



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Carolina Pohlmann Becker

**Associações entre linfócitos infiltrantes tumorais e o perfil clínico-patológico de
mulheres com câncer de mama: um estudo transversal.**

Araranguá

2024

Carolina Pohlmann Becker

Associações entre linfócitos infiltrantes tumorais e o perfil clínico-patológico de mulheres com câncer de mama: um estudo transversal.

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Graduação em Medicina do Centro de Ciências, Tecnologias e Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, campus Araranguá, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof. Gregório Wrublewski Pereira.

Araranguá

2024

Pohlman Becker, Carolina
Associações entre linfócitos infiltrantes tumorais e o perfil clínico-patológico de mulheres com câncer de mama: um estudo transversal. / Carolina Pohlman Becker ; orientador, Gregório Wrublewski Pereira, 2024.
33 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Araranguá, Graduação em Medicina, Araranguá, 2024.

Inclui referências.

1. Medicina. 2. Câncer de mama. 3. Linfócitos infiltrantes tumorais. 4. Imunologia. 5. Oncologia. I. Wrublewski Pereira, Gregório. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Medicina. III. Título.

Carolina Pohlmann Becker

**Associações entre linfócitos infiltrantes tumorais e o perfil clínico-patológico de mulheres com
câncer de mama: um estudo transversal.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de médico e
aprovado em sua forma final pelo Curso de Medicina.

Araranguá, 19 de junho de 2024.

Prof^a. Ritele Hernandez da Silva, Dr^a.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof. Gregório Wrublevski Pereira.

Orientador

Prof.^a Melissa Negro Dellacqua.

Membro 1

Prof.^a Francielly Andressa Felipetti.

Membro 2

Araranguá, 2024.

Este trabalho é dedicado aos meus familiares, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Gregório, pela atenção na orientação deste trabalho. Agradeço também aos membros da banca examinadora pelo tempo e conhecimento empregados para a melhoria deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos, que forneceram apoio nos momentos de dificuldade que naturalmente a vida acadêmica impõe, e que fizeram toda a jornada se tornar mais leve.

Acima de tudo, agradeço à minha família, que nunca mediu esforços para me apoiar e me incentivar a conquistar o meu sonho de me tornar médica. Especialmente ao meus pais e meu irmão, expresse minha gratidão por acreditarem em mim e fornecerem todos os subsídios necessários ao longo da minha formação educacional e acadêmica. O investimento material e financeiros são fundamentais, mas o investimento humano, os valores e o amor em mim forjados, são o que me tornaram uma pessoa e profissional mais humana.

Se não fosse pela grande variabilidade dos indivíduos, a medicina poderia ser muito bem uma ciência, e não uma arte (OSLER, 1849-1919).

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é a primeira causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. A heterogeneidade do câncer de mama se manifesta pelas diferentes apresentações clínicas e morfológicas e conseqüente variação nas respostas terapêuticas. Novos estudos sugerem que o sistema imunológico desempenha uma função importante no curso da doença, e demonstram uma associação significativa entre a presença de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs) e resposta clínica em pacientes com tumores sólidos. **Objetivo:** o objetivo primário deste estudo é avaliar a associação entre a densidade de LITs e o perfil clínico-patológico de pacientes com câncer de mama. **Método:** A pesquisa tem delineamento transversal, com dados coletados a partir de prontuários e amostras anatomopatológicas de pacientes submetidas a procedimento de biópsia de mama. As associações entre as variáveis e os desfechos de interesse - a porcentagem de LITs e o estadiamento - foram realizadas de acordo com as prevalências e com uso de teste de Fisher. **Resultados:** A análise demonstrou correlações significativas entre a densidade de LITs e o estadiamento - indicando uma maior presença de LITs em estágios iniciais da doença - e com a expressão de HER2, a presença de carcinoma ductal in situ e a expressão de RP. **Conclusão:** Este estudo confirmou hipóteses já levantadas em pesquisas científicas anteriores. A limitação imposta pelo tamanho da amostra, entretanto, pode ter influenciado na robustez das associações encontradas, impedindo a verificação de outras correlações já encontradas na literatura anteriormente.

