. **Metastasis. quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2 $\alpha$ -deoxyuridine**. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45:773–82.

FIFE BT, BLUESTONE JA. **Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways**. *Journal compilation Immunological Reviews*. 2008; Vol. 224: 166–182: 0105-2896.

FITZGIBBONS PL, HENSON DE, HUTTER RV. **Benign breast changes and the risk for subsequent breast cancer: an update of the 1985 consensus statement**. **Cancer Committee of the College of American Pathologists**. *Arch Pathol Lab Med*. 1998 Dec;122(12):1053-5. PMID: 9870852.

FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, THOR AD, ALLRED DC, CLARK GM, RUBY SG, O'MALLEY F, SIMPSON JF, CONNOLLY JL, HAYES DF, EDGE SB, LICHTER A, SCHNITT SJ. **Prognostic factors in breast cancer**. **College of American Pathologists Consensus Statement 1999**. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):966-78. doi: 10.5858/2000-124-0966-PFCDI. PMID: 10888772.

FLEURY Medicina e Saúde. **Rastreamento de câncer de Mama**. Disponível em: <https://www.fleury.com.br/medico/artigos-cientificos/rastreamento-de-cancer-de-mama>. Acesso em: 09 dez. 2021.

FLINT D JTE, TONNER E, BEATTIE J, ALLAN G J. **Role of insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland development**. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;13(4):443-53. [PubMed] [Google Scholar]

FOULKES WD, SMITH IE, REIS-FILHO, JS. **Triple-Negative Breast Cancer**. *N Engl J Med* 2010; 363:1938-1948 DOI: 10.1056/NEJMra1001389

FOULKES WD, STEFANSSON IM, CHAPPUIS PO, BEGIN LR, GOF N JR, WONG N, *et al.* **Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer**. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(19):1482-5.

FRANKEL, PP; ESTEVES, VIVIANE FERNANDES; THULER, LUIZ CLAUDIO SANTOS AND VIEIRA, ROBERTO JOSÉ DA SILVA. **Acurácia da punção aspirativa por agulha fina e da punção por agulha grossa no diagnóstico de lesões mamárias**. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*. 2011, vol.33, n.3, pp. 139-43.

FUCHS E, WEBER K: **Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.** *Annu Rev Biochem* 1994, 63:345-82.

GALVÃO DG. **Amamentação Bem-sucedida: Alguns factores determinantes.** Loures: Lusociência; 2006.

GARBER, J. E. *et al.* **Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome.** *Cancer Research*, Baltimore, v. 51, n. 22, p. 6094-7, Nov 1991. Disponível em: <https://cancer.res.aacrjournals.org/content/51/22/6094.full-text.pdf>. Acesso em: 14 jun. 2021.

GEBAUER G, FEHM T, MERKLE E, BECK EP, LANG N, JAEGER W. **Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up.** *J Clin On- col* 2001; 19:3669-74.

GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER HH, SCHWAB U, STEIN H. **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5. PMID: 6206131.

GERDES J, SCHWAB U, LEMKE H, STEIN H. **Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.** *Int J Cancer.* 1983 Jan 15;31(1):13-20. doi: 10.1002/ijc.2910310104. PMID: 6339421.

GHEBEH H, MOHAMMED S, AL-OMAIR A, QATTAN A, LEHE C, AL-QUDAIHI G, ELKUM N, ALSHABANAH M, BIN AMER S, TULBAH A, AJARIM D, AL-TWEIGERI T, DERMIME S. **The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal cancer: correlation with important high-risk prognostic factors.** *Neoplasia.* 2006 Mar;8(3):190-8. doi: 10.1593/neo.05733.

GOBBI H. **Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE de 2012.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.* Dezembro 2012, 48(6): 463-74.

GOING JJ AND MOFFAT DF. **Escaping from Flatland: clinical and biological aspects of human mammary duct anatomy in three dimensions.** *J Pathol.* 2004;203(1):538-44.

GOING JJ. **Normal Breast.** Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2006.

GOLDHIRSCH A, WINER EP, COATES AS, GELBER RD, PICCART-GEBHART M, THÜRLIMANN B, SENN HJ; PANEL MEMBERS. **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.** *Ann Oncol.* 2013 Sep;24(9):2206-23. doi: 10.1093/annonc/mdt303. Epub 2013 Aug 4. PMID: 23917950; PMCID: PMC3755334.

GOLDHIRSCH A, WINER EP, COATES AS, GELBER RD, PICCART-GEBHART M, THÜRLIMANN B, *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.** *Ann Oncol* 2013; 24:2206-23.

GOLDHIRSCH A, WOOD WC, COATES AS, GELBER RD, THÜRLIMANN B, SENN H-J, *et al.* **Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer : highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** Ann Oncol. 2011;22(8):1736-47.

GONCALVES, ALINE VALADÃO BRITTO *et al.* **Grau de subestimação histopatológica por core biopsy de lesões não palpáveis da mama.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Rio de Janeiro , v. 33, n. 7, July 2011.

GONG G, DEVRIES S, CHEW KL, CHA I, LJUNG BM, WALDMAN FM. **Genetic changes in paired atypical and usual ductal hyperplasia of the breast by comparative genomic hybridization.** Clin Cancer Res. 2001 Aug;7(8):2410-4. PMID: 11489820.

GUAN, J.; LIM, K. S.; MEKHAIL, T.; CHANG, C. C. **Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in the Programmed Death Receptor-1 (PD-1)/PD-L1 Blockade: A Key Player Against Various Cancer s.** Arch Pathol Lab Med, 141, n. 6, p. 851-61, Jun 2017.

GUPTA, G.P AND MASSAGUE, J. **Cancer metastasis: building a framework** Cell, 127 (2006), pp. 679-95.

GU-TRANTIEN C, LOI S, GARAUD S, EQUETER C, LIBIN M, DE WIND A, RAVOET M, LE BUANEC H, SIBILLE C, MANFOUO-FOUTSOP G, VEYS I, HAIBE-KAINS B, SINGHAL SK, MICHIELS S, ROTHE F, SALGADO R, DUVILLIER H, IGNATIADIS M, DESMEDT C, BRON D, LARSIMONT D, PICCART M, SOTIRIOU C, WILLARD-GALLO K. **CD4(?) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival.** J Clin Investig. 2013; 123(7):2873-92. doi:10.1172/JCI67428.

HA Y BG, YANG Q, REISS M, KEARNEY T, HIGGINS SA, WEIDHAAS J, *et al.* **Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer.** J Clin Oncol 2006; 24:5652-7.

HANAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation. The hallmarks of Cancer.** Cell. 2000; 100:57-70.

HANAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell vol. 144,5 (2011): 646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HANAHAN D. **Hallmarks of Cancer: New Dimensions.** Cancer Discov 1 January 2022; 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HESS, K.R.; VARADHACHARY, G.R.; TAYLOR, S.H., *et al.* **Metastatic Patterns in adenocancer.** Cancer, 106 (2006), pp. 1624-33.

HOWARD B A AND GUSTERSON B A. **Human breast development.** J Mammary Gland. Biol Neoplasia. 2000;5(2):119-37.

HUANG W, RAN R, SHAO B, LI H. **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. doi: 10.1007/s10549-019-05371-0. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31359214.

HURLEY, W. L. 2002. **Lactation Biology: General References.** Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana.



IBGE EDUCA – Portal do IBGE. **Expectativa de vida**. Disponível em: <https://teen.ibge.gov.br/noticias-teen/7827-expectativa-de-vida/> Acesso em 19 mar. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Estimativa 2020**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2020/> Acesso em: 07 mar. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Números de câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 08 mar. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (INCA), Ministério da Saúde. **Estimativa 2010, Incidência do Cancer no Brasil**. INCA 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Dieta, nutrição, atividade física e cancer: uma perspectiva global: um resumo do terceiro relatório de especialistas com uma perspectiva brasileira**. Rio de Janeiro: INCA, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Diretrizes para a detecção precoce do cancer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/diretrizes-para-deteccao-precoce-do-cancer-de-mama-no-brasil> Acesso em: 23 jul. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação**. Rio de Janeiro: INCA, 2019b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/situacao-do-cancer-de-mama-no-brasil-sintese-de-dados-dos-sistemas-de-informacao> Acesso em: 10/03/2022

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). **Deteção precoce do cancer de mama. 2018**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/acoes-de-controlado-deteccao-precoce>. Acesso em: 15 set. 2019.

I O ELLIS, S HUMPHREYS, M MICHELL, S E PINDER, C A WELLS, H D ZAKHOUR. *J Clin Pathol*. 2004 September; 57(9): 897;902. 10.

I O ELLIS, S HUMPHREYS, M MICHELL, S E PINDER, C A WELLS, H D ZAKHOUR. **J. Best Practice No 179. Guidelines for breast needle core biopsy handling and reporting in breast screening assessment**. *Journal of clinical pathology* vol. 57,9 (2004): 897-902. doi:10.1136/jcp.2003.010983

IARC GLOBOCAN 2012: **Estimated Incidence, Mortality and Prevalence**. Worldwide in 2012, (2014).

IBRAHIM EM, AL-FOHEIDI ME, AL-MANSOUR MM, KAZKAZ GA. **The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis**. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 148(3):467–476. doi:10.1007/s10549-014-3185-2.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs of carcinogenic risks to humans and handbooks of cancer prevention**. Lyon: IARC, 2021. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/human-cancer-known-causes-and-prevention>. Acesso em: 13 mai. 2021.

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans**, monograph volumes 1- 129. Lyon: IARC, 2020. B Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/07/Classificatio>. Acesso em: 13 mai. 2021.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A.; NAVES, M. M. V. **Fatores de risco e de proteção para cancer de mama: uma revisão sistemática**. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/ZbRRyNH4HRLXSbFNMms6RgM/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 27 mai. 2021.

INWALD EC, KLINKHAMMER-SCHALKE M, HOFSTÄDTER F, *et al.* **Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry**. Breast Cancer Res Treat. 2013;139(2):539-52. doi:10.1007/s10549-013-2560-8.

JACKSON-FISHER AJBG, BELLINGER G, RAMABHADRAN R, MORRIS JK, LEE KF, STERN DF. **ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland**. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(49): 17138-43.

JAVED A AND LTEIF A. **Development of the human breast**. Semin Plast Surg. 2013;27(1):5-12. doi:10.1055/s-0033-1343989)

JEMAL, A.; TORRE, L.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. (Eds). **Risks of tobacco**. In: The Cancer Atlas. Third Ed. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2019. Disponível em: <https://canceratlas.cancer.org/risk-factors/risks-of-tobacco/> Acesso em: 20 jul. 2021.

JEMAL, DVM, *et al.*, **Global Cancer Statistics**. CA CANCER J CLIN 2011; 61:69–90.

JENSEN HM. **Breast pathology, emphasizing precancerous and cancer-associated lesions**. In: Bulbrook RO, Taylor DJ, eds. Commentaries on Research in Breast Disease. New York: Alan R. Liss; 1981:41-86

JÉZÉQUEL P, LOUSSOUARN D, GUÉRIN-CHARBONNEL C, CAMPION L, VANIER A, GOURAUD W, *et al.* **Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response**. Breast Cancer Res 2015; 17:43.

JIANG H, BAI X, ZHANG C, ZHANG X. **Evaluation of HER2 gene amplification in breast cancer using nuclei microarray in situ hybridization**. International Journal of molecular Sciences. 2012; 13:5519:27.

JOSHI P A, JACKSON H W, BERISTAIN A G, *et al.* **Progesterone induces adult mammary stem cell expansion**. Nature 2010. 10;4657299803–807.

JUHASZ-BÖSS INGOLF, MAVROVA RUSSALINA, MOGA SIMONA, RADOSA JULIA, SCHMIDT GILDA, RAINER M. BOHLE, HASENFUS ANDREA, SOLOMAYER ERICH, HERR DANIEL. **Can Ki-67 Play a Role in Prediction of Breast Cancer Patients' Response to Neoadjuvant Chemotherapy?** BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 628217, 7 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/628217>.

KAFL S, LEE JM, BENANDER C, GEORGE JA, WOOTERS J, *et al.* **PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta.** FEBS Lett. 2004/ Sep 10; 574(1-3):37-41.

