

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Avaliação do infiltrado linfocítico tumoral (TILs) na doença residual da mama em tumores triplo negativos (TNBC) após a quimioterapia neoadjuvante**

**Nathalia Cruz da Costa**

Porto Alegre, 2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Avaliação do infiltrado linfocítico tumoral (TILs) na doença residual da mama em tumores triplo negativos (TNBC) após a quimioterapia neoadjuvante**

**Nathalia Cruz da Costa**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Pires Souto Damin.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2022

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que acreditam e apoiam a ciência, a meus familiares pelo suporte para minhas conquistas e sonhos, em especial a meus avós, João Francisco Machado e Eloica Lima. Dedico, também, aos pacientes e seus familiares, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Damin, pela chance de desenvolver este trabalho, pelos ensinamentos e sabedoria compartilhada. Agradeço a aluna de Iniciação científica Nathalia Lobato, por toda ajuda e disposição na coleta e organização dos dados. Agradeço a Dra. Alexandra Ponso, pela dedicação e análises das lâminas. Agradeço ao Prof. Dr. Charles, pela análise estatística e análise dos dados e ensinamentos.

## SUMÁRIO

### Sumário

### Sumário

Avaliação do infiltrado linfocítico tumoral (TILs) na doença residual da mama em tumores triplo negativos (TNBC) após a quimioterapia neoadjuvante .....	1
Avaliação do infiltrado linfocítico tumoral (TILs) na doença residual da mama em tumores triplo negativos (TNBC) após a quimioterapia neoadjuvante .....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE QUADROS .....	8
RESUMO .....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO .....	11
REVISÃO DA SISTEMÁTICA DA LITERATURA .....	12
1 Estratégia de busca .....	12
2 Mapa conceitual.....	14
3 Revisão Sistemática da Literatura.....	15
3.1 Epidemiologia do câncer de mama .....	15
3.2 Impacto da pandemia da Covid-19 no diagnóstico de câncer de mama.....	15
3.3 Câncer de mama triplo-negativo.....	16
3.4 Microambiente tumoral no câncer de mama triplo-negativo .....	16
3.5 Infiltrado linfocítico tumoral como fator de resposta patológica completa.....	16
3.6 Infiltrado linfocítico tumoral (TILs) como marcador de doença residual.....	17
3.7 Ponto de corte para avaliação do infiltrado linfocítico tumoral (TILs) .....	18
JUSTIFICATIVA .....	20
HIPÓTESES.....	21
OBJETIVOS.....	22
Principal.....	22
Secundários .....	22
REFERÊNCIAS.....	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
PERSPECTIVAS .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

TILS	Infiltrado linfocítico tumoral
QTNA	Quimioterapia neoadjuvante
pCR	Resposta patológica completa
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
COVID-19	Coronavírus 2019
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
HER-2	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
T	Linfócitos tipo T
T CD4	Linfócitos T tipo CD4 (cluster of differentiation 4)
T CD8	Linfócitos T tipo CD8 (cluster of differentiation 8)
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
FOXP3	Forkhead box P3
Th1	T helper 1
NKs	Natural Killer
FDA	Federal Drug Administration
sTILs	Infiltrado linfocitário tumoral estromal
TME	Tumor microenvironment
NAC	Neoadjuvant chemotherapy

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Mapa conceitual.	13
Figura 2. Diferenciação biológica de TNBC de baixo risco.	18
Figura 3. Subconjunto de células imunes presente no microambiente tumoral.	18

## **LISTA DE TABELAS**

Table 1. Clinic and pathologic characteristics.	35
Table 2. Comparison of pathological parameters, tumor size, and pre-and post-neoadjuvant chemotherapy stromal levels in the residual disease group.	37

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Anagrama PICOS para elaboração de pergunta investigativa do presente estudo	12
---	----