Palavras-chave: linfócitos infiltrantes tumorais; câncer de mama; imunologia; oncologia.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the leading cause of cancer death in women in Brazil. The heterogeneity of breast cancer is manifested by different clinical and morphological presentations and consequent variation in therapeutic responses. New studies suggest that the immune system plays an important role in the course of the disease and demonstrate a significant association between the presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and clinical response in patients with solid tumors. **Objective:** The primary objective of this study is to evaluate the association between TIL density and the clinicopathological profile of breast cancer patients. **Method:** The research has a cross-sectional design, with data collected from medical records and anatomical pathology samples of patients undergoing breast biopsy procedures. Associations between variables and outcomes of interest - the percentage of TILs and staging - were performed according to prevalences and using Fisher's test. **Results:** The analysis demonstrated significant correlations between TIL density and staging - indicating a greater presence of TILs in early stages of the disease - and with HER2 expression, the presence of ductal carcinoma in situ, and ER expression. **Conclusion:** This study confirmed hypotheses previously raised in scientific research. However, the sample size limitation may have influenced the robustness of the associations found, preventing the verification of other correlations previously found in the literature.

Keywords: tumor-infiltrating lymphocytes; breast cancer; immunology; oncology.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Associações com significância estatística para a densidade de LITs.	25
TABELA 2 - Correlação entre estadiamento e percentual de LITs	26
TABELA 3 - Descrição da amostra: estadiamento e LITs	27
TABELA 4 - Descrição da amostra em relação a expressão receptores e marcadores tumorais.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CM	Câncer de mama
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
LITs	Linfócitos infiltrantes tumorais
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SBOC	Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. METODOLOGIA.....	21
3. RESULTADOS	25
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM), assim como outras neoplasias malignas, resulta de uma proliferação incontrolável de células anormais, que surgem em função de alterações genéticas, sejam elas hereditárias ou adquiridas por exposição a fatores ambientais ou fisiológicos. Essas alterações genéticas podem provocar mudanças no crescimento ou na morte celular, levando ao surgimento do tumor. ⁽¹⁾

O CM é o mais incidente em mulheres no mundo, com aproximadamente 2,3 milhões de casos novos estimados em 2020, o que representa 24,5% dos casos novos por câncer em mulheres. É também a causa mais frequente de morte por câncer nessa população, somando 15,5% dos óbitos por câncer em mulheres. ⁽²⁾

Considerado problema de saúde pública, o CM é um grupo heterogêneo de doenças, com comportamentos distintos. A heterogeneidade do câncer de mama se manifesta pelas diferentes apresentações clínicas e morfológicas, variadas assinaturas genéticas e consequente variação nas respostas terapêuticas. ⁽³⁾

O receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) é uma proteína que promove o crescimento das células cancerosas e sua superexpressão está associada a um comportamento mais agressivo do câncer e a um pior prognóstico. ⁽⁴⁾ A expressão de HER2 é um marcador crucial no câncer de mama, pois tumores HER2 positivos tendem a crescer e se disseminar mais rapidamente do que os HER2-negativos. ⁽⁵⁾

Ademais, a expressão dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) também é fundamental no prognóstico e no tratamento do CM. Tumores que expressam esses receptores são frequentemente menos agressivos e respondem bem à terapia hormonal, o que pode melhorar significativamente o prognóstico. ⁽⁶⁾ O marcador de proliferação celular Ki-67 é outro importante indicador prognóstico, pois sua alta expressão está associada a uma taxa de crescimento mais rápida do tumor, indicando um câncer mais agressivo. ⁽⁷⁾ Juntos, HER2, RE, RP e Ki-67 fornecem uma visão abrangente do perfil biológico do tumor, ajudando a guiar as decisões terapêuticas e a prever os resultados clínicos.

Além da influência dos receptores e marcadores tumorais, novos estudos sugerem que o sistema imunológico desempenha uma função importante no curso da doença. Sua função primordial é a manutenção da homeostase tecidual por imunovigilância contínua e iniciação de reações inflamatórias que envolvem a ativação coordenada de células da imunidade inata e adaptativa. Células inflamatórias e fatores solúveis estão presentes em todos os tumores.