KARNIK T, KIMLER BF, FAN F, TAWFIK O. **PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies.** Hum Pathol. 2018 Feb; 72:28-34. doi: 10.1016/j.humpath.2017.08.010. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28843709.

KEIR ME, BUTTE MJ, FREEMAN GJ, SHARPE AH. **PD-1 and its ligands in tolerance and immunity.** Annu Rev Immunol. 2008; 26:677-704.

KENNECKE, H., YERUSHALMI, R., WOODS, R., *et al.* **Metastatic behavior of breast cancer subtypes.** J. Clin. Oncol., 28 (2010), pp. 3271-77

KHOURY T, KARABAKHTSIAN RG, MATTSON D, YAN L, SYRIAC S, HABIB F, LIU S, DESOUKI MM. **Pleomorphic lobular cancer in situ of the breast: clinicopathological review of 47 cases.** Histopathology. 2014 Jun;64(7):981-93. doi: 10.1111/his.12353. Epub 2014 Feb 25. PMID: 24372322; PMCID: PMC4444063.

KIM HJ, KIM HJ, LEE SB, *et al.* **A proposal for a new classification of T4 breast cancer as stage IIIc: a report from the Korean Breast Cancer Society.** Breast Cancer Res Treat. 2015;153(1):153-60.

KIMBUNG S, LOMAN N, HEDENFALK I. **Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases.** Semin Cancer Biol. 2015 Dec; 35:85-95. doi: 10.1016/j.semcancer.2015.08.009. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26319607.

KOCAAY AF, CELIK SU, SEVIM Y, OZYAZICI S, CETINKAYA OA, ALIC KB. **The role of fine needle aspiration cytology and core biopsy in the diagnosis of palpable breast masses.** Niger Med J. 2016;57(2):77-80. doi:10.4103/0300-1652.182078

KREIKE B, VAN KOUWENHOVE M, HORLINGS H, WEIGELT B, PETERSE H, BARTELINK H, *et al.* **Gene expression profile and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast cancers.** Breast Cancer Res 2007;9: R65.

KUMAR, V.; ABBAS, ASTER, JC. Robbins e Cotran – Patologia – **Bases Patológicas das Doenças.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

KUMAR, V.; ABBAS, ASTER, JC. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease,** 10th Edition. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

KWAPISZ D. **Pembrolizumab and atezolizumab in triple-negative breast cancer.** Cancer Immunol Immunother. 2021 Mar;70(3):607-17. doi: 10.1007/s00262-020-02736-z. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33015734.

LAKHANI SR, CHAGGAR R, DAVIES S, JONES C, COLLINS N, ODEL C, STRATTON MR, O'HARE MJ. **Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast.** J Pathol. 1999 Dec;189(4):496-503. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199912)189:4<496: AID-PATH485>3.0.CO;2-D. PMID: 10629549.

SUNIL R. LAKHANI, JOCELYNE JACQUEMIER, JOHN P. SLOANE, BARRY A. GUSTERSON, THOMAS J. ANDERSON. *et al.* **Multifactorial Analysis of Differences Between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations.** JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 90, Issue 15, 5 August 1998, Pages 1138-45, <https://doi.org/10.1093/jnci/90.15.1138>

LARGILLIER, R., FERRERO, JM., DOYEN. J., *et al.* **Prognostic factors in 1,038 women with metastatic breast cancer** . Ann. Oncol., 19 (2008), pp. 2012-9.

LAYFIELD, LESTER J. **Fine needle aspiration of the breast: review of the technique and a comparison with excisional biopsy.** Current Diagnostic Pathology - September 1995 (Vol. 2, Issue 3, Pages 138-45)

LEE CH, DERSHAW DD, KOPANS D. **Breast cancer screening with imaging: recommendations from the Society of Breast Imaging and ACR on the use of mammography, breast MRI, breast ultrasound, and other technologies for the detection of clinically occult breast cancer.** J Am Coll Radiol. 2010; 7:18-27.

LEE H J AND ORMANDY C J. **Interplay between progesterone and prolactin in mammary development and implications for breast cancer.** Mol Cell Endocrinol. 2012;357(1-2):101-7. [PubMed] [Google Scholar].

LEE HJ, SEO JY, AHN JH, AHN SH, GONG G. **Tumor associated lymphocytes predict response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients.** J Breast Cancer. 2013; 16(1):32-9. doi:10.4048/jbc.2013.16.1.32.

LEE, K., GJOREVSKI, N., BOGHAERT, E., *et al.* **Snail1, Snail2, and E47 promote mammary epithelial branching morphogenesis.** EMBO J. 2011; 30:2662

LEHMANN BD, BAUER JA, CHEN X, SANDERS ME, CHAKRAVARTHY AB, SHYR Y, *et al.* **Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies.** J Clin Invest 2011; 121:2750-67.

LEHMANN BD, JOVANOVIĆ B, CHEN X, ESTRADA MV, JOHNSON KN, SHYR Y, MOSES HL, SANDERS ME, PIETENPOL JA. **Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection.** PLoS One. 2016 Jun 16;11(6): e0157368. doi: 10.1371/journal.pone.0157368. PMID: 27310713; PMCID: PMC4911051.

LEITNER SP, SWERN AS, WEINBERGER D, *et al.* **Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a, b N0 M0).** Cancer . 1995; 76:2266-74.

LEMOS LGT, LONGO GMDC, MENDONÇA BDS, ROBAINA MC, BRUM MCM, CIRILO CA, GIMBA ERP, COSTA PRR, BUARQUE CD, NESTAL DE MORAES G, MAIA RC. **The LQB-223 Compound Modulates Antiapoptotic Proteins and Impairs Breast Cancer Cell Growth and Migration.** Int J Mol Sci. 2019 Oct 12;20(20):5063. doi: 10.3390/ijms20205063. PMID: 31614718; PMCID: PMC6834317.

LI Z, DONG P, REN M, SONG Y, QIAN X, YANG Y, LI S, ZHANG X, LIU F. **PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3(+) Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient.** J Cancer. 2016; 7:784-93.

LI, X., LI, M., LIAN, Z. *et al.* **Prognostic Role of Programmed Death Ligand-1 Expression in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Targ Oncol* 11, 753-61 (2016).

LIU J, CHEN K, JIANG W, *et al.* **Chemotherapy response and survival of inflammatory breast cancer by hormone receptor- and HER2-defined molecular subtypes approximation: an analysis from the National Cancer Database.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143(1):161-8.

LOI S, MICHIELS S, SALGADO R, SIRTAINE N, JOSE V, FUMAGALLI D, KELLOKUMPU-LEHTINEN PL, BONO P, KATAJA V, DESMEDT C, PICCART MJ, LOIBL S, DENKERT C, SMYTH MJ, JOENSUU H, SOTIRIOU C. **Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial.** *Ann Oncol.* 2014; 25(8):1544-50. doi:10.1093/annonc/mdu112

LOI S, SIRTAINE N, PIETTE F, SALGADO R, VIALE G, VAN EENOO F, ROUAS G, FRANCIS P, CROWN JP, HITRE E, DE AZAMBUJA E, QUINAUX E, DILEO A, MICHIELS S, PICCART MJ, SOTIRIOU C. **Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98.** *J Clin Oncol.* 2013; 31(7):860-7. doi:10.1200/JCO.2011.41.0902.

LOVE SM, BARSKY SH. **Anatomy of the nipple and breast ducts revisited.** *Cancer.* 2004;101(9):1947-57.

MA, XJ., DAHIYA, S., RICHARDSON, E. *et al.* **Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression.** 2009, *Breast Cancer Res* 11, R7. <https://doi.org/10.1186/bcr2222>

MAGNY SJ, SHIKHMAN R, KEPPKE AL. **Breast Imaging Reporting and Data System.** 2021 Aug 31. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan– PMID: 29083600.

MAHMOUD SM, PAISH EC, POWE DG, MACMILLAN RD, GRAINGE MJ, LEE AH, ELLIS IO, GREEN AR. **Tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2011; 29(15):1949-55. doi:10.1200/JCO.2010.30.5037.

MAKDISSI, Fabiana Baroni Alves. **Influência do microambiente no prognóstico do câncer da mama.** 2013. Tese (Doutorado em Oncologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/T.5.2014.tde-01042014-112230. Acesso em: 16 fev. 2022.

MARMOT M., ALTMAN D.G., CAMERON D.A., DEWAR J.A., THOMPSON S.G., WCLIOX M. **The benefits and harms of breast cancer screening: An independent review (2012).** *The Lancet*, 380 (9855) , pp. 1778-86.

MARQUEZ A, WU R, ZHAO J, TAO J, SHI Z. **Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by chromogenic in situ Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy.** *Diagn Mol Pathol.* 2004; 13:1-8.

MATOS I, DUFLOTH R, ALVARENGA M, ZEFERINO LC, SCHMITT F. **P63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three markers to distinguish basal phenotype in breast cancers.** *Virchows Arch.* 2005;447(4):688-94.

MAZEL, M.; JACOT, W.; PANTEL, K.; BARTKOWIAK, K. *et al.* **Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells.** *Mol Oncol*, 9, n. 9, p. 1773-82, Nov 2015.

MCDERMOTT, K. M., LIU, B. Y., TISTY, T. D., *et al.* **Primary cilia regulate branching morphogenesis during mammary gland development.** *Curr Biol.* 2010; 20:731.

MEDCALC SOFTWARE LTD. DIAGNOSTIC TEST EVALUATION CALCULATOR. Disponível em: [https://www.medcalc.org/calc/diagnostic\\_test.php](https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). Acesso em: 8 fev.2022.

MELLOR HR, FERGUSON DJ, CALLAGHAN R. **A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs.** *Br J Cancer.* 2005; **93:302-9.**

MELNYK BM, FINEOUT-OVERHOLT E. **Making the case for evidence-based practice.** In: Melnyk BM, Fineout-Overholt E. **Evidence based practice in nursing & healthcare. A guide to best practice.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2005. p.3-24.

MENDELSON, E.B., BÖHM-VÉLEZ, M., BERG, W.A., *et al.* (2013) **ACR BI-RADS® Ultrasound.** In: **ACR BI-RADS® Atlas, Breast Imaging Reporting and Data System, 5th Edition,** American College of Radiology, Reston, VA, 128-30.

MILANI A, SANGIOLO D, MONTEMURRO F, AGLIETTA M, VALABREGA G. **Active immunotherapy in HER2 overexpressing breast cancer: current status and future perspectives.** *Ann Oncol.* 2013; 24(7):1740-8. doi:10.1093/annonc/mdt133.

MILANI, VIVIAN *et al.* **Presumed prevalence analysis on suspected and highly suspected breast cancer lesions in São Paulo using BI-RADS® criteria.** *Sao Paulo Med. J., São Paulo*, v. 125, n. 4, July 2007.

MINGHUI ZHANG, HOUBIN SUN, SHU ZHAO, YAN WANG, HAIHONG PU, YAN WANG AND QINGYUAN ZHANG. **Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a metaanalysis.** *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 19), pp: 31347-54.

MITTENDORF EA, PHILIPS AV, MERIC-BERNSTAM F, QIAO N, WU Y, HARRINGTON S, SU X, WANG Y, GONZALEZ-ANGULO AM, AKCAKANAT A, CHAWLA A, CURRAN M, HWU P, SHARMA P, LITTON JK, MOLLDREM JJ, ALATRASH G. **PD-L1 expression in triple-negative breast cancer.** *Cancer Immunol Res.* 2014 Apr;2(4):361-70. doi: 10.1158/2326-6066.

MOHAMMED ZMA, GOING JJ, EDWARDS J, ELSBERGER B, DOUGHTY JC, MCMILLAN DC. **The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer .** *Br J Cancer .* 2012; 107(5):864-73. doi:10.1038/bjc.2012.347

MOINFAR F, MAN YG, ARNOULD L, BRATTHAUER GL, RATSCHEK M, TAVASSOLI FA. **Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary cancer: implications for tumorigenesis.** *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2562-6. PMID: 10811140.

MOINFAR F, MAN YG, BRATTHAUER GL, RATSCHEK M, TAVASSOLI FA. **Genetic abnormalities in mammary ductal intraepithelial neoplasia-flat type ("clinging ductal cancer in situ"): a simulator of normal mammary epithelium.** *Cancer.* 2000 May 1;88(9):2072-81. PMID: 10813719.