## RESUMO

**Introdução:** O aumento do infiltrado tumoral linfocítico (TILs) tem sido associado à resposta patológica completa (pCR) após quimioterapia neoadjuvante (QTNA) em câncer de mama invasivo triplo negativo. No entanto, o papel prognóstico dos TILs na doença residual após NACT ainda permanece em debate. **Objetivo:** Investigar o valor preditivo do infiltrado linfocítico tumoral (TILs) no câncer de mama triplo negativo (TNBC) em estágio avançado após a quimioterapia neoadjuvante. **Método:** Foram analisadas lâminas de tumores triplo-negativos estágios II e III entre os anos de 2008 e 2019 de pacientes com doença residual após QTNA. Os TILs estromais foram analisados em dois momentos do tratamento: pré-QTNA e pós-QTNA. Os TILs foram medidos como porcentagem de células imunes no estroma dentro das bordas do tumor invasivo. O número de TILs foi analisado como uma medida contínua e dividido em duas categorias: alto ( $\geq 30\%$ ) e baixo ( $\leq 30\%$ ). **Resultados:** Foram selecionados 78 pacientes, das quais 60 obtiveram resposta parcial à QTNA. A média de idade das pacientes que apresentaram doença residual após QTNA (n=60) foi de  $52,58 \pm 1,21$  anos, variando de 28 a 78 anos. Cerca de 90% delas foram tratadas com protocolo padrão QTNA de quatro ciclos de Antraciclina e Ciclofosfamida, seguidos de quatro ciclos de Docetaxel. Observou-se um aumento de TILs após o tratamento QTNA onde o infiltrado de TILs altos ( $\geq 30\%$ ) foi de 55%, sendo que antes do tratamento 90% da amostra apresentou baixa infiltração de TILs ( $\leq 30\%$ ) (teste de McNemar,  $p \leq 0,0001$ ). Apesar da maior infiltração de TILs pós-QTNA, não houve significância estatística em relação à sobrevida livre de doença e sobrevida global. **Conclusão:** A modificação no ambiente tumoral, que resulta no aumento da infiltração de TILs após a quimioterapia neoadjuvante, pode ajudar na identificação de características imunogênicas adicionais apresentadas por TNBCs residuais induzidas pelo tratamento. A identificação de pacientes que não atingem o pCR, mas que apresentam características tumorais imunológicas favoráveis (aumento de TILs), pode auxiliar na melhor escolha de pacientes que se beneficiariam com terapias complementares com foco no sistema imunológico.

**Palavras-chave:** câncer de mama triplo-negativo; infiltrado linfocítico tumoral; quimioterapia neoadjuvante; valor preditivo; valor prognóstico.

## ABSTRACT

**Introduction:**The presence of abundant tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) is correlated with the pathological complete response (pCR) after neoadjuvant chemotherapy (NAC) in triple-negative invasive breast cancer. However, the prognostic role of TILs in residual disease after NAC still remains under debate.**Objective:** To investigate the predictive value of TILs in advanced-stage triple-negative breast cancer (TNBC) after NAC.**Methods:**Slides of triple-negative stage II and III tumors between 2008 and 2019 from patients with residual disease after QTNA were analyzed. Stromal TILs were analyzed at two treatment times: pre-NAC and post-NAC. TILs were measured as the percentage of immune cells in the stroma within the borders of the invasive tumor. The number of TILs was analyzed as a continuous measure and divided into two categories: high ( $\geq 30\%$ ) and low ( $\leq 30\%$ ).

**Results:**A total of 78 patients were selected, of which 60 had a partial response to QTNA. The mean age of the patients who had residual disease after NAC ( $n=60$ ) was  $52.58 \pm 1.21$  years, ranging from 28 to 78 years. Approximately 90% of these were treated with a standard NAC protocol of 4 cycles of anthracycline and cyclophosphamide followed by four cycles of Docetaxel. An increase in TILs was observed after the NAC treatment where the high TILs infiltration ( $\geq 30\%$ ) was 55%, and before treatment, 90% of the sample had low TILs infiltration ( $\leq 30\%$ ) (McNemar test,  $p \leq 0.0001$ ). Despite the greater infiltration of TILs after NAC, there was no statistical significance regarding disease-free survival and overall survival.**Conclusion:**The modification in the tumor environment, which results in increased infiltration of TILs after neoadjuvant chemotherapy, may help in the identification of additional immunogenic features presented by residual, treatment-induced TNBCs. The identification of patients who do not reach pCR, but who have favorable immunological tumor characteristics (increased TILs), can help in the best choice of patients who would benefit from complementary therapies focused on the immune system.

**Keywords:** triple-negative breast cancer; tumor lymphocytic infiltrate; neoadjuvant chemotherapy; predictive value; prognostic value.