Evidências recentes demonstram que essas células desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer e, em alguns casos, podem ajudar a prever o comportamento clínico de um câncer melhor do que as características das próprias células neoplásicas.⁽⁸⁾

As neoplasias alteram a estrutura normal dos tecidos e induzem respostas imunes que podem eliminar os tumores incipientes ou, em caso de resposta insuficiente em que a eliminação é incompleta, a transformação neoplásica de células é capaz de escapar do controle imunológico.⁽⁹⁾

Estudos em humanos demonstraram uma associação significativa entre a presença de células imunes específicas, denominadas nos tumores de linfócitos infiltrantes tumorais (LITs), e resposta clínica em pacientes com tumores sólidos. Além disso, evidências acumuladas sugerem que a imunidade mediada por linfócitos T e B fornece a base para respostas antitumorais. No CM, a infiltração tumoral por células T CD8+ citotóxicas foi fortemente associado com a sobrevivência do paciente e resposta à terapia. A presença de células T reguladoras CD4+ tem uma resposta ambígua. Entre as outras subpopulações de células T CD4+, as células Th1 têm sido associadas com resultados clínicos favoráveis, enquanto as células Th2 têm sido associadas à diminuição da resposta antitumoral.⁽⁹⁾

O montante de estudos que relacionam a imunologia e a oncologia demonstram a importância dessa nova área de conhecimento e a necessidade de aprofundamento para ampliar a sua aplicação, dada a ainda limitada base de informações acerca desse tema. Os desafios da concepção clínica e terapêutica estão em formular estratégias que visam a inflamação como uma abordagem para o prognóstico e tratamento de cânceres estabelecidos. Nossa compreensão da relação entre inflamação e câncer está crescendo e a base de conhecimento pode ser aprimorada, com resultados que permitirão o desenvolvimento e a consolidação de abordagens direcionadas para a inflamação no câncer.⁽⁸⁾

Nesse sentido, o objetivo primário deste estudo é avaliar a associação entre a densidade de LITs⁽⁹⁾ e o perfil clínico-patológico - especialmente o estadiamento, conforme o Manual de Estadiamento de Câncer da American Joint Committee on Cancer (AJCC)⁽¹⁰⁾ - dos casos de cânceres de mama de uma população de mulheres, além de avaliar secundariamente, de forma descritiva, as características da amostra.

Dessa forma, este trabalho pode fortalecer as novas relações propostas pela literatura entre a imunologia e a oncologia, por meio de novos dados gerados a partir da população brasileira. Este estudo também possibilita a testagem de protocolos e hipóteses já levantados

pela literatura atual,⁽⁹⁾ buscando aprofundar e ampliar a sua aplicação, dada a nossa ainda limitada base de informações acerca desse tema.

2 METODOLOGIA

A pesquisa tem delineamento transversal, com dados coletados a partir de prontuários e amostras anatomopatológicas de pacientes diagnosticados com CM e submetidos à procedimento de biópsia de mama, na região sul de Santa Catarina, no período de 1º de janeiro de 2018 a 31 de dezembro de 2022.

Foram incluídas no estudo todas as mulheres diagnosticadas com CM no sul do estado de Santa Catarina, através de estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico no período de 1º de janeiro de 2018 a 31 de dezembro de 2022. Foram excluídas do estudo as pessoas que não tiveram exame anatomopatológico a ser analisado ou revisado, casos com material exibindo artefatos analíticos ou pré-analíticos, pacientes que não consentiram com estudo, pessoas que retiraram o material do laboratório de patologia e pacientes que tenham apenas coletado a amostra após o tratamento neoadjuvante. Aplicados os critérios de inclusão e exclusão metodológicos, a amostra resultou em um n=104 pacientes.

Os dados foram coletados de prontuários de pacientes que realizaram o exame anatomopatológico e imuno-histoquímico, e as informações foram recebidas de forma cega, sem identificação dos pacientes.

As informações coletadas foram: idade (anos), a medida do maior eixo do tumor (centímetros), focalidade (unifocal/multifocal), lateralidade (mama direita/mama esquerda) tipo histológico⁽¹¹⁾, subtipo molecular⁽¹¹⁾, grau histológico⁽¹²⁾, componente de carcinoma ductal in situ (CDIS) (ausente/presente), estadiamento⁽¹⁰⁾, invasão linfovascular do tumor (não identificado/presente), densidade de LITs (0%/1-10%/11-50%/51-100%)⁽⁹⁾, expressão de HER2 (0/1+/2+/3+), além de expressão de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e marcador Ki-67, estes 3 últimos categorizados como 0-10%/11-30%/31-70%/71 a 100%.