MOORE, K. L., DALLEY, A. F., AGUR, A. M.R. **Clinically oriented anatomy.** ed 7. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2014

MOORE, KL. **Embriologia clínica.** 10. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

MORI, H, KUBO, M, YAMAGUCHI, R, NISHIMURA, R, OSAKO, T, ARIMA, N, OKUMURA, Y, OKIDO, M, YAMADA, M, KAI, M, KISHIMOTO, J, ODA, Y & NAKAMURA, M. 2017, **The combination of PD-L1 expression and decreased tumorinfiltrating lymphocytes is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer.** *Oncotarget*, vol. 8, no. 9, pp. 15584-92.

MORIMOTO K, KIM SJ, TANEI T, *et al.* **Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression.** *Cancer Sci.* 2009;100(6): 1062-68.

MORRIS G.J., NAIDU S., TOPHAM A.K., GUILLES F., XU Y., MCCUE P., SCHWARTZ G.F., PARK P.K., ROSENBERG A.L., BRILL K. AND MITCHELL E.P. **Differences in breast cancer characteristics in newly diagnosed African American and Caucasian patients: a single- institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database.** *Cancer.* 2007; 110, 876-84.

MOY L, SLANETZ PJ, MOORE R, SATIJA S, YEH ED, MCCARTHY KA, HALL D, STAFFA M, RAFFERTY EA, HALPERN E, KOPANS DB. **Specificity of mammography and US in the evaluation of a palpable abnormality: retrospective review.** *Radiology.* 2002 Oct;225(1):176-81. doi: 10.1148/radiol.2251010999. PMID: 12355002.

MUENST S, SCHAERLI AR, GAO F, DASTER S, TRELLA E, DROESER RA, MURARO MG, ZAJAC P, ZANETTI R, GILLANDERS WE, WEBER WP, SOYSAL SD. **Expression of programmed death ligand 1(PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 146:15-24.

MUENST S, SCHAERLI AR, GAO F, DÄSTER S, TRELLA E, DROESER RA, MURARO MG, ZAJAC P, ZANETTI R, GILLANDERS WE, WEBER WP, SOYSAL SD. **Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jul;146(1):15-24. doi: 10.1007/s10549-014-2988-5. Epub 2014 May 20. PMID: 24842267; PMCID: PMC4180714.

MUFTAH AA, ALESKANDARANY MA, AL-KAABI MM, SONBUL SN, DIEZ-RODRIGUEZ M, NOLAN CC, CALDAS C, ELLIS IO, RAKHA EA, GREEN AR. **Ki67 expression in invasive breast cancer: the use of tissue microarrays compared with whole tissue sections.** Breast Cancer Res Treat. 2017 Jul;164(2):341-8. doi: 10.1007/s10549-017-4270-0. Epub 2017 May 6. PMID: 28478613; PMCID: PMC5487701.

MUFTAH1 AA, ALESKANDARANY MA, AL-KAABI MM, *et al.* **Ki67 expression in invasive breast cancer: the use of tissue microarrays compared with whole tissue sections.** Breast Cancer Res Treat. Published online: 06 May 2017. DOI 10.1007/s10549-017-4270-0.

NABAIS C, FIGUEIREDO J, LOPES P, MARTINS M, ARAÚJO A. **Total tumor load assessed by one-step nucleic acid amplification assay as an intraoperative predictor for non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer.** The breast. 2017; 32:33-6.

NG CK, MARTELOTTO LG, GAUTHIER A, *et al.* **Intra-tumor genetic heterogeneity and alternative driver genetic alterations in breast cancer with heterogeneous HER2 gene amplification.** Genome Biol. 2015;16(1):107. Published 2015 May 22. doi:10.1186/s13059-015-0657-6

NIELSEN TO, HSU FD, JENSEN K, CHEANG M, KARACA G, HU Z, *et al.* **Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast cancer.** Clin Cancer Res. 2004;10(16):5367-74.

NIELSEN TO, LEUNG SCY, RIMM DL, DODSON A, ACS B, BADVE S, DENKERT C, ELLIS MJ, FINEBERG S, FLOWERS M, KREIPE HH, LAENKHOLM AV, PAN H, PENAULT-LLORCA FM, POLLEY MY, SALGADO R, SMITH IE, SUGIE T, BARTLETT JMS, MCSHANE LM, DOWSETT M, HAYES DF. **Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group.** J Natl Cancer Inst. 2021 Jul 1;113(7):808-19. doi: 10.1093/jnci/djaa201. PMID: 33369635.

NIELSEN, T.O., PARKER, J.S., LEUNG, S., VODUC, K.D., EBBERT, M., VICKERY, T.L., DAVIES, S.R., SNIDER, J.E., STIJLEMAN, I.J., REED, J., CHEANG, M.C.U., MARDIS, E.R., PEROU, C.M., BERNARD, P.S., ELLIS, M.J. **A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer.** Clin. Cancer Res. 2010; 16, 5222-32.

NIETO-JIMÉNEZ C, ALCARAZ-SANABRIA A, PÁEZ R, PÉREZ-PEÑA J, CORRALES-SÁNCHEZ V, PANDIELLA A, OCAÑA A. **DNA-damage related genes and clinical outcome in hormone receptor positive breast cancer.** Oncotarget. 2016 Jul 28;8(38):62834-41. doi: 10.18632/oncotarget.10886.

OHI Y, UMEKITA Y, SAGARA Y, RAI Y, YOTSUMOTO D, MATSUKATA A, *et al.* **Whole sentinel lymph node analysis by a molecular assay predicts axillary node status in breast cancer.** Br J Cancer 2012 Oct 9;107(8):1239-43.



OKUYAMA, HIROAKI, AND MASAHIRO INOUE. **Gan to kagaku ryoho**. Cancer & chemotherapy vol. 38,10 (2011): 1559-64.

ORFÃO, A; GOUVÊIA, C. **Apontamentos de anatomia e fisiologia da lactação**. Rev Port Clin Geral 2009;25:347-54.

ORLANDINI LF, REIS FJCD, DA SILVEIRA WA, TIEZZI MG, DE ANDRADE JM, RIBEIRO-SILVA A, DEATON R, BOSLAND M, TIEZZI DG. **Identification of a Subtype of Poorly Differentiated Invasive Ductal Carcinoma of the Breast Based on Vimentin and E-cadherin Expression**. Rev Bras Ginecol Obstet. 2018 Dec;40(12):779-86. English. doi: 10.1055/s-0038-1673700.

OSBORNE MP. **Breast anatomy and development**. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. Diseases of the Breast. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2010:3-11.

OWENS, MA1; HORTEN, BC; DA SILVA, MM. **HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues**. Clin Breast Cancer. 2004 Apr;5(1):63-9.

PAGE DL, ANDERSON TJ. **Anatomy**. In: Page DL, Anderson TJ, eds. Histopathology of the Breast. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1987:4-10

PAGE DL, JENSEN RA, SIMPSON JF. **Routinely available indicators of prognosis in breast cancer**. Breast Cancer Res Treat. 1998;51(3):195-208.

PAGET, S. **The distribution of secondary growths in cancer of the breast 1889**. Cancer Metastasis Rev., 8 (1989), pp. 98-101.

PAIK S, SHAK S, TANG G, KIM C, BAKER J, CRONIN M, BAEHNER FL, WALKER MG, WATSON D, PARK T, *et al*. **A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer**. N Engl J Med. 2004;351(27):2817-26. doi: 10.1056/NEJMoa041588.

PANTEL K, BRAKENHOFF RH, BRANDT B. **Detection, clinical relevance, and specific biological properties of disseminating tumour cells**. Nat Rev Cancer 2008, 8:329-40.

PAREDES J, ALBERGARIA A, OLIVEIRA JT, JERONIMO C, MILANEZI F AND SCHMITT FC. **P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast cancers and is associated with CDH3 promoter hypomethylation**. Clin Cancer Res. 2005; 11(16):5869-77.

PAREDES J, FIGUEIREDO J, ALBERGARIA A, OLIVEIRA P, CARVALHO J, RIBEIRO AS, CALDEIRA J, COSTA AM, SIMOES-CORREIA J, OLIVEIRA MJ, PINHEIRO H, PINHO SS, MATEUS R, REIS CA, LEITE M, FERNANDES MS, *et al*. **Epithelial E- and P-cadherins: Role and clinical signi cance in cancer** . Biochim Biophys Acta. 2012; 1826(2):297-311.

PAREDES J, LOPES N, MILANEZI F, SCHMITT FC. **P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal cancers in situ**. Virchows Arch. 2007; 450(1):73-80.

PAREDES J, MILANEZI F, VIEGAS L, AMENDOEIRA I AND SCHMITT F. **P-cadherin expression is associated with high-grade ductal cancer in situ of the breast.** Virchows Arch. 2002; 440(1):16-21.

PAREDES, JCAF, MILANEZI MFG, REIS-FILHO JS, LEITÃO DRA, ATHANAZIO DA, SCHMITT FCL. **Correlação entre as expressões de P-caderina e de receptores de estrógeno no cancer da mama.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2002;38(4): 307-13.

PARK IH, KONG SY, RO JY, KWON Y, KANG JH, MO HJ, JUNG SY, LEE S, LEE KS, KANG HS, LEE E, JOO J, RO J. **Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Association With Programmed Death Ligand 1 Expression in Early-Stage Breast Cancer.** Clin Breast Cancer. 2016 Feb;16(1):51-8. doi: 10.1016/j.clbc.2015.07.006. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26364145.

PARK IH, KONG SY, RO JY, KWON Y, KANG JH, MO HJ, JUNG SY, LEE S, LEE KS, KANG HS, LEE E, JOO J, RO J. **Prognostic Implications of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Association with Programmed Death Ligand 1 Expression in Early-Stage Breast Cancer.** Clin Breast Cancer. 2016; 16:51-8.

PARK SY, LEE HE, LI H, SHIPITSIN M, GELMAN R, POLYAK K (2010) **Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer.** Clin Cancer Res 16:876-7.

PARKER, J.S., MULLINS, M., CHEANG, M.C.U., LEUNG, S., VODUC, D., *et al.* **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.** J. Clin. Oncol. 2009b; 27, 1160-7.

PATRIKIDOU A, CHABAUD S, RAY-COQUARD I, BUI BN, ADENIS A, RIOS M, BERTUCCI F, DUFFAUD F, CHEVREAU C, CUISSOL D, *et al.* **Influence of imatinib interruption and rechallenge on the residual disease in patients with advanced GIST: results of the BFR14 prospective French Sarcoma Group randomised, phase III trial.** Ann Oncol. 2013; 24:1087-93.

PAULA, ARNAUD DA CRUZ *et al.* **Molecular characterization of CD44+/CD24-/Ck+/CD45- cells in benign and malignant breast lesions.** Virchows Archiv, v. 470, n. 3, p.311-22, 23 jan. 2017.

PAYNE SJ, BOWEN RL, JONES JL, WELLS CA. **Predictive markers in breast cancer – the present.** Histopathology. 2008;52(1):82-90

PEREIRA MA, RAMOS MFKP, DIAS AR, RIBEIRO R, CARDILI L, ZILBERSTEIN B, CECCONELLO I, RIBEIRO U JR, DE MELLO ES, DE CASTRIA TB. **Scoring systems for PD-L1 expression and their prognostic impact in patients with resectable gastric cancer.** Virchows Arch. 2021 Jun;478(6):1039-48. doi: 10.1007/s00428-020-02956-9. Epub 2020 Oct 24. PMID: 33098489.

PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, *et al.* **Molecular portraits of human breast tumours.** Nature. 2000; 406:747-52.

PESATORI, A. C. **Long-term Effects in the Population Exposed to Dioxin After the “Seveso Accident”**. *Epidemiology*, v. 22 - Issue 1 - p S129, 2011 Disponível em: doi 10.1097/01.ede.0000392065.08710.30

PETO, G.R., DAVIES, C., *et al.* **Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials.** *Lancet*, 379 (2012), pp. 432-44.

PHAROAH PD, *et al.* **Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis.** *Int. J. Cancer*. 1997;71: 800-9.