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) representa aproximadamente 15% a 20% dos cânceres de mama invasivos, caracterizado pela ausência de expressão de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), apresentando características biológicas agressivas com altos índices de recidiva antes dos cinco anos.<sup>1</sup>

Atualmente, a quimioterapia neoadjuvante vem sendo utilizada como estratégia de tratamento para tumores triplo-negativos, com o objetivo de redução do estadiamento tumoral, melhorando as chances de conservação da mama.<sup>1</sup> Estudos clínicos mostram que tumores triplo-negativos são mais sensíveis à quimioterapia neoadjuvante, apresentando taxas mais altas de resposta patológica completa (pCR) em comparação com outros subtipos tumorais.<sup>2,3</sup>

A avaliação do infiltrado linfocítico tumoral vem sendo amplamente estudada no cenário pré-tratamento, apresentando uma importante associação com a resposta patológica completa (pCR). De fato, a avaliação de TILs em tumores primários provou ser fortemente prognóstica em pacientes com TNBC tratados com quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante, bem como em pacientes com TNBC precoces que não receberam nenhum tratamento sistêmico.<sup>4,5</sup>

Evidências sugerem que o aumento da infiltração tumoral pós-QTNA na doença residual em TNBC pode ser um importante preditor de resposta a futuros tratamentos complementares que tenham como principal ação a ativação do sistema imunológico.<sup>6</sup>

Recentemente, a Federal Drug Administration (FDA) ressaltou a importância de novas abordagens estratégicas no TNBC para direcionamento de grupos de pacientes com alto risco de recaída com base na presença de doença residual após a quimioterapia neoadjuvante.<sup>7</sup>

Sendo assim, a identificação de marcadores imunológicos que podem ser preditivos da resposta à QTNA é de extrema importância para indicação de terapias complementares neste grupo de pacientes.

## REVISÃO DA SISTEMÁTICA DA LITERATURA

### 1 Estratégia de busca

Com o objetivo de identificar informações mais relevantes ao assunto desta pesquisa, realizou-se uma revisão da literatura, por uma busca sistematizada.

A pergunta investigativa foi formulada, tomando-se como base a descrição da doença, ou condição de interesse, a população, o contexto, a intervenção e o desfecho descritos na Tabela 1 abaixo em concordância com o anagrama PICOS.

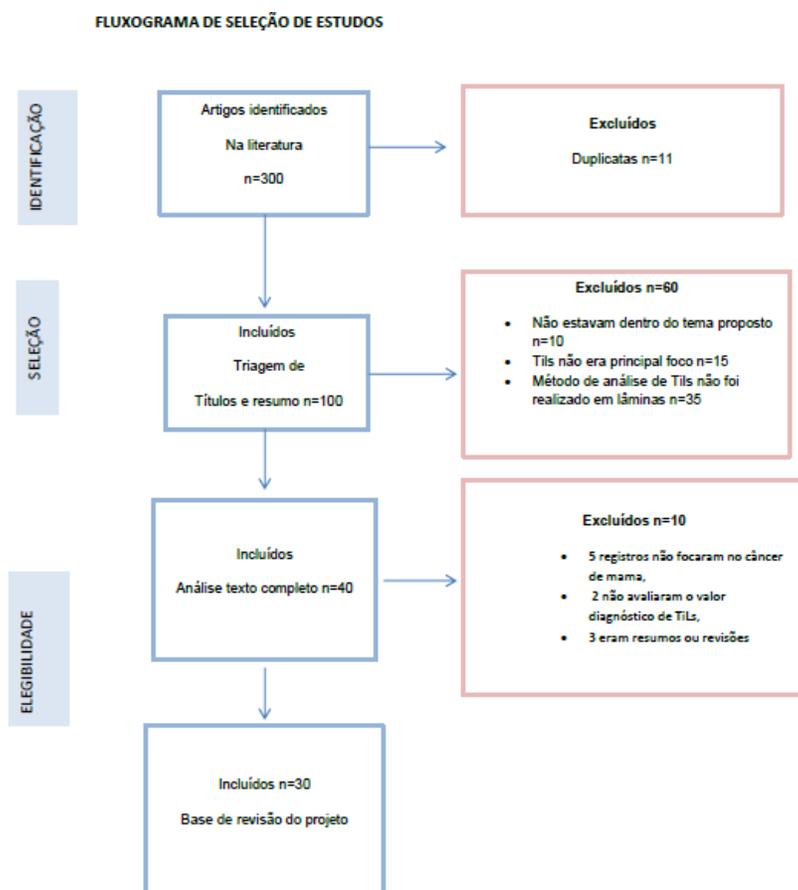
Itens	Abreviação	Componentes da pergunta	Termos em Inglês
População	P	Mulheres com câncer de mama triplo negativo	women with breast cancer
Intervenção	I	Quimioterapia neoadjuvante	neoadjuvant chemotherapy
Comparação	C	Quantidade de Tils antes e depois do tratamento	Number of Tils before and after treatment
Desfecho	O	AumentoTils pós quimioterapia neoadjuvante	IncreaseTils after neoadjuvant chemotherapy
Tipo de estudo	T	Retrospectivos, prospectivos, casos controle.	Retrospectives, prospective, control cases.