Para análise e quantificação da expressão do receptor HER2, foram realizados cortes adicionais de 5µm de espessura obtidos dos blocos de parafina de representação neoplásica. A reativação dos epítomos foi realizada através banho quente por 40min com temperatura 98°C e utilizando tampão específico para clone (Herceptest Buffer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Após a reativação antigênica foi realizado a incubação com o anticorpo HercepTest (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo diluição de 1:200, tempo de incubação de 30min e temperatura de incubação 20°C. A revelação foi através do cromógeno Herceptest / SK001 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo tempo de incubação do

polímero de 30min e temperatura de incubação 20°C. A expressão do HER 2 foi considerada score 0 (zero) quando não havia nenhuma expressão ou a expressão estava presente em menos de 10% das células neoplásicas; o score 1+ quando a expressão era fraca, incompleta, em mais de 10% das células neoplásicas; o score 2+ quando a expressão era fraca a moderada, circunferencial em mais de 10% das células neoplásicas; o score 3+ quando a expressão era intensa, circunferencial, em mais de 10% das células neoplásicas. ⁽¹³⁾

Para análise e quantificação da expressão do receptor estrógeno, foram realizados cortes adicionais de 5µm de espessura obtidos dos blocos de parafina de representação neoplásica. A reativação dos epítomos foi realizada através banho quente por 20min com temperatura 95°C e utilizando tampão específico para clone (Dako TRS High pH, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Após a reativação antigênica foi realizado a incubação com o anticorpo Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α , Clone EP1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo diluição de 1:50, tempo de incubação de 45min e temperatura de incubação 27°C. A revelação foi através do cromógeno EnVision FLEX+ / K8002/SM802 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo tempo de incubação do polímero de 20 minutos e temperatura de incubação 27°C. A expressão de RE foi considerada em porcentagens. ⁽¹³⁾

Para análise e quantificação da expressão do receptor progesterona, foram realizados cortes adicionais de 5µm de espessura obtidos dos blocos de parafina de representação neoplásica. A reativação dos epítomos foi realizada através banho quente por 20min com temperatura 97°C e utilizando tampão específico para clone (Dako TRS High pH, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Após a reativação antigênica foi realizado a incubação com o anticorpo Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo diluição de 1:200, tempo de incubação de 20min e temperatura de incubação 20°C. A revelação foi através do cromógeno EnVision FLEX+ / K8002/SM802 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo tempo de incubação do polímero de 20min e temperatura de incubação 20°C. A expressão de RE foi considerada em porcentagens. ⁽¹³⁾

Para análise e quantificação da expressão do Ki-67, foram realizados cortes adicionais de 5µm de espessura obtidos dos blocos de parafina de representação neoplásica. A reativação dos epítomos foi realizada através banho quente por 20min com temperatura 97°C e utilizando tampão específico para clone (Dako TRS High pH, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Após a reativação antigênica foi realizada a incubação com o anticorpo Mouse Anti-

Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo diluição de 1:50, tempo de incubação de 30min e temperatura de incubação 20°C. A revelação foi através do cromógeno EnVision+ / K4007 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo tempo de incubação do polímero de 30min e temperatura de incubação 20°C. A expressão do Ki-67 foi considerada em porcentagens.⁽¹³⁾

Para análise e quantificação da expressão do receptor progesterona, foram realizados cortes adicionais de 5µm de espessura obtidos dos blocos de parafina de representação neoplásica. A reativação dos epítomos foi realizada através banho quente por 20min com temperatura 97°C e utilizando tampão específico para clone (Dako TRS High pH, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Após a reativação antigênica foi realizada a incubação com o anticorpo Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, Clone PgR 636 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo diluição de 1:200, tempo de incubação de 20min e temperatura de incubação 20°C. A revelação foi através do cromógeno EnVision FLEX+ / K8002/SM802 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) contendo tempo de incubação do polímero de 20min e temperatura de incubação 20°C. A expressão de RP foi considerada em porcentagens.⁽¹³⁾