POSTLEWAIT LM, TESHOME M, DESNYDER SM, *et al.* **Factors associated with pathological node negativity in inflammatory breast cancer: are there patients who may be candidates for a de-escalation of axillary surgery?** *Ann Surg Oncol*. 2020;27(12):4603-12.

POWELL AG, HORGAN PG, EDWARDS J (2012) **The bodies fight against cancer: is human leukocyte antigen (HLA) class 1 the key?** *J Cancer Res Clin Oncol* 138(5):723-8. doi:10.1007/ s00432-012-1192-4.

PRADO, GÉRON LUÍS MEDINA; GUERRA, MARIA TEREZA PARAGUASSÚ MARTINS. **Valor preditivo positivo das categorias 3, 4 e 5 do Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS®).** *Radiol Bras, São Paulo* , v. 43, n. 3, June 2010

PRAT A, PARKER J, KARGINOVA O, FAN C, LIVASY C, HERSCHKOWITZ J, *et al.* **Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.** *Breast Cancer Res*. 2010;12(5): R68

PRAT A, PEROU CM. **Deconstructing the molecular portraits of breast cancer.** *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):5-23. doi: 10.1016/j.molonc.2010.11.003.

Pu, T., Shui, R., Shi, J. *et al.* **External quality assessment (EQA) program for the immunohistochemical detection of ER, PR and Ki-67 in breast cancer: results of an interlaboratory reproducibility ring study in China.** *BMC Cancer* 19, 978 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6210-3>

PUJOL JL, GRENIER J, DAURES JP, DAVER A, PUJOL H, MICHEL FB: **Serum fragment of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer.** *Cancer Res* 1993, 53:61-6.

QIN T, ZENG YD, QIN G, XU F, LU JB, FANG WF, XUE C, ZHAN JH, ZHANG XK, ZHENG QF, PENG RJ, YUAN ZY, ZHANG L, *et al.* **High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer.** *Oncotarget*. 2015; 6:33972-81.

QUE Y, XIAO W, GUAN YX, LIANG Y, YAN SM, CHEN HY, LI QQ, XU BS, ZHOU ZW, ZHANG X. **PD-L1 Expression Is Associated with FOXP3+ Regulatory T-Cell Infiltration of Soft Tissue Sarcoma and Poor Patient Prognosis.** *J Cancer* 2017; 8(11):2018-25. doi:10.7150/jca.18683.

RAPHAEL GD, BARANIUK JN, KALINER MA. **How and why the nose runs.** *J Allergy Clin Immunol.* 1991;87(2):457-67.

RAKHA E.A. AND ELLIS I.O. **Triple-negative/basal-like breast cancer: review.** *Pathology.* 2009; 41, 40-7.

RATHOURE, A. K. **Dioxins: source, origin and toxicity assessment.** *Biodiversity Int J.* v. 2, n. 4, p. 310-4, 2018. DOI: 10.15406/bij.2018.02.00079

REGAN MM, FRANCIS PA, PAGANI O, *et al.* **Absolute benefit of adjuvant endocrine therapies for premenopausal women with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2 -negative early breast cancer.** *J clin oncol cancer .* 2016 jul1; 34 (19)2221-31. PMID 27044936.

REIS ML, VIEIRA DSC, WALTER LO, SANTOS -SILVA MC. **Detection of Metastatic Breast Cancer Cells in Bone Marrow by Flow Cytometry.** *International Journal of Medical and Pharmaceutical Case Reports.* 12(3): 1-6, 2019; Article no. IJMPCR.50866 ISSN: 2394-109X, NLM ID: 101648033

REIS-FILHO JS, WESTBURY C, PIERGA JY. **The impact of expression pro ling on prognostic and predictive testing in breast cancer.** *J Clin Pathol.* 2006;59(3):225-31.

RIOU G, MATHIEU MC, BARROIS M, LE BIHAN ML, AHOMADEGBE JC, BENARD J, LE MG. **c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification is a better indicator of poor prognosis than protein over-expression in operable breast cancer patients.** *Int J Cancer.* 2001; 95: 266-70.

ROBINSON G W, KARP A B, KRATOCHWIL K. **Regulation of mammary gland development by tissue interaction.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1999;4(1):9–19. [PubMed] [Google Scholar]

ROSEN PP, GROSHEN S, KINNE DW, NORTON L. **Factors influencing prognosis in node-negative breast cancer: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow up.** *J Clin Oncol.* 1993; 11:2090–2100.

ROSEN PP. **Breast Pathology.** Philadelphia: Lippincott - Raven, 1997

ROSEN PP. **Rosen's Breast Pathology.** 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

ROSEN, PP AND OBERMAN, HA. *Atlas of Tumor Pathology. Fascicle 7: Tumors of the Mammary Gland.* Washington, DC. AFIP. 1993.

ROSS JS, FLETCHER JA. **HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer.** *Am J Clin Pathol.* 1999;112(1 Suppl 1): S53-67.

RUSSO J AND RUSSO I H. **Development of the human breast.** *Maturitas.* 2004;49(1):2–15.

RUSSO J AND RUSSO I H. New York: Plenum Press; 1987. **Development of the human mammary gland.** *Maturitas*, vol. 49,1 (2004): 2-15. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.04.011

RUSSO J, BALOGH G A, CHEN J.*et al.* **The concept of stem cell in the mammary gland and its implication in morphogenesis, cancer, and prevention.** *Front Biosci.* 2006; 1:151-72.

SAID, S.M., VISSCHER, D.W., NASSAR, A., FRANK, R.D., VIERKANT, R.A., FROST, M.H., GHOSH, K., RADISKY, D.C., HARTMANN, L.C. AND DEGNIM, A.C. (2015), **Flat epithelial atypia and risk of breast cancer: A Mayo cohort study.** *Cancer*, 121: 1548-55. <https://doi.org/10.1002/cncr.29243>

SAKAKURA T. New York: Plenum Press; 1987. **Mammary embryogenesis;** pp. 37–66.

SALMANINEJAD, A.; VALILOU, S. F.; SHABGAH, A. G.; ASLANI, S. *et al.* **PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy.** *J Cell Physiol*, 234, n. 10, p. 16824-37, Aug 2019.

SCHMITT, F., RICARDO, S., VIEIRA, A.F.*et al.* **Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular subtypes.** *Virchows Arch* 460, 545–553 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00428-012-1237-8>

SCHNITT SJ, MILLIS RR, HANBY AM, OBERMAN HA. **The breast.** In: Mills SE, ed. **Diagnostic Surgical Pathology.** 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004: 323-95.

SCHNITT, SJ AND COLLINS, LC. **Biopsy Interpretation of the Breast.** Edition: 3rd Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2018.

SCHUTZ, F.; STEFANOVIC, S.; MAYER, L.; VON AU, A. *et al.* **PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer.** *Oncol Res Treat*, 40, n. 5, p. 294-7, 2017.

SHACKLETON M VF, VAILLANT F, SIMPSON K J. *et al.* **Generation of a functional mammary gland from a single stem cell.** *Nature.* 2006;439(7072):84-8.

SHAK S. **Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer.** Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol.* 1999 Aug;26(4 Suppl 12):71-7.

SHAW JA, UDOKANG K, MOSQUERA JM, CHAUHAN H, JONES JL, WALKER RA. **Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast cancers.** *J Pathol.* 2002;198(4):450-7.

SHEFFIELD BS, KOS Z, ASLEH-ABURAYA K, WANG XQ, LEUNG S, GAO D, *et al.* **Molecular subtype profiling of invasive breast cancer s weakly positive for estrogen receptor.** *Breast Cancer Res Treat.* 2016;155(3):483-90. doi: 10.1007/s10549-016-3689-z.

SHOKER BS, JARVIS C, SIBSON DR, WALKER C, SLOANE JP. **Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancer ous breast.** *J Pathol.* 1999;188(3):237-44.

SIEGEL, R; NAISHADHAM, D; JEMAL, A. **Cancer Statistics**, 2013. CA Cancer J Clin 2013; 63:11-30.

SILVA, J A GOMES. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (2019) **Estimativa 2020: incidência de cancer no Brasil**. INCA, Rio de Janeiro

SILVA, M. M.; SILVA, V. H. **Envelhecimento: importante fator de risco para o cancer** . Arquivos Médicos do ABC, Santo André, v. 30, n. 1, p. 11-18, 2005. Disponível em: <https://www.portalnepas.org.br/amabc/article/view/273>. Acesso em: 27 mai. 2021.

SIMMONS PS. **Diagnostic considerations in breast disorders of children and adolescents**. Obstet Gynecol Clin North Am 1992;19(1):91-102.

SIMON R, MIRLACHER M, SAUTER G. **Tissue Microarrays in cancer diagnosis**. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2003;3(4):421-30.

SIMPSON PT, GALE T, REIS-FILHO JS, JONES C, PARRY S, SLOANE JP, HANBY A, PINDER SE, LEE AH, HUMPHREYS S, ELLIS IO, LAKHANI SR. **Columnar cell lesions of the breast: the missing link in breast cancer progression? A morphological and molecular analysis**. Am J Surg Pathol. 2005 Jun;29(6):734-46. doi: 10.1097/01.pas.0000157295.93914.3b. PMID: 15897740.

SINGHAL, HEMANT *et al.* **Breast Stereotactic Core Biopsy/Fine Needle Aspiration** [Internet]. EMedicine; updated Oct, 2013. Disponível em: [www.emedicine.medscape.com/article/1845123-overview](http://www.emedicine.medscape.com/article/1845123-overview)

SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene**. Science. 1987; 235; 177-82.

SLOANE JP. **National coordinating group for breast screening pathology: consistency of histopathological reporting of breast lesions detected by screening**. Eur J Cancer. 1994;30A:1414-9.

SMID M., WANG Y., ZHANG Y., *et al.* **Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse**. Cancer Res., 68 (2008), pp. 3108-14.

SOLIMAN H, KHALIL F, ANTONIA S. **PD-L1 Expression Is Increased in a Subset of Basal Type Breast Cancer Cells**. PLOS ONE | [www.plosone.org](http://www.plosone.org). 2014/ Volume 9 | Issue 2 | e88557.

SOLIMAN NA, YUSSIF SM. **Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype**. Cancer Biol Med. 2016;13(4):496-504. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066

SOLIMAN, H., KHALIL, F., & ANTONIA, S. (2014). **PD-L1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells**. PLoS ONE, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088557>.

SONI, A., REN, Z., HAMEED, O., *et al.* **Breast cancer subtypes predispose the site of distant metastases**. Am. J. Clin. Pathol., 143 (2015), pp. 471-8.

SOO MS, ROSEN EL, BAKER JA, VO TT, BOYD BA. **Negative predictive value of sonography with mammography in patients with palpable breast lesions.** AJR Am J Roentgenol. 2001 Nov;177(5):1167-70. doi: 10.2214/ajr.177.5.1771167. PMID: 11641195.

SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, *et al.*, **Gene expression patterns of breast cancers distinguish tumor subclasses with clinical implications.** Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98:10869-74.

SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, *et al.* **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(14):8418-23.

SORLIE T, WANG Y, XIAO C, JOHNSEN H, NAUME B, SAMAHA RR, *et al.* **Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms.** BMC Genomics. 2006; 7:127.

SORLIE T. **Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities.** Eur J Cancer. 2004;40(18):2667-75.

SØRLIE T. **The Impact of Gene Expression Patterns in Breast Cancer.** Clin Chem. 2016 Aug;62(8):1150-1. doi: 10.1373/clinchem.2015.253229. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27022070.

SOSA MS, BRAGADO P, AGUIRRE-GHISO JA. **Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field.** Nat Rev Cancer. 2014 Sep;14(9):611-22. doi: 10.1038/nrc3793. Epub 2014 Aug 14. PMID: 25118602; PMCID: PMC4230700.

SOTIRIOU, C., WIRAPATI, P., LOI, S., HARRIS, A., FOX, S., SMEDS, J., NORDGREN, H., FARMER, P., PRAZ, V., HAIBE-KAINS, B. **Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis.** J. Natl. Cancer Inst. 2006; 98, 262-72.

SOUSA B, PAREDES J, MILANEZI F, LOPES N, MARTINS D, DUFLOTH R, VIEIRA D, *et al.* **P-cadherin, vimentin and ck14 for identification of basal-like phenotype in breast cancers: an immunohistochemical study.** Histol Histopathol (2010) 25:963-74.