**Quadro.1**Anagrama PICOS para elaboração de pergunta investigativa do presente estudo.

Foram pesquisados artigos usando a base MEDLINE (via PubMed) até setembro de 2021 sem restrições de idiomas ou data, com foco em estudos que avaliaram a níveis de linfócitos infiltrantes de tumor em pacientes com câncer de mama triplo negativo após quimioterapia neoadjuvante. A estratégia de busca realizou os cruzamentos das seguintes palavras chaves, (breast cancer) AND (TILs) AND (Triple negative), artigos relacionados e listas de referências desses artigos também foram revisados para identificar todos os estudos disponíveis.

A busca na literatura recuperou 300 registros, após a remoção de duplicatas 11 foram realizadas a triagem de títulos/resumos de 100 registros, excluímos 60 publicações.

Os 40 registros restantes foram recuperados para avaliação de texto completo. Excluímos 10 estudos porque 5 registros não focaram no câncer de mama, 2 não avaliaram o valor diagnóstico de TILs, 3 eram resumos ou revisões, restando no total de 30 estudos usados para base de nossa revisão para o projeto. O fluxograma da seleção do estudo é mostrado no Fluxograma 1.



**Fluxograma de seleção de estudos.**

## 2 Mapa conceitual

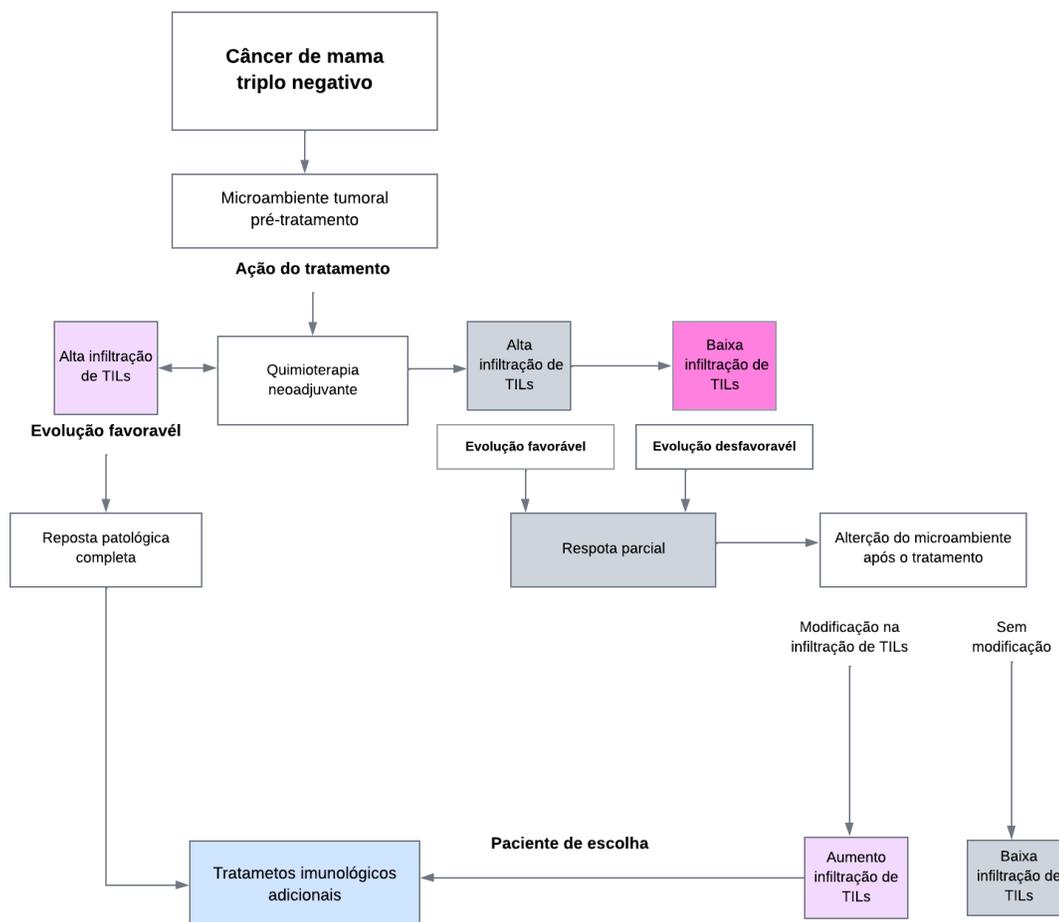


Figura 1. Mapa conceitual.