Para análise geral da densidade de LITs, foram utilizados os critérios da publicados por Salgado R. et al através do International TILs Working Group 2014. Nesta análise selecionou-se áreas tumorais de 1 mm² e quantificou-se em porcentagem (%) a densidade das células inflamatórias contidas no estroma tumoral.⁽⁹⁾

Para realizar essa análise estatística, as variáveis numéricas foram categorizadas da seguinte forma: LITs - mensurados em porcentagem - foram categorizados como 0%, 1 a 10%, 11 a 50%, 51 a 100%; a maior medida do tumor, mensurada em centímetros, foi categorizada como 0 a 1,9cm, 2 a 3,9 cm, maior do que 4cm; a expressão de HER2 como positiva (3+), equívoco (2+) e negativa (0+ ou 1+); e a expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e o marcador Ki-67 - mensurada em porcentagem - foi categorizada como expressos de 0 a 10%, de 11 a 30%, de 31 a 70% e de 71 a 100%.

As variáveis categóricas foram analisadas conforme a categorização própria de cada variável já descrita, exceto pelo estadiamento, que foi adaptado conforme o agrupamento anatômico TNM da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC)⁽¹⁴⁾ para análise descritiva da amostra (IA/IB/IIA/IIB/IIIA/IIIB/IIIC), e simplificado como estágio I referente aos estágios IA e IB, estágio II referente a IIA e IIB, ou estágio III referente a IIIA, IIIB e IIIC,

para realizar a associação entre variáveis. Para análise de associações com o estadiamento, foi excluída a categoria "não classificados", pois seria um fator de confusão da análise.

Os dados foram armazenados em planilha no Microsoft Excel® 2016 e a análise estatística foi elaborada pelo programa STATA/SE 16.1. Para a análise descritiva da amostra, as variáveis categóricas e as numéricas foram avaliadas como frequência relativa, frequência absoluta, porcentagem, média, ou desvio padrão, conforme indicado e dentro de suas categorizações.

As associações entre as variáveis e os desfechos de interesse - a porcentagem de LITs e o estadiamento - foram realizadas de acordo com as prevalências e com uso de teste de Fisher, com o intervalo de confiança de 95% (IC95%) e considerando valores de $p < 0,05$ para indicativo de significância estatística.

As variáveis associadas ao percentual de LITs foram: maior medida do tumor, tipo histológico, grau histológico, presença de CDIS, presença de invasão linfovascular, subtipo molecular, expressão de HER2, RE, RP e Ki-67. Já as variáveis cruzadas com o estadiamento são: tipo histológico, subtipo molecular, grau histológico, expressão de HER2, RE, RP e Ki-67. O estadiamento e o percentual de LITs também foram associados entre si, sendo esse o principal desfecho de interesse.

A análise descritiva geral da amostra contemplou a distribuição de idade, maior medida do tumor, lateralidade e focalidade. A análise descritiva da amostra no cerne histológico e imuno-histoquímico contemplou a distribuição de tipo histológico, subtipo molecular, grau histológico, índice mitótico, presença de carcinoma ductal in situ, percentual de LITs, presença de invasão linfovascular, estadiamento, e expressão de HER2, RE, RP e Ki-67.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número do Certificado de Apresentação de Apreciação Ética 71249423.9.0000.0121 e parecer consubstanciado de aprovação número 6.428.495.

3 RESULTADOS

A associação entre as variáveis e os desfechos primários - percentual de LITs e o estadiamento - demonstrou que houve significância estatística em várias relações importantes. A densidade de LITs mostrou correlação positiva em relação à presença de CDIS e a expressão de HER2 e RP, conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Associações com significância estatística para a densidade de LITs

Variáveis (n)	LITs				valor-p
	0%	1 - 10%	11 - 50%	>50%	
Presença de CDIS					0,041
Não detectado	30	11	12	1	
Presente	15	17	14	4	
Expressão HER-2					0,039
0+/3+ (negativo)	40	23	20	2	
1+/3+ (negativo)	2	4	3	0	
2+/3+ (equivoco)	1	1	1	1	
3+/3+ (positivo)	2	0	2	2	
Expressão RP					0.023
1-10%	19	7	9	3	
11-30%	0	1	3	1	
31-70%	11	2	3	0	
71-100%	15	18	11	1	

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: LITs: linfócitos infiltrantes tumorais; CDIS: carcinoma ductal in situ; RP: receptores de progesterona;

Para análise de associações com o estadiamento, foi excluída a categoria "não classificados", pois seria um fator de confusão da análise. O estadiamento revelou significância estatística para a associação com o grau histológico ($p=0,043$), sendo maior o grau quanto maior o estadiamento, e o principal achado do estudo foi a correlação entre o estadiamento e o percentual de LITs ($p=0,026$), que demonstra maior presença de LITs em estágios menores (I e II), como verificado na tabela 2.