STANKOVIC B, BJORHOVDE HAK, SKARSHAUG R, AAMODT H, FRAFJORD A, MÜLLER E, HAMMARSTRÖM C, BERAKI K, BÆKKEVOLD ES, WOLDBÆK PR, HELLAND Å, BRUSTUGUN OT, OYNEBRÅTEN I, CORTHAY A. **Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer.** Front Immunol. 2019 Feb 1; 9:3101. doi: 10.3389/fimmu.2018.03101. PMID: 30774636; PMCID: PMC6367276.

STINGL J RA, RAOUF A, EMERMAN J T, EAVES C J. **Epithelial progenitors in the normal human mammary gland.** J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2005;10(1):49-59. [PubMed] [Google Scholar].

STINGL J. **Estrogen and progesterone in normal mammary gland development and in cancer.** Horm Cancer 2011;2(2):85-90

SUN, W.Y., LEE, Y.K., & KOO, J.S. (2016). **Expression of PD-L1 in triple-negative breast cancer based on different immunohistochemical antibodies.** Journal of Translational Medicine, 14.

SUSMAN EJ, HOUTS RM, STEINBERG L, *et al.* **Longitudinal development of secondary sexual characteristics in girls and boys between ages 9 1/2 and 15 1/2 years.** Arch Pediatr Adolesc Med 2010; 16:166-73.

TABÁR L, FAGERBERG G, CHEN HH, *et al.* **Efficacy of breast cancer screening by age: new results from the Swedish Two-County Trial.** Cancer 1995;75(10):2507-17.

TANNER M, GANCBERG D, DILEO A, LARSIMONT D, ROUAS G, PICCART MJ, *et al.* **Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples.** Am J Pathol. 2000;157(5):1467-72.

TANNER M, JARVINEN P, ISOLA J. **Amplification of HER-2/neu and Topoisomerase II in primary and metastatic breast cancer.** Cancer Res. 2001; 61: 5345-8.

TAPE, T. G. **Interpreting Diagnostic Tests: ROC Curves.** University of Nebraska Medical Center. Disponível em: <http://gim.unmc.edu/dxtests/ROC1.htm>. Acesso 12 set. 2017.

TAVASSOLI FA, DEVILEE P. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.** Lyon: WHO/IARC; 2003.

TAVASSOLI FA. **Normal development and anomalies.** In: Tavassoli FA, ed. Pathology of the Breast. 2nd ed. Stamford, CT: Appleton and Lange; 1999:1-25

TIEDE B AND KANG Y. **From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy, and breast cancer.** Cell Res. 2011;21(2):245-57. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

TRIHIA H, MURRAY S, PRICE K, GELBER RD, GOLOUH R, GOLDBIRSCHE A, COATES AS, COLLINS J, CASTIGLIONE-GERTSCH M, GUSTERSON BA. **International Breast Cancer Study Group. Ki67 expression in breast cancer: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker?** Cancer. 2003 Mar 1;97(5):1321-31. doi: 10.1002/cncr.11188. PMID: 12599241.

TRUDEAU M, CHARBONNEAU F, GELMON K *et al.* **Selection of adjuvant chemotherapy for treatment of node-positive breast cancer.** Lancet Oncol 2005; 6:886-98.

TSE, GARY. TAN, PUAY-HOON. **Diagnosing breast lesions by fine needle aspiration or core biopsy: which is better?** Breast Cancer Res treat (2010) 123:1

TURNER NC, REIS-FILHO JS. **Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype.** Oncogene. 2006;25(43):5846-53.

URBAN, LINEI AUGUSTA BROLINI DELLÊ *et al.* **Recomendações do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, da Sociedade Brasileira de Mastologia e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia para rastreamento do cancer de mama por métodos de imagem.** Radiologia Brasileira [online]. 2012, v. 45, n. 6, pp. 334-339. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-39842012000600009>. Acesso em: 16 fev. 2022



VAN KEYMEULEN A, ROCHA A S, OUSSET M. *et al.* **Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 479:189-93.

VANHARANTA S AND J. MASSAGUE J. **Origins of metastatic traits** *Cancer.* *Cell,* 24 (2013), pp. 410-21.

VANT VEER LJ, DAI H, VAN DE VIJVER MJ, HE YD, HART AA, MAO M, *et al.* **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature.* 2002;415(6871):530-6.

VERMEULEN PB, VAN GOLEN KL, DIRIX LY. **Angiogenesis lymphangiogenesis, growth pattern, and tumor emboli in inflammatory breast cancer: a review of the current knowledge.** *Cancer.* 2010;116(11 suppl):2748-54.

VERSCHUUR-MAES AH, DE BRUIN PC, VAN DIEST PJ. **Epigenetic progression of columnar cell lesions of the breast to invasive breast cancer.** *Breast Cancer Research and Treatment.* 2012 Dec;136(3):705-715. DOI: 10.1007/s10549-012-2301-4. PMID: 23104224.

VERSCHUUR-MAES AH, MOELANS CB, DE BRUIN PC, VAN DIEST PJ. **Analysis of gene copy number alterations by multiplex ligation-dependent probe amplification in columnar cell lesions of the breast.** *Cell Oncol (Dordr).* 2014 Apr;37(2):147-54. doi: 10.1007/s13402-014-0170-z. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24692099.

VESELLA RL, PANTEL K, MOHLA S: **Tumor cell dormancy.** An NCI Workshop report. *Cancer Biol Ther* 2007 6:1496–504. Epub 2007 Aug 3.

VIALE G, GIOBBIE-HURDER A, REGAN MM, COATES AS, MASTROPASQUA MG, *et al.* **Breast International Group Trial 1-98. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrineresponsive breast cancer : results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole.** *J Clin Oncol.* 2008 Dec 1;26(34):5569-75. doi: 10.1200/JCO.2008.17.0829. Epub 2008 Nov 3. PMID: 18981464; PMCID: PMC2651094.

VIEIRA DSC, DUFLOTH RM, SCHMITT FCL, ZEFERINO LC. **Cancer de mama: Novos conceitos na classificação.** *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* vol.30 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2008. Print version ISSN 0100-7203 On-line version ISSN 1806-9339.

VIEIRA DSC, WOPEREIS S, WALTER LO, DE OLIVEIRA SILVA L, RIBEIRO AAB, WILKENS RS, FERNANDES BL, REIS ML, GOLFETTO L, SANTOS-SILVA MC. **Analysis of Ki-67 expression in women with breast cancer: Comparative evaluation of two different methodologies by immunophenotyping.** *Pathol Res Pract.* 2022 Feb; 230:153750. doi: 10.1016/j.prp.2021.153750. Epub 2021 Dec 23. PMID: 34971844. (2)

VIEIRA, D. S. C., DUFLOTH, R. M., WALTER, L. O., MORAES, A. C. R. DE, SILVA JR, J. P. DA, SCHMITT, F. C. D. L., & SANTOS-SILVA, M. C. (2021). **Clinical and morphological factors associated with two groups of concordant breast cancer immunophenotypes: a cross-sectional study of 24-year historical series.** *International Journal for Innovation Education and Research,* 9(10), 197–213. <https://doi.org/10.31686/ijer.vol9.iss10.3438> (1).

VINAGRE RD, DINIZ EM, Vaz FA. **Leite humano: um pouco de sua história.** *Pediatria (São Paulo)* 2001; 23(4):340-5.

VOGEL CL, COBLEIGH MA, TRIPATHY D, GUTHEIL JC, HARRIS LN, FEHRENBACHER L, SLAMON DJ, MURPHY M, NOVOTNY WF, BURCHMORE M, SHAK S, STEWART SJ, PRESS M. **Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2- overexpressing metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2002; 20: 719-26.

VUONG D, SIMPSON PT, GREEN B *et al.* **Molecular classification of breast cancer.** *Virchows arch.* 2014 Jul;465(1):1-14

WALKER GV, SMITH GL, PERKINS GH, OH JL, WOODWARD W, YU TK, HUNT KK, HOFFMAN K, STROM EA, BUCHHOLZ TA. **Population-based analysis of occult primary breast cancer with axillary lymph node metastasis.** *Cancer.* 2010 Sep 1;116(17):4000-6. doi: 10.1002/cncr.25197. PMID: 20564117; PMCID: PMC4329781.

WANG M, HE X, CHANG Y, SUN G, THABANE L. **A sensitivity and specificity comparison of fine needle aspiration cytology and core needle biopsy in evaluation of suspicious breast lesions: A systematic review and meta-analysis.** *Breast.* 2017 Feb; 31:157-66. doi: 10.1016/j.breast.2016.11.009. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27866091.

WANG SH, LIN SY. **Dormência tumoral: potencial alvo terapêutico na recidiva do tumor e prevenção de metástases.** *Exp Hematol Oncol.* 2013; 2:29.

WEIGELT B, GEYER FC, REIS-FILHO JS (2010) **Histological types of breast cancer: how special are they?** *Mol Oncol* 4:192–208

WELLINGS SR, JENSEN HM, MARCUM RG. **An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions.** *J Natl Cancer Inst.* 1975;55(2):231-73.

WHO Classification of Tumors Editorial Board. **Breast Cancer Lyon (France):** International Agency for Research on Cancer; 2019.

WIEDSWANG G, BORGES E, KARESEN R, QVIST H, JANBU J, KVALHEIM G, *et al.* **Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2003; 21:3469–78.

WILLEMS SM, VAN DEURZEN CH, VAN DIEST PJ. **Diagnosis of breast lesions: fine-needle aspiration cytology or core needle biopsy? A review.** *J Clin Pathol.* 2012 Apr;65(4):287-92. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200410. Epub 2011 Oct 29. PMID: 22039282.

WILLIAMS C, BRUNSKILL S, ALTMAN D, *et al.* **Cost-effectiveness of using prognostic information to select women with breast cancer for adjuvant systemic therapy.** *Health Technology assessment* 2006; 10(34).

WISEMAN B S AND WERB Z. **Stromal effects on mammary gland development and breast cancer.** *Sci Total Environ.* 2002;296(5570):1046-49. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].

WOLFF AC, HAMMOND MEH, ALLISON KH, *et al.* **Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline focused update.** *Journal of Clinical Oncology* 36, no. 20 (July 10, 2018) 2105-22. DOI: 10.1200/JCO.2018.77.8738

WORLD CANCER RESEARCH FUND; AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Diet, nutrition, physical activity and breast cancer 2017. London: WCRF, 2018. (Continuous update project).** Disponível em: <https://www.wcrf.org/wp-content/uploads/2021/02/Breast-cancer-report.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics. Breast cancer: prevention and control. Geneva: WHO, 2020.** Disponível em: <https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. Acesso em: 13 mai. 2020.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Breast Cancer.** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em 05 mar. 2022.

WU P, WU D, LI L, CHAI Y, HUANG J. **PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis.** *PloS one.* 2015;10: e0131403.

YAMAUCHI H, STEARNS V, HAYES DF. **When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2001; 19: 2334-56.

YAO N, SONG Z, WANG X, YANG S, SONG H. **Prognostic impact of progesterone receptor status in chenise estrogen receptor positive invasive breast cancer patients.** *Journal of breast cancer.* 2017 june; 20(2): 160-9.

YARDLEY, D.A. **Visceral disease in patients with metastatic breast cancer: efficacy and safety of treatment with ixabepilone and other chemotherapeutic agents** *Clin. Breast Cancer*, 10 (2010), pp. 64-73

YERUSHALMI R, WOODS R, RAVDIN PM, HAYES MM, GELMON KA. **Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential.** *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):174-83. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70262-1.

YUAN CD, STEELE L, WARDEN C, WCLIZYNSKI S, MORTIMER J, *et al.* **Molecular subtypes of triple-negative breast cancer in women of different race and ethnicity.** *Oncotarget.* 2019 Jan 4; 10(2): 198-208. 4. doi: 10.18632/oncotarget.26559.

ZHANG L, RIETHDORF S, WU G, *et al.* **Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer.** *Clin. Cancer Res.*, 18 (2012), pp. 5701-10.

ZHOU L, JIANG Y, YAN T, DI G, SHEN Z, SHAO Z, LU J. **The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures.** *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Aug;122(3):795-801. doi: 10.1007/s10549-010-0999-4. Epub 2010 Jun 23. PMID: 20571867.



**APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Análises Clínicas  
Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil  
Tel: (48) 3721 8146

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) –**

**TÍTULO DA PESQUISA:** “**Importância dos Biomarcadores RE, RP, HER2, Ki67, CK19, CK7/8, CD8 CTLA-4, PD1 e PD-L1 para o Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação do Risco de Metástase em Pacientes com Carcinoma de Mama**”; que faz parte da pesquisa: Investigação de Novos Alvos Imunofenotípicos Aplicados ao Diagnóstico e ao Prognóstico de Neoplasias Hematológicas e Não Hematológicas

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem-informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas nos itens IV. 3 da Resolução CNS nº466/12.

**QUAL OBJETIVO DESTE ESTUDO?** O estudo acima refere-se a uma pesquisa que visa investigar novos marcadores que sirvam como alvos para o diagnóstico e para o prognóstico de neoplasias não hematológicas (carcinoma de mama). Após a coleta do material biológico e realização dos exames laboratoriais solicitados pelo médico do senhor(a), a amostra biológica restante será encaminhada para a pesquisa. Dessa forma, seus exames não serão alterados ou prejudicados pela realização da pesquisa.

**EU TENHO QUE PARTICIPAR?** Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

**EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?** Não, pois não haverá duas coletas, aproveitaremos o mesmo material biológico colhido para os exames laboratoriais, dessa forma não há nenhum desconforto adicional. Entretanto, existe um pequeno risco de que o senhor(a) possa sentir algum mal-estar durante ou logo após a coleta, porém, caso o senhor (a) sinta algo estará bem assistido pelos funcionários do setor de coleta.

**QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE?** Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.

**TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR? TENHO DIREITO A RESSARCIMENTO?** Não, por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e não terá direito a nenhuma remuneração ou ressarcimento. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque a participação do(a) senhor(a) será apenas com a doação da amostra biológica colhida para a realização dos exames laboratoriais.

**EU POSSUO ALGUM DIREITO À INDENIZAÇÃO?** Caso o senhor(a) tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada em juízo.

**MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?** Informamos que não haverá nenhuma avaliação física ou entrevistas efetuadas pelos pesquisadores, sendo assim, os dados do seu prontuário serão consultados e essas informações serão mantidas sob sigilo absoluto e privado. Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para manutenção do sigilo, no entanto, existe a remota possibilidade da quebra do sigilo involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão e as informações divulgadas no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação, pelos contatos informados no final deste documento.

**COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?** Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

**Coordenadora do Projeto:**

Professora: Maria Cláudia Santos da Silva  
Fone: (048) 3721-8146  
Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias  
E-mail: maria.claudia.silva@ufsc.br

**Pesquisadores:**

Aluna: Daniella Serafin Couto Vieira  
Fone: (048) 3721-9142  
Serviço de Anatomia Patológica, SAP HU UFSC  
E-mail: daniellavicira.hu@gmail.com

**Comitê de Ética em Pesquisa (local):**

Eu, \_\_\_\_\_ confirmo que:

1. Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;
2. Tive a oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo;
5. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
6. Concordo em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante Nome do participante

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

Pesquisa: Daniella Serafin Couto Vieira

Telefone contato:	Data:	Prontuário	Número SAP	Protocolo LOHE	Número

Nome	Idade	Data de nascimento	Grupo étnico
Gestação:			
Nódulo: <b>sim</b> ( <input type="checkbox"/> ) <b>não</b> ( <input type="checkbox"/> )			
Tempo de evolução em meses:			
Microcalcificação: <b>sim</b> ( <input type="checkbox"/> ) <b>não</b> ( <input type="checkbox"/> )			
Bíradis USG:			
Bíradis Mamografia:			
História familiar: <b>sim</b> ( <input type="checkbox"/> ) <b>não</b> ( <input type="checkbox"/> ) <b>Irmã mãe avó tia</b>			

Tamanho do nódulo:	Localização:	Lateralidade:	Palpável:	Axila positiva:
			<b>sim</b> ( <input type="checkbox"/> ) <b>não</b> ( <input type="checkbox"/> )	<b>sim</b> ( <input type="checkbox"/> ) <b>não</b> ( <input type="checkbox"/> )

<b>Diagnóstico:</b>
---------------------

<b>Clinico</b>
----------------

T	N	M
---	---	---

<b>Patológico</b>
-------------------

T	N	M
---	---	---

**Imunistoquímica**

RE	RP	HER2	KI67		
CK19	CK7	PDL1	PD1	CTLA4	CD8

**Citometria de fluxo sangue**

CD8	CD56	CD5	CD19/GD	CD3	CD38
CD20/CD4	CD45	PD1	CTLA4	CD4	CK19
PDL1	CK7/8				

**+** **Citometria de fluxo TECIDO**

PD1	CD4	CTLA4	CK7/8	CD8	
CD3	CD45	CK19	PDL1	CD56	CD16
CD14					





## APÊNDICE C - TÉCNICA PARA REALIZAÇÃO DE CITOMETRIA DE FLUXO NO SANGUE E TECIDO

Técnica para realização de citometria de fluxo no sangue e tecido:

PREPARO DE AMOSTRAS DE MAMA: MATERIAIS E REAGENTES:

- Placa de Petri
- Bisturi
- Pinça
- Bastão de vidro
- Filtro
- 2 tubos de citômetro
- PBS

ETAPAS:

- Cortar a amostra com bisturi numa placa de Petri
- Transferir a amostra para um tubo de citômetro, adicionar PBS de acordo com a quantidade de tubos a serem marcados – 100 microlitros por tubo e 100 microlitros a mais como margem de erro. – Exemplo 4 tubos 400 microlitros + 100 microlitros. Macerar com o bastão de vidro
- Em um tubo novo, filtrar a suspensão obtida, deve ajudar a retirada da amostra com a ponteira e devolver a biópsia para o primeiro tubo.
- Prosseguir a marcação de anticorpos (membrana ou intracito)

MARCAÇÃO DE ANTICORPOS DA MEMBRANA

- No tubo 1 e tubo 2 tubo, adicionar 100 microlitros de sangue
- Adicionar os anticorpos de membrana
- Homogeneizar em vortex
- Incubar por 15 minutos na ausência de luz
- Adicionar 2 ml de lisante (no sangue) e se for biópsia, 1 ml.
- Incubar por 15 minutos na ausência da luz
- Centrifugar por 5 minutos a 1500rpm
- Retirar o sobrenadante
- Retirar o lisante com seringa aspirando todo o líquido.
- Suspender em 200 microlitros de PBS (vortex) para as biópsias e 400 microlitros de PBS (vortex) para amostra de sangue
- Proceder com a aquisição no citômetro

MARCAÇÃO DE ANTICORPOS INTRACITOPLASMATICOS

- Em 1 tubo, adicionar 100 microlitros de amostra
- Adicionar os anticorpos de membrana
- Homogeneizar em vortex
- Incubar por 15 minutos na ausência de luz
- Adicionar 100 microlitros do reagente A (fixação)
- Incubar por 15 minutos na ausência da luz
- Adicionar 4 ml de PBS
- Centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm
- Retirar o sobrenadante

- Ressuspender o pellet em vortex VIGOROSAMENTE
- Adicionar 100 microlitros de Reagente B (forma os poros)
- Adicionar os anticorpos intracito
- Homogeneizar em vortex em baixa rotação
- Incubar 15 minutos na ausência da luz
- Adicionar 4 ml de PBS
- Centrifugar por 5 minutos a 15000rpm
- Retirar o sobrenadante
- Ressuspender em 200 microlitros de PBS (vortex) para as biópsias e 400 microlitros de PBS (vortex) para amostra de sangue
- Aquisição em citômetro

### METODOLOGIA “BULK LYSIS” – SANGUE PARA TUBO 3: MÉTODO DOENÇA RESIDUAL MÍNIMA (DRM)

- Em um tubo Falcon de 50mL, colocar a solução lisante (geladeira) e água destilada, conforme tabela abaixo:  
Tabela de diluição do lisante Excellyse Live (Exbio) ou PharmLyse (BD) (1:10) 45 ml  
Volume de água destilada (ml) 5 ml Volume de lisante concentrado (ml)
- Adicionar ao tubo Falcon com solução lisante diluída o volume 2 ml de sangue.
- Lavar bem a pipeta Pasteur, ou ponteira, e tubo (caso não sobre mais amostra), a fim de coletar todas as células.
- Homogeneizar por 15 minutos em agitador automático;
- Centrifugar por 10 minutos a 2300 rpm (Utilizar o programa 11);
- Retirar o sobrenadante com pipeta Pasteur. Deixar cerca de 300 uL de suspensão (com o pellet de leucócitos) no tubo;
- Adicionar 2 ml de PBS BSA 0,2% com uma pipeta Pasteur bem devagar, aspirando e soltando o volume, para ressuspender a amostra desfazendo os grumos de células;
- Completar o volume com PBS BSA 0,2% e homogeneizar por inversão;
- Centrifugar por 5 minutos a 2300 rpm (Utilizar o programa 11, parar quando der 5 minutos);
- Retirar o sobrenadante, com pipeta Pasteur;
- Adicionar 2 ml de PBS BSA 0,2% com uma pipeta Pasteur bem devagar, aspirando e soltando o volume, para ressuspender a amostra desfazendo os grumos de células;
- Transferir o volume para um tubo de 5mL (tubo de citômetro);
- Lavar o tubo Falcon de 50 ml original com mais 2 ml de PBS BSA 0,2% a fim de coletar as células que permaneceram (passar no vortex para coletar as células da parede do tubo Falcon) e adicionar esse volume ao mesmo tubo de 5mL;
- Homogeneizar por inversão e centrifugar por 5 minutos a 2000 rpm;
- Retirar o sobrenadante e acrescentar o volume de PBS necessário para a quantidade de tubos da marcação (100uL de amostra por tubo) e mais um volume reserva para futuras análises (por segurança) (50uL);
- No tubo de marcação da DRM, AMOSTRA DE SANGUE, pipetar 100uL de amostra, adicionar os anticorpos monoclonais e prosseguir a técnica de marcação (membrana ou citoplasmática).

- Quando há mais tubos de DRM, em um dos tubos adicionar todo o volume de amostra necessário para a marcação (ex: 200uL) e adicionar os anticorpos comuns (backbones).
- Distribuir 100 uL de amostra marcada com os anticorpos comuns para os outros tubos e prosseguir a técnica de marcação (membrana ou citoplasmática).
- No tubo 3, bulk lises e depois faz as marcações de membrana e intracito
- Tubo célula 4: 10 microlitros de sangue+ 90 microlitros de PBS + Lisante

#### MARCAÇÃO DE ANTICORPOS DO MEMBRANA

- No tubo 1 e tubo 2 tubo, adicionar 100 microlitros de sangue
- Adicionar os anticorpos de membrana
- Homogeneizar em vortex
- Incubar por 15 minutos na ausência de luz
- Adicionar 2 ml de lisante (no sangue) e se for biópsia, 1 ml.
- Incubar por 15 minutos na ausência da luz
- Centrifugar por 5 minutos a 1500rpm
- Retirar o sobrenadante
- Retirar o lisante com seringa aspirando todo o líquido.
- Suspende em 200 microlitros de PBS (vortex) para as biópsias e 400 microlitros de PBS (vortex) para amostra de sangue
- Proceder com a aquisição no citômetro