Mapa conceitual: O microambiente tumoral do câncer de mama triplo-negativo após a quimioterapia neoadjuvante pode vir a sofrer alterações significativas, apresentando dois cenários imunológicos: 1) aumento do infiltrado linfocítico tumoral (TILs); 2) baixos infiltrado tumoral (TILs). Sendo assim, é um bom parâmetro na ajudada da escolha do melhor paciente que venha a se beneficiar de tratamentos imunológicos futuros.<sup>6,8</sup>

### **3 Revisão Sistemática da Literatura**

#### **3.1 Epidemiologia do câncer de mama**

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres. De acordo com o GLOBOCAN, 2,3 milhões de novos casos foram diagnosticados em 2020, sendo que a incidência vem aumentando ao longo dos anos. Estima-se que em 2040 a incidência mundial de câncer de mama alcance um total de 28,4 milhões de mulheres em todo mundo, um aumento de 47% em relação a 2020.<sup>9</sup>

A estimativa de novos casos de câncer de mama para cada ano do triênio 2020-2022 é de cerca de 66.280, correspondendo a um risco estimado de 61,6 novos casos a cada 100 mil mulheres. A região Sul apresenta uma taxa estimada em 42,95 mil novos casos para cada 100 mil mulheres, sendo que Porto Alegre apresenta uma estimativa de 4.010 casos de câncer de mama.<sup>10</sup>

#### **3.2 Impacto da pandemia da Covid-19 no diagnóstico de câncer de mama**

A pandemia da Covid-19 afetou diversos serviços de saúde, entre eles os serviços de diagnóstico de câncer de mama. Devido a adoção de inúmeras medidas preventivas para o controle da disseminação do vírus, cidades com grandes centros de diagnósticos registraram cerca de 65% de diminuição no número de novos pacientes.<sup>11</sup> Diretrizes de priorização chegaram a ser elaboradas, como de cirurgias oncológicas com escalas de emergências assegurando, na medida do possível, o atendimento de pacientes oncológicos. No entanto, o Brasil sofreu com diversos atrasos e suspensão no início de tratamentos, gerando diversas incertezas.<sup>12</sup>

O impacto da pandemia da Covid-19 levou a atrasos no diagnóstico de câncer de mama não apenas no Brasil, mas em todo o mundo. Um estudo populacional realizado no Reino Unido sugeriu alta na taxa de mortalidade de pacientes com câncer de mama, com um aumento estimado de 9,6% de mortes por câncer de mama em até cinco anos após o diagnóstico, correspondendo a cerca de 344 mortes adicionais.<sup>12</sup> No Brasil, um estudo conduzido em 2020 sugeriu uma queda de 78,9% nos diagnósticos de imagem de mama nos primeiros 90 dias de pandemia.<sup>13</sup>

Em vista do atraso no diagnóstico, há um maior número de pacientes sendo diagnosticadas em estádios tardios da doença e sendo encaminhadas para o tratamento quimioterápico neoadjuvante. Esse fato ressalta ainda mais a importância de estudar a doença neste contexto.

### **3.3 Câncer de mama triplo-negativo**

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) é caracterizado por sua alta heterogeneidade e agressividade, apresentando negatividade para receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e fator de crescimento humano -2 (HER-2). É responsável por cerca de 15 a 20% de todos os casos de câncer de mama.<sup>14</sup>

A maioria dos TNBCs (95%) é classificada histologicamente como carcinoma invasivo de alto grau, sendo que seu comportamento pode depender de características biológicas e moleculares, conferindo a esse subtipo variantes de alto e baixo grau para o desenvolvimento de metástase,<sup>14,15</sup> conforme apresentado na Figura 2.