Tabela 2 - Correlação entre estadiamento e percentual de LITs

Variáveis (n)	LITs				valor-p
	0%	1 - 10%	11 - 50%	>50%	
Estadiamento simplificado					0,026
I	14	9	7	4	
II	13	17	14	0	
III	9	1	3	0	

Fonte: elaborado pelos autores

Legenda: LITs: linfócitos infiltrantes tumorais.

Não houve significância estatística ($p>0,05$) entre LITs e a maior medida do tumor, o tipo histológico, o grau histológico, a presença de invasão linfovascular, os subtipos moleculares, a expressão de RE e de Ki-67. Também não houve correlação significativa ($p>0,05$) entre estadiamento e tipo histológico, subtipos moleculares, a expressão de HER-2, RE, RP e de Ki-67.

Os resultados dos desfechos secundários - descrição da amostra - revelaram uma média de idade de 61 anos, com desvio padrão de 12,8 anos, a idade mínima contida na amostra foi 29 e a máxima de 90 anos. Em relação a maior medida do tumor, 33,65% apresentaram até 1,9 cm, seguidos de 42,31% de 2cm a 3,9cm e 24,04% apresentaram 4cm ou mais. A lateralidade dos tumores foi predominantemente direita em 51,92% dos casos, deixando a prevalência em mama esquerda presente em 48,08%. O estudo da focalidade demonstrou que 92 dos 104 casos eram unifocais.

A análise histológica e imuno-histoquímica mostrou que o CDIS foi identificado em 50 dos 104 casos. O tipo histológico mais prevalente foi o carcinoma ductal invasivo tipo não especial (76,92%), seguido do carcinoma lobular invasivo (16,35%), carcinoma tubular invasivo, papilar invasivo, e mistos (1,92% cada), e por fim o carcinoma metaplásico invasivo (0,96%). O grau histológico 1 foi predominante (60%), e os graus 2 e 3 estavam presentes em 18,27% e 22,12% respectivamente. A invasão linfovascular foi detectada em 46% dos pacientes. Os subtipos moleculares apareceram na ordem decrescente de luminal A (n=46), luminal B (n=39), triplo negativo (n=10) e HER2 (n=2), o restante não estava identificado. A distribuição da frequência de LITs e do estadiamento, está presente na tabela 3.

Tabela 3 - Descrição da amostra: estadiamento e LITs

Variável	N	%
Estadiamento por agrupamento anatômico		
TNM da SBOC		
Não classificado	13	12,5
IA	32	30,76
IB	2	1,92
IIA	29	27,78
IIB	15	14,42
IIIA	10	9,61
IIIB	1	0,96
IIIC	2	1,92
IV	0	0
Estadiamento simplificado		
Não classificado	13	12,5
I	34	32,69
II	44	42,3
III	13	12,5
IV	0	0
LITs		
0%	45	43,27
1-10%	28	26,92
11-50%	26	25
51-100%	5	4,81

Fonte: elaborado pelos autores.

Legenda: LITs: linfócitos infiltrantes tumorais; SBOC: Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica

Em relação a expressão receptores e marcadores tumorais, a expressão de HER2 foi categorizada como positiva (3+), equívoco (2+) ou negativa (0+ ou 1+), e a expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e o marcador Ki-67 - mensurada em porcentagem - foi categorizada como expressa de 0 a 10%, de 11 a 30%, de 31 a 70% e de 71 a 100%. Suas distribuições na amostra estão representadas na tabela 4.

Tabela 4 - Descrição da amostra em relação a expressão receptores e marcadores tumorais.