#### MARCAÇÃO DE ANTICORPOS INTRACITOPLASMATICOS

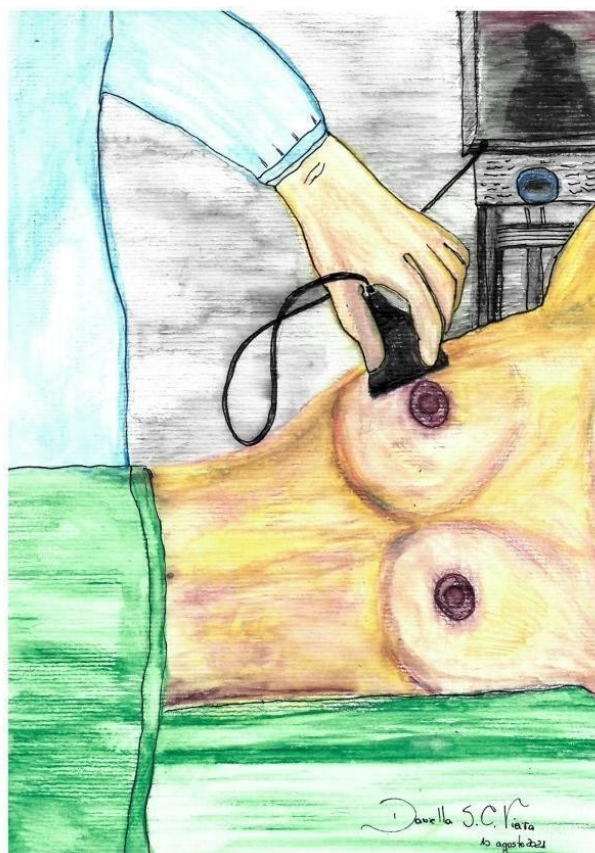
- Em 1 tubo, adicionar 100 microlitros de amostra
- Adicionar os anticorpos de membrana
- Homogeneizar em vortex
- Incubar por 15 minutos na ausência de luz
- Adicionar 100 microlitros do reagente A (fixação)
- Incubar por 15 minutos na ausência da luz
- Adicionar 4 ml de PBS
- Centrifugar por 5 minutos a 1500 rpm
- Retirar o sobrenadante
- Ressuspender o pellet em vortex VIGOROSAMENTE
- Adicionar 100 microlitros de Reagente B (forma os poros)
- Adicionar os anticorpos intracito
- Homogeneizar em vortex em baixa rotação
- Incubar 15 minutos na ausência da luz
- Adicionar 4 ml de PBS
- Centrifugar por 5 minutos a 15000rpm
- Retirar o sobrenadante
- Ressuspender em 200 microlitros de PBS (vortex) para as biópsias e 400 microlitros de PBS (vortex) para amostra de sangue
- Aquisição em citômetro



## APÊNDICE D - DESCRIÇÃO DO MÉTODO DE COLETA DE AMOSTRAS HUMANAS

Par coletar a core biópsia guiada por USG, coloca-se a paciente em decubito dorsal com os membros superiores elevados para tras (Figura 45). Inicia-se a inspeção das mamas seguida da palpação localizar o nódulo. Após identificar o nódulo com o transdutor do US (Figura 45), verificam-se as medidas, a localização, a densidade mamográfica e os contornos do nódulo. Em seguida avalia-se com o transdutor a axila, se presença ou não de linfonodos suspeitos.

Figura – 4.1 – Posicionamento da paciente durante o exame de US de mama.



A Figura 4.1 mostra o posicionamento da paciente em decubito dorsal, com braços elevados e o posicionamento do transdutor do US para identificação do nódulo suspeito. Fonte: o Autor: Aquarela sobre papel cansom, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>.

Após marcar a pele e assepsia, executa-se a anestesia seguida de uma pequenaincisao cutânea com o bisturi. No local da incisão insere-se a agulha de biópsia seguindo o trajeto já realizado na anestesia (Figura 4.2). Orienta-se a agulha paralelamente ao nódulo

(Figura 4.3 Painel A). Retiram-se três fragmentos para o exame anátomo patológico de rotina e na sequência dois fragmentos para a investigação na pesquisa.

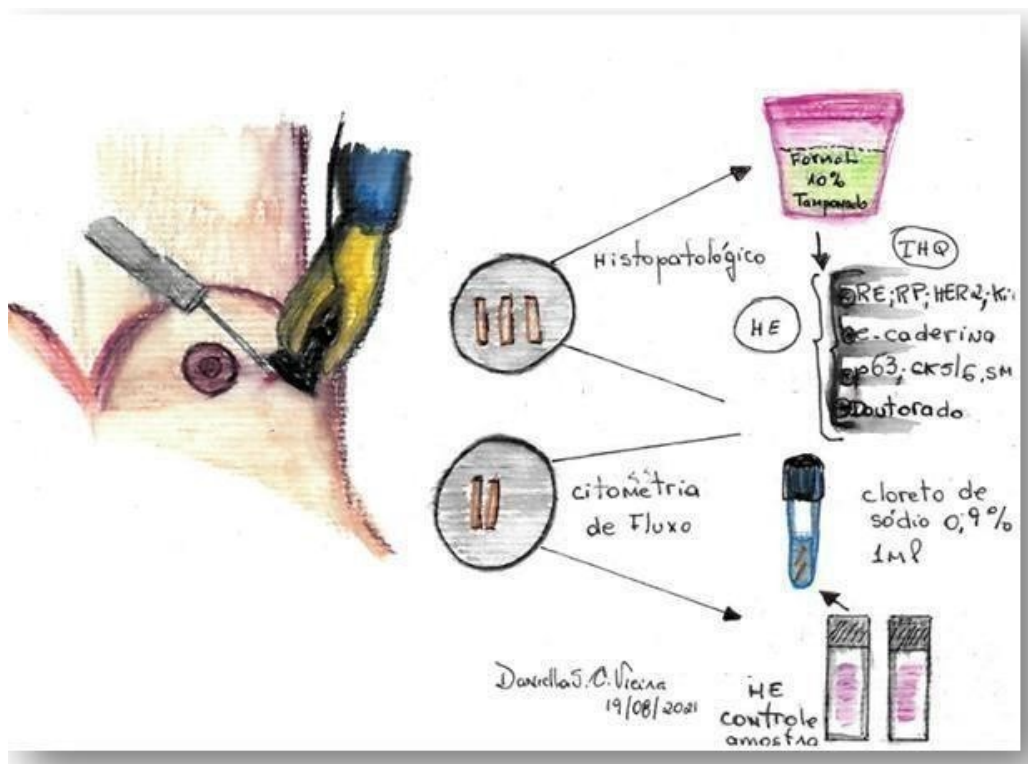
Figura – 4.2 Posicionamento da agulha de coleta de core biópsia em relação ao nódulo.



A imagem mostra o posicionamento da agulha em relação ao nódulo suspeito. Fonte: o Autor:  
Aquarela sobre papel canson, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>.

Imediatamente após a seleção da amostra para o exame anátomo patológico, inicia-se a seleção de amostra para o CF. Conforme exemplificado na Figura 38 que representa o esquema da metodologia desenvolvida para amostras de mama para citometria de fluxo.

Figura – 4.3 Desenho representa posicionamento e distribuição das amostras teciduais para as análises.



No Pannel A mostra o posicionamento da paciente em decubito dorsal, o posicionamento do transdutor do US e da agulha para coleta da amostra. No B observa-se a distribuição dos fragmentos de core de mama e a relação com os exames histológico e Citometria de fluxo. Fonte: o Autor: Aquarela sobre papel canson, 21x29,7 cm, 300g/m<sup>2</sup>.

#### Processamento do tecido para CF

As amostras de tecido mamário em 1 ml de soro fisiológico a 0.9%, imerso em caixa refrigerada, foram processadas em no máximo 2 horas aps a coleta.

Antes da marcação, a amostra foi desagregada para obtenção de suspensões celulares, conforme metodologia padronizada no item 5.2.7

Apos a maceração e preparo dos “tubo célula” (TC), “tubo 1 biópsia” (T1B), “tubo 2 biópsia” (T2B).

Prosseguiu-se a marcação dos anticorpos de membrana e intracito, conforme descrito na Tabela 18 e no item APÊNDICE C.

As amostras de tecido e sangue foram incubadas com os anticorpos monoclonais específicos, descritos na Tabelas 18 e 19, e a metodologia seguiu as orientações expressas no Apêndice C. Todas os tempos foram controlados conforme Figura 56.

Figura 4.4 – Controle do período de incubação.



Mostra o controle de tempo dos períodos de incubação, de forma simultânea.

#### AMOSTRA DE SANGUE PERIFERICO PARA CF

Após a coleta da amostra tecidual, foram coletados dos 2 tubos K2 EDTA “BD vacutainer® com 4 ml de sangue periferico em cada.

#### PROCESSAMENTO DO TECIDO PARA EXAME ANÁTOMO PATOLOGICO

As amostras teciduais encaminhadas ao estudo anatomopatológico foram preparadas de acordo com os procedimento da ULAP/HU/EBSERH/UFSC. Após o registro da amostra e conferência de informações clinicas, as amostras foram encaminhadas para exame macroscópico, para descrição do número de fragmentos, da forma e dimensões em cm, a cor e consistência (Figura 48 A e B). Os fragmentos são dispostos paralelamente em cassetes identificados pelo número de registro do caso e enviados para o processador de tecidos (Figura 48 C).



Figura 4.5 – Procedimentos na sala de macroscopia.



Observam-se as etapas do exame de macroscopia para o preparo fragmento da biópsia de mama.  
Fonte: o Autor.

As biópsias de mama foram processadas em processador de tecidos automatizado Excelsior AS (marca Thermo Scientific) Figura 4.6, passando pelos estágios de desidratação, clarificação e impregnação em parafina a 60°C. Conforme recomendação do fabricante (<https://assets.thermofisher.com>) e especificação de procedimento da ULAP/HU/EBSERH/UFSC.

Figura 4.6 –Processador de tecidos com funções específicas.

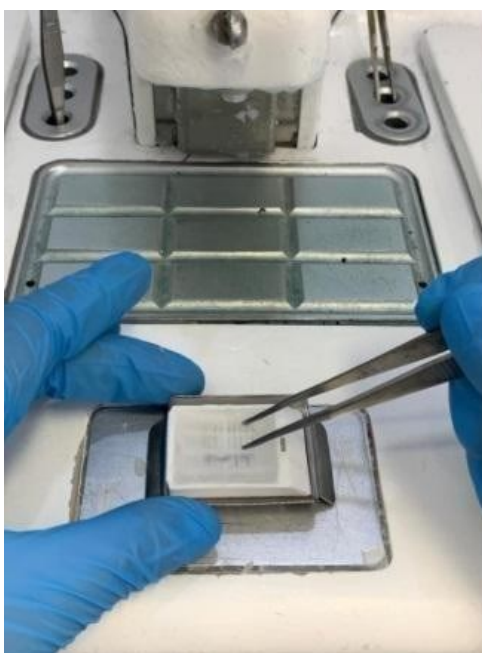


Configurações do aparelho utilizado na ULAP, as funções para iniciar os programas e lavagens e a avaliação do estado dos reagentes e dos filtros. Fonte: o Autor.

Após o processamento dos tecidos, os cassetes são acondicionados na central de inclusão CI2014 (marca LupeTec) e a metodologia segue o manual de instruções do fornecedor <https://lupetec.com.br/>.

Com o auxílio de uma pinça previamente aquecida, os tecidos são posicionados em parafina, no interior de um molde com parafina líquida com a superfície a ser seccionada para baixo. Após o resfriamento da parafina, os blocos de parafina com o material incluído são numerados (Figura 4.7).