Um estudo realizado em 2022 sugeriu que a visão abrangente com ênfase nas principais características mais relevantes para o diagnóstico diferencial pode sustentar um curso clínico favorável nesses tumores.<sup>15</sup>

### **3.4 Microambiente tumoral no câncer de mama triplo-negativo**

O microambiente tumoral do câncer de mama abrange uma ampla gama de populações de células do sistema imunológico inato e adaptativo que correspondem a diferentes classes de células imunes T, do tipo T CD4 + responsável pela produção de IFN- $\gamma$  mediador da diferenciação e ativação de Linfócitos T CD8 + que infiltram o tumor (TILs), que subsequentemente ativam a liberação de citocinas citotóxicas que induzem a eliminação das células cancerígenas.<sup>16</sup> A interação de T CD4+ FOXP3+ representa ação imunossupressora, através da inibição de células T CD8+, células Th1 CD4+, APCs e células natural killer (NKs). Todavia, outros tipos celulares também estão presentes nesse microambiente, como células dendríticas e macrófagos apresentando papel fundamental na ativação e supressão da resposta do sistema imunológico.<sup>4</sup> A composição celular do microambiente tumoral é apresentada na Figura 3.

### **3.5 Infiltrado linfocítico tumoral como fator de resposta patológica completa**

As células do infiltrado linfocítico tumoral (TILs) correspondem às células imunes que se infiltram no ambiente tumoral.<sup>17</sup>

Na literatura atual, são encontrados diversos estudos de associação positiva do infiltrado linfocítico tumoral (TILs), onde níveis elevados de TILs pré-tratamento em câncer de mama triplo-negativo no estágio inicial estão diretamente associados com pCR.<sup>18-21</sup>

O papel dos TILs pré-terapêuticos têm sido extensivamente investigado. O estudo realizado por Loiet *al.* sugere que maiores níveis de TILs foram associados à menor recorrência à distância no TNBC e à melhora da sobrevida livre de doença.<sup>5</sup> Uma análise realizada em 3.711 amostras de câncer de mama, onde TILs estromais foram avaliados em biópsias pré-tratamento, mostra uma associação direta com o aumento de TILs antes do tratamento com a pCR, além disso, foi relatada a associação significativa e independente entre o aumento da infiltração de TILs e o desfecho de sobrevida global.<sup>22</sup> As evidências atuais mostram que a pCR se associa a uma melhor evolução em TNBC de estágio inicial, associando-se significativamente à sobrevida livre de doença.<sup>6</sup>

No entanto, é importante ressaltar que pacientes que não atingiram a pCR podem apresentar mudanças relevantes no ambiente tumoral, como aumento da infiltração de TILs, refletindo um quadro imunológico favorável.

Estudos vêm avaliando o papel de TILs na doença residual (DR) após a quimioterapia neoadjuvante. Segundo Dieciet *al.*,<sup>4</sup> a presença de DR após a quimioterapia neoadjuvante não se traduz necessariamente em um prognóstico desfavorável, onde a identificação de TILs avaliados na DR pode ser uma promissora ferramenta com alto potencial de estratificação e identificação de pacientes com TNBC residuais que poderiam se beneficiar com novas terapias com ênfase no sistema imunológico.<sup>23</sup>

### **3.6 Infiltrado linfocítico tumoral (TILS) como marcador de doença residual**

Apesar dos TILs serem bem estudados como fator prognóstico na doença inicial e na resposta à QTNA, o seu papel na doença residual ainda não está determinado.<sup>5,24,25</sup> Ao longo dos últimos cinco anos, cerca de 16.000 mil pacientes foram avaliados quanto a importância de TILs, com ênfase na infiltração pré-tratamento.

Classicamente, a QTNA tem como objetivo a indução de resposta antitumoral, possibilitando a avaliação do tratamento sistêmico. Seu efeito no ambiente tumoral pós-tratamento pode apresentar alterações histopatológicas, como a diminuição no número de células cancerígenas e alterações celulares, como o aumento na infiltração de células imunológicas, podendo indicar uma resposta imune celular antitumoral.<sup>23</sup> Devido às diversas alterações que podem acontecer após a QTNA, o foco restrito a avaliação de TILs pré-tratamento pode levar à perda de informações clínicas importantes, como alta infiltração de TILs na doença residual, o que poderia agregar novas informações no cenário da doença residual de mama em TNBC.

Segundo Dieciot *al.*,<sup>4</sup> a doença residual de mama pode apresentar três cenários possíveis após QTNA: 1) pacientes que apresentam uma alta infiltração de com TILs pré e pós-QTNA; 2) pacientes que apresentam baixa infiltração de TILs pré e pós QTNA; e 3) pacientes que apresentam uma mudança nos níveis de TILs depois da QTNA, ou seja, baixa infiltração pré-QTNA e alta infiltração pós-QTNA.