Variável	N	%
Expressão HER-2		
0+/3+ (negativo)	85	81,73
1+/3+ (negativo)	9	8,65
2+/3+ (equivoco)	4	3,85
3+/3+ (positivo)	6	5,77
Expressão RE		
1-10%	16	15,38
11-30%	1	0,96
31-70%	6	5,77
71-100%	81	77,88
Expressão RP		
1-10%	38	36,54
11-30%	5	4,81
31-70%	16	15,38
71-100%	45	43,27
Ki-67		
0-10%	51	49,04
11-30%	32	30,77
31-70%	18	17,31
71%-100%	3	2,88

Fonte: elaborado pelos autores.

Legenda: RE: receptores de estrogênio; RP: receptores de progesterona;

4 DISCUSSÃO

A associação entre as variáveis e os desfechos de interesse - percentual de LITs e o estadiamento - demonstrou que houve significância estatística em várias relações importantes. A densidade de LITs mostrou correlação significativa em relação à expressão de HER2, estando presente em maior proporção em tumores HER-2 positivos ($p=0,039$). Esse resultado está em consonância com achados anteriores na literatura, sendo valioso para o direcionamento de novas terapias efetivas em câncer de mama HER-2 superexpresso. ⁽¹⁵⁾

Houve também significância estatística na associação de LITs com receptor de progesterona, estando presente em maior quantidade nos tumores com menor expressão de RP ($p=0,023$). Esta relação foi encontrada em um grande estudo anterior, que indica ainda a importância dessa associação para novos tratamentos imunoterápicos. ⁽¹⁶⁾ Já em relação à presença de CDIS, o estudo encontrou forte correlação entre a sua presença e alta densidade de LITs ($p=0,041$), em acordo com estudos anteriores, porém ainda não é possível afirmar o valor desse resultado em termos de prognóstico ou recidiva de tumores de mama. ⁽¹⁷⁾

O estadiamento revelou significância estatística para a associação com o grau histológico ($p=0,043$), sendo maior o grau quanto maior o estadiamento - relação amplamente validada na atualidade, sendo o grau histológico um dos principais fatores prognósticos no CM. ⁽¹⁸⁾

O principal achado do estudo foi a correlação entre o estadiamento e o percentual de LITs ($p=0,026$), que demonstra maior presença de LITs em estágios menores (I e II). A literatura atual ainda carece de estudos com maiores amostras para explorar essa associação, porém já foi verificada a relação entre a presença de LITs e melhores prognósticos e maior tempo de sobrevida - também encontrados em estágios menores de câncer. ⁽¹⁹⁾

Apesar de não ter sido encontrada relação entre a densidade de LITs e o subtipo molecular neste trabalho ($p=0,085$), evidências acumuladas sugerem uma relação entre LITs e o subtipo molecular Triplo Negativo, inclusive relacionando a maior densidade (>50% de LITs) a uma melhor resposta patológica à terapia neoadjuvante e à uma sobrevida significativamente melhor. ⁽²⁰⁾ Uma possível limitação metodológica para essa discordância de resultados foi a forma como foram analisados estatisticamente os dados, pois o teste de Fisher foi aplicado entre a variável LITs e a variável subtipos moleculares com todas as suas categorias (Luminal A, Luminal B, Triplo Negativo e HER-2.). Essa relação testada entre LITs e cada categoria dos subtipos moleculares individualmente poderia ter encontrado outras associações significativas.

Os resultados deste estudo são validados por achados de pesquisas anteriores que destacam a importância dos linfócitos infiltrantes tumorais no prognóstico do CM, na orientação da escolha de tratamentos mais direcionados e no fornecimento de base para elaboração de novas terapias. No entanto, é importante salientar que o tamanho da amostra foi relativamente pequeno, o que limitou a aplicabilidade estatística de testes mais precisos e possivelmente dificultou a identificação de associações previamente descritas na literatura. Assim, para fortalecer a validade dos resultados e assegurar a sua aplicabilidade clínica, são necessários novos estudos com amostras maiores e mais diversas, garantindo a robustez e a aplicabilidade dos dados em diversos contextos clínicos.