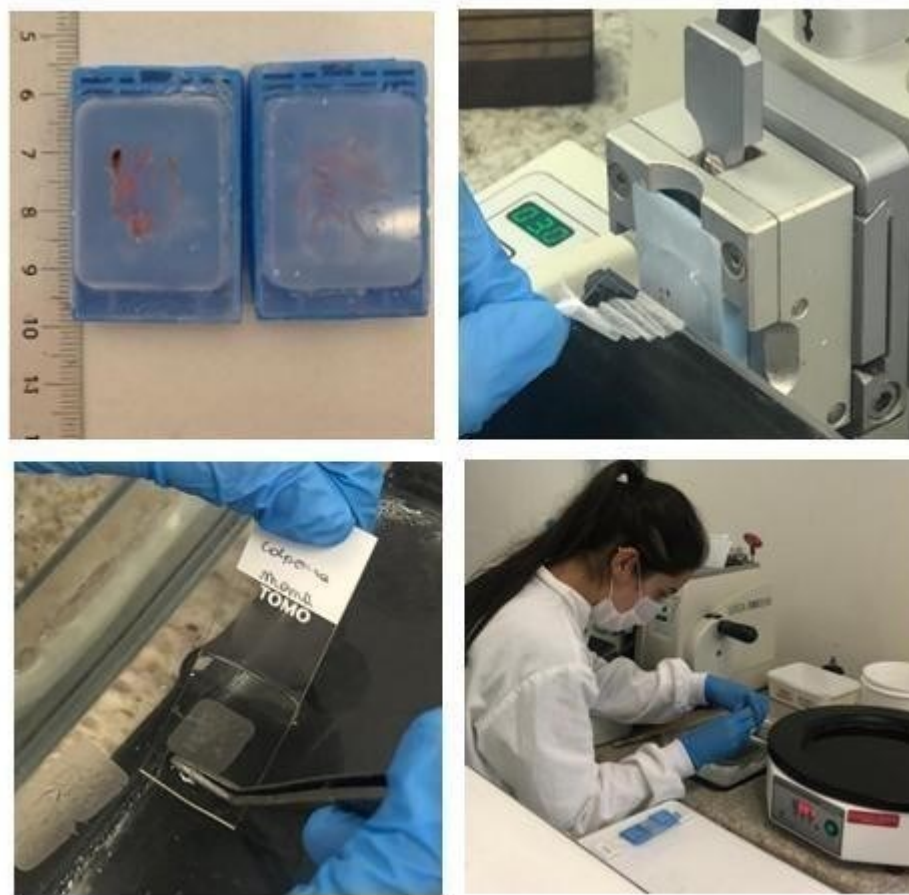
Figura 4.7 – Finalização da inclusão em bloco de parafina com cassete.



Processo final da produção do bloco de parafina com amostra de mama, no detalhe a colocação do número. Fonte: o Autor.

Com o bloco numerado e pronto, (Figura 4.8 Painel A) as amostras de mama são posicionadas no micrótomo semiautomático (LEICA RM 2245) seccionadas com espessura de  $3\mu\text{m}$ , como uma fita (Figura 4.8 Painel B), e dispostas em banho frio para selecionar o melhor corte (Figura 4.8 Painel C). No banho frio realiza-se a “pesca” da amostra em lâmina de vidro. Em seguida passa para um banho-maria quente (pré-aquecido a  $60^{\circ}\text{C}$ ) (veja seta na Figura 4.8 Painel D) para que o tecido ou células dilatem na lâmina permitindo uma melhor visualização da amostra nas etapas seguintes. Após a identificação da lâmina com os dados do respectivo cassete, a lâmina é colocada em estufa para desparafinar e a temperatura para o derretimento da parafina é entre  $70^{\circ}\text{C}$  a  $80^{\circ}\text{C}$ .

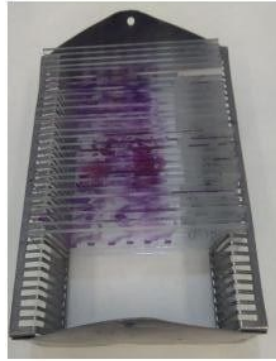
Figura 4.8 – Etapas do corte histológico.



Processo de produção do corte histológico das amostras de mama, no detalhe (C) a escolha do melhor corte para preparo da lâmina. Fonte: o Autor.

Após no mínimo 30 minutos de desparafinação das lâminas na estufa (tempo necessário para que o material fixe no vidro), as lâminas são colocadas em cesta de inox (Figura 4.9) e seguem o processo de coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) e montagem, conforme POP.ULAP – TEC.005.2020 – página 3/13. Disponível em POP.ULAP.TEC.005.2020 - COLORAÇÃO E MONTAGEM.pdf, acesso 31/08/2021.

Figura 4.9 -Cesta de inox para coloração manual em HE.



Lâminas histológicas dispostas paralelamente nos intervalos da cesta de inox pós coloração em HE.

Fonte: o Autor.

Figura 4.10 – Bandeja com sequência de lâminas coradas em HE



Sequência de casos em ordem cronológica para análise das características morfológicas em HE.

### PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO (IHQ)

Os exames de Imuno-histoquímica foram feitos através do método semi-automatizado utilizando o equipamento VENTANA - modelo Benchmark XT (Figura 4.11) seguindo as orientações do POP.ULAP.TEC.0010.1.2020 - IMUNOISTOQUÍMICA SEMI-AUTOMATIZADA (VENTANA BENCHMARK XT).pdf e descritas no APÊNDICE E, e os anticorpos estudados foram utilizados conforme Tabela 20.

Para as 62 amostras foram realizadas reações para os anticorpos CK POOL, CK19, CD8, CD4, CD45, PD-L1, PD1 e CTLA4, com 3 micra de espessura, em lâminas silanizadas.

Em todos os 47 casos malignos foram avaliados os biomarcadores RE, RP, HER2 e Ki67 na rotina diagnóstica e os resultados foram incluídos na investigação, conforme descrito

nos objetivos. Para além, todos os casos malignos com suspeita de carcinoma lobular ou fenótipo sugestivo de carcinoma lobular foram realizados e-caderina.

Controles externos positivos foram usados em todas as reações de todos os casos.

Figura 4.11- Equipamento VENTANA - modelo Benchmark XT



Equipamento VENTANA - modelo Benchmark XT, para realização de imuno-histoquímica semiautomatizada.  
Fonte: o Autor.

As lâminas em HE e as do estudo IHQ foram analisadas pela pesquisadora em microscópio Optacm (O500R) com aumento de 40X e 100X para as os cortes corados em HE e imunorreações de RE, RP, CK POOL, CK19, CD8, CD4, CD45, e aumento de 100X e 200X para a avaliação das imunorreações do HER2, KI67, PD-L1, PD1 e CTLA4, com marcações das variáveis de interesse seguiram recomendação do AJCC 2018, WHO 2019 e fabricantes específicos de cada anticorpo, APÊNDICE F.

Todos os dados foram transcritos e armazenados em um arquivo com a pesquisadora principal e as variáveis numéricas foram transcritas em tabela Excel ®.



## APÊNDICE E - PAINEL DE ANTICORPOS PARA EXAME POR CITOMETRIA DE FLUXO

Painel de anticorpos estudados nos tubos sangue e tecido (8º revisão, janeiro 2021).

- Fazer: **7AAD + CD54**, para verificar viabilidade celular antes de rodar os tubos. Fazer “**FMO**” nos tubos “**FITC**” e “**PE**”,
- 7AAD é um ligante do DNA, entra na célula rompida, ligando no DNA das células mortas, marcando células lisadas

Sangue	FITC	PE	PERCP PC5.5	PC7	APC	APCH7	PB	PO V500
<b>Tubo 1</b>	CD8 3 µl  Belkman Coulter	CD56 5µl  Belkman Coulter	CD5 2 µl  Belkman Coulter	CD19/GD 1 µl Belkman Coulter 2 µl ExBio	CD3 5 µl  Belkman Coulter	CD38 2 µl  BD	CD20/CD4 3 µl Belkman Coulter 1 µl Clone RPA-T4 BD biosciences	CD45 1 µl  Clone Hi30 BD biosciences
<b>Tubo 2</b>	CD8 3 µl  Belkman Coulter	PD1 (CD279) 3 µl  Clone EH 12.2H7 Biolegend	X	CTLA4 (CD152) 5 µl  Clone LD 3 D10 Biolegend	CD3 5 µl  Belkman Coulter	CD 14	CD4 1 µl  Clone RPA-T4 BD biosciences	CD45 1 µl  Clone Hi30 BD biosciences
<b>Tubo 3 Bulki Lysis</b>	CK19 2,5 µl  Clone A53 B/A2 Invitrogen		X	X	PAN CK 0,5 µl  Clone Can 5.2 BD Pharmingen			CD45 1 µl  Clone Hi30 BD biosciences

Tecido	FITC	PE	PERC P	PC7	APC	APCH7	PB	PO
<b>Tubo 1</b>	CD16	PD1 (CD279) 3 µl  Clone EH 12.2H7 Biolegend		CTLA4 5 µl  Clone LD 3 D10 Biolegend	CD3 5 µl  Belkman Coulter	CD8 2 µl  Clone SK1 BD biosciences	CD4 1 µl  Clone RPA- T4 BD biosciences	CD45 1 µl  Clone Hi30 BD biosciences
<b>Tubo 2</b>	CK19 5 µl  Clone A53 B/A2 Invitrogen	PDL-1 (CD274) 20 µl  Clone MiH1 BD Pharmingen		CTLA4 5 µl  Clone LD 3 D10 Biolegend	PAN CK 0,5 µl  Clone Can 5.2 BD Pharmingen	X	CD3	CD45 1 µl  Clone Hi30 BD biosciences





## APÊNDICE F – INFORMAÇÕES DE PADRONIZAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA  
LABORATÓRIO DE IMUNOISTOQUÍMICA

### RE

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	6F11
Fabricante	Leica
Controle utilizado	Mama
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC2 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 120 minutos a temperatura ambiente; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:50.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:50.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

Anticorpo\_(2)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA  
LABORATÓRIO DE IMUNOISTOQUÍMICA

### RP

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	Y85
Fabricante	Cell Marque
Controle utilizado	Mama
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 120 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:50.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:50.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável patologista (Nome/assinatura)	

Anticorpo\_(1)  
 UNIVESIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
 HOSPITAL UNIVERSITARIO  
 UNIDADE DE LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLOGICA  
 LABORATORIO DE IMUNOISTOQUIMICA

**CERB**

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	Policlonal
Fabricante	Dako
Controle utilizado	Carcinoma de Mama
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 96 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:500.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:500.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

UNIVESIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
 HOSPITAL UNIVERSITARIO  
 UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA  
 LABORATORIO DE IMUNOISTOQUIMICA

**KI67**

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	SP6
Fabricante	SPRING
Controle utilizado	Tonsila
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 120 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:200.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:200.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO	
UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA	
LABORATÓRIO DE IMUNOISTOQUÍMICA	
<b>CKPOOL</b>	
INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	AE1&AE3
Fabricante	CELL MARQUE
Controle utilizado	PELE
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 32 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:300.
AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:500.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO	
UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA	
LABORATÓRIO DE IMUNOISTOQUÍMICA	
<b>CD4</b>	
INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	EP204
Fabricante	CELL MARQUE
Controle utilizado	TONSILA
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 92 minutos a 37°C com amplificador; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal</i>
Diluições testadas	1:100.
AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:100.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA  
LABORATÓRIO DE IMUNOISTOQUÍMICA

**CD8**

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	SP16
Fabricante	CELL MARQUE
Controle utilizado	TONSILA
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 120 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:300.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:300.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
UNIDADE DE LABORATÓRIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA  
LABORATÓRIO DE IMUNOISTOQUÍMICA

**CD45 LCA**

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	2B11 & PD7/26
Fabricante	CELL MARQUE
Controle utilizado	TONSILA
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 60 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:500.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:500.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

Anticorpo\_(1)  
 UNIVESIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
 UNIDADE DE LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLOGICA  
 LABORATORIO DE IMUNOISTOQUIMICA

**PD1**

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	NAT105
Fabricante	Cell Marque
Controle utilizado	Tonsila
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 120 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>Ultra View universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:25 e 1:10.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:10.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

Anticorpo\_(1)  
 UNIVESIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
 UNIDADE DE LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLOGICA  
 LABORATORIO DE IMUNOISTOQUIMICA

**PDL1**

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	ZR3
Fabricante	Cell Marque
Controle utilizado	Tonsila
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 60 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>Ultra View universal DAB detection kit</i> , amplificação de reação.
Diluições testadas	1:50 e 1:25.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:25.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	

Anticorpo\_(1)  
 UNIVESIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
 UNIDADE DE LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLOGICA  
 LABORATORIO DE IMUNOISTOQUIMICA

**CTLA4**

INFORMAÇÕES PADRONIZAÇÃO	
Clone	IHC004
Fabricante	GenomeMe
Controle utilizado	Tonsila
Protocolo	Automatizado no Sistema Ventana em modo de titulação de anticorpo: reativação em tampão CC1 <i>standard</i> (60 minutos de reativação); incubação do anticorpo por 60 minutos a 37°C; kit de anticorpo secundário e reação de revelação <i>UltraView universal DAB detection kit</i> .
Diluições testadas	1:50 e 1:100.

AVALIAÇÃO PADRONIZAÇÃO	
Diluição aprovada	1:50.
Responsável (área técnica) (Nome/assinatura)	
Responsável (patologista) (Nome/assinatura)	