O primeiro grupo representa o melhor candidato para monoterapia, considerando que a presença de TILs reflita a imunidade antitumoral existente, ajudando no reforço para ajuda na resposta. No segundo grupo, o cenário da ausência de resposta imune não beneficiaria esse grupo de pacientes, o qual não apresenta uma resposta imune satisfatória, comprometendo a ação da imunoterapia. No terceiro grupo, a mudança no ambiente tumoral refletida no aumento dos TILs pós-tratamento poderia influenciar no direcionamento e inclusão de terapias complementares para esse grupo específico em um segundo momento.

Portanto, a identificação de marcadores que permitam refinar a estratificação de pacientes elegíveis para tratamentos sistêmicos adicionais pode vir a beneficiar um grupo de pacientes que apresenta evolução pouco favorável.

### **3.7 Ponto de corte para avaliação do infiltrado linfocítico tumoral (TILs)**

Os critérios para avaliação do TILs apresentam diferentes pontos de corte dependendo do estudo. Pode-se encontrar diferentes grupos classificados com porcentagem que variam de  $\geq 5\%$  até  $\geq 60\%$  associados a alta infiltração.<sup>5,26</sup>

Denkert *et al.*<sup>19</sup> definiram o ponto de corte mínimo para tumores com alta infiltração de 50%, podendo variar até 60%. No entanto, esse ponto de corte pode não ser aplicado devido a algumas limitações, como tamanho do fragmento do tumor a ser analisado, pois na maioria das vezes a análise se restringe a uma pequena parte do fragmento, aumentando o risco de se trabalhar com uma área não representativa.<sup>27</sup>

Segundo o *International Immuno-oncology Biomarker Working*, não há um ponto de corte específico para os TILs, pois a importância prognóstica e preditiva é linear. Sendo assim, a importância preditiva pode ser encontrada a partir do ponto de corte mínimo de infiltração de 5% e prognóstico de 30%.

Para ponto de corte utilizados o ponto utilizado no estudo de Ruan *et al.* Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers.

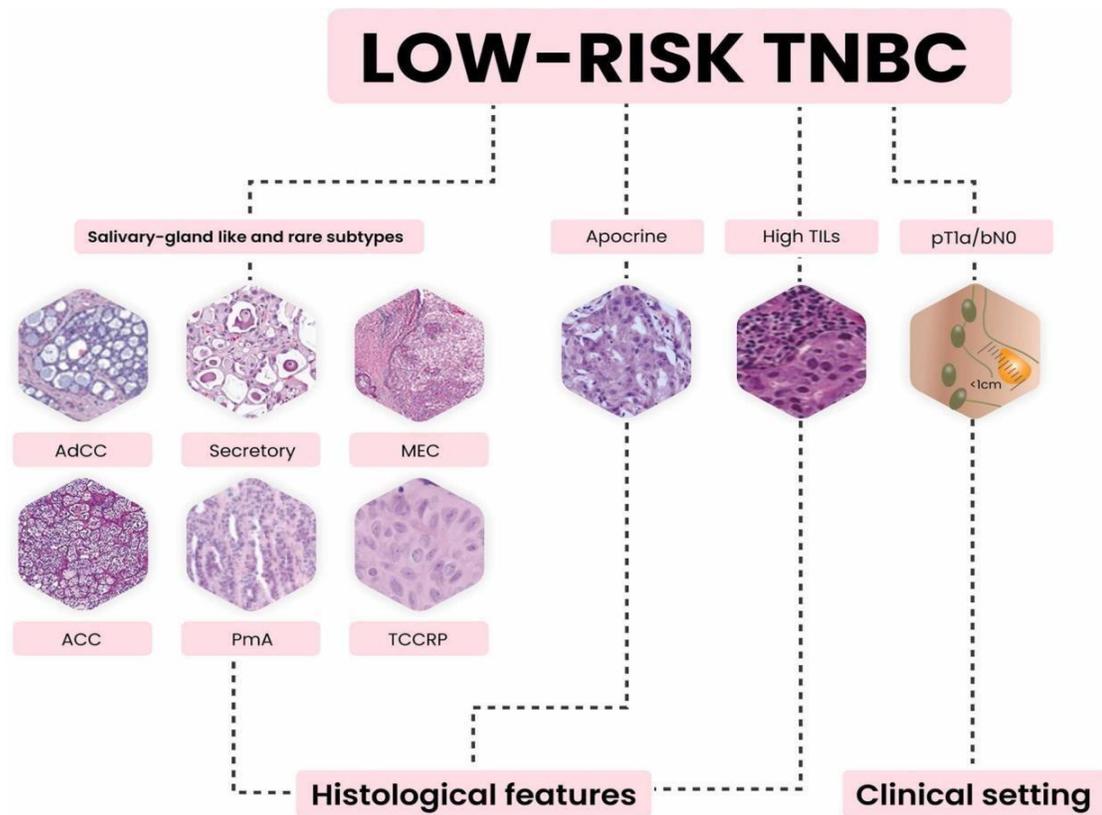


Figura 2. Diferenciação biológica de TNBC de baixo risco.

Fonte: Fuscoet al. <sup>15</sup>

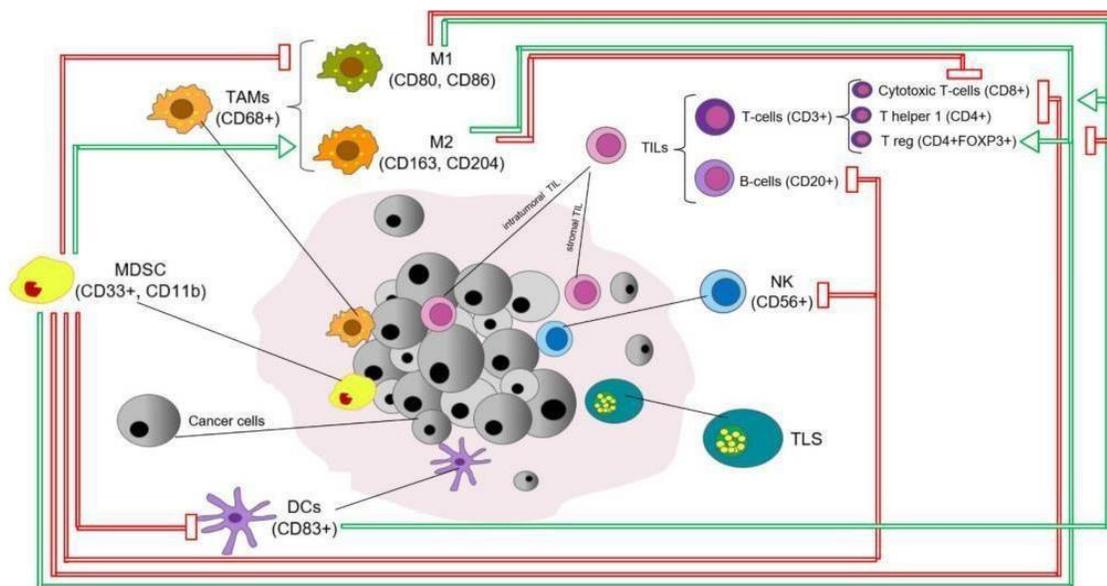


Figura 3. Subconjunto de células imunes presente no microambiente tumoral.

Fonte: Dieci, Miglietta e Guarneri.<sup>28</sup>

#### JUSTIFICATIVA

A avaliação de TILs pré-QTNA vem sendo associada a bons resultados em tumores de mama triplo-negativos em estágio inicial.

No entanto, o impacto de TILs na doença residual de mama em estágio avançado vem sendo pouco explorado. Por essa razão, a melhor compreensão das alterações no ambiente tumoral após o tratamento neoadjuvante e suas implicações diretas com a resposta imune tumoral pode ser útil no melhor refinamento e estratificação de pacientes que poderiam se beneficiar com tratamentos sistêmicos adicionais, como as imunoterapias

## **HIPÓTESES**

Hipóteses nulas:

Os TILs, após a quimioterapia neoadjuvante, não apresentam influência preditiva, não podendo ser associado a mudança no microambiente tumoral e a níveis maiores de infiltrado, não trazendo informações complementares.

Hipóteses alternativas:

Os TILs, após a quimioterapia neoadjuvante, apresentam influência preditiva, podendo ser associado a uma mudança no microambiente tumoral e a maiores níveis de infiltrado, trazendo assim informações complementares.

**OBJETIVOS****Principal**

Comparar porcentagens de TILs em tumores de mama triplo-negativos residuais