5 CONCLUSÃO

Este estudo avaliou a importância dos linfócitos infiltrantes tumorais na aplicação clínica e terapêutica do câncer de mama, investigando a relação da imunologia com a oncologia - já levantada em pesquisas científicas anteriores - por meio de testagem de protocolos e hipóteses já levantados pela literatura atual. A análise demonstrou correlações significativas entre a densidade de LITs e a expressão de HER2, assim como com a presença de CDIS e a expressão de RP, corroborando a importância desses marcadores na caracterização e tratamento da doença. Adicionalmente, a associação entre o estadiamento e o grau histológico reforça o papel crítico do grau histológico no prognóstico do CM. O achado mais notável foi a correlação entre o estadiamento e o percentual de LITs, indicando uma maior presença de LITs em estágios iniciais da doença, o que sugere um possível impacto prognóstico positivo. Entretanto, a ausência de significância estatística entre a densidade de LITs e os subtipos moleculares, apesar de suportada por evidências na literatura, destaca a necessidade de uma análise mais detalhada e específica para cada subtipo molecular, além da limitação imposta pelo tamanho da amostra, que pode ter influenciado na robustez das associações encontradas e impedido a verificação de outras correlações já encontradas na literatura anteriormente. Portanto, enquanto os resultados fornecem informações valiosas para a compreensão do papel dos LITs e outros marcadores no CM, os autores recomendam que futuros estudos com amostras maiores e mais diversificadas sejam conduzidos para validar e expandir esses achados. A continuidade da investigação neste campo é fundamental para aprimorar as estratégias terapêuticas e melhorar os desfechos clínicos para pacientes com câncer de mama.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2013.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021;71:209–49. DOI:10.3322/caac.21660
3. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022.
4. 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. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1364-1382. doi:10.5858/arpa.2018-0902-SA
5. Phipps AI, Buist DS, Malone KE, et al. Reproductive history and risk of three breast cancer subtypes defined by three biomarkers. *Cancer Causes Control*. 2011;22(3):399-405. doi:10.1007/s10552-010-9709-0
6. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, 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):1736-1747. doi:10.1093/annonc/mdr304
7. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-1664. doi:10.1093/jnci/djr393
8. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, et al. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother*. 2010;33(4):335-351. doi:10.1097/CJI.0b013e3181d32e74
9. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-71. DOI:10.1093/annonc/mdu450
10. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. In: Amin MB, editor. 8th ed. Chicago: American Joint Committee on Cancer/Springer; 2017.

11. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of Tumours Editorial Board. Breast tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 2).
12. ELLIS IO, ELSTON CW. Histologic grade. In: O'Malley FP, Pinder SE, eds. Breast Pathology. Elsevier; 2006: 225-233. Philadelphia, USA. 2006.
13. JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast cancer. Oxford University Press 113, (2021).
14. Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC). Diretrizes de Tratamentos Oncológicos – Mama: Doença Metastática. Disponível em: <https://sboc.org.br/images/31.-Diretrizes-SBOC-2021---Mama-doena-metasttica-FINAL.pdf>
15. Luque M, Sanz-Álvarez M, Morales-Gallego M, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Immune Response in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(24):6034. Published 2022 Dec 8. doi:10.3390/cancers14246034
16. Lundgren C, Bendahl PO, Ekholm M, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic and tamoxifen predictive marker in premenopausal breast cancer: data from a randomised trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res*. 2020;22(1):140. Published 2020 Dec 23. doi:10.1186/s13058-020-01364-w
17. Komforti M, Badve SS, Harmon B, Lo Y, Fineberg S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in ductal carcinoma in situ (DCIS)—assessment with three different methodologies and correlation with Oncotype DX DCIS Score. *Histopathology*. [Online] *Histopathology*; 2020;77(5): 749–759. Available from: doi:10.1111/his.14181
18. Schwartz AM, Henson DE, Chen D, et al. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: a study of 161 708 cases of breast cancer from the SEER Program. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(8):1048-1052. doi:10.5858/arpa.2013-0435-OA
19. Faleiros FMA, Lima e Silva FCL, Balabram D, et al. Can TILs be associated with prognostic factors and survival rates in breast cancer? A retrospective analysis. *Mastology (Online)*: official journal of the Brazilian Society of Mastology / Sociedade Brasileira de Mastologia. 2023; 2594-5394. doi.org/10.29289/2594539420230004
20. Leon-Ferre RA, Jonas SF, Salgado R, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA*. 2024;331(13):1135-1144. doi:10.1001/jama.2024.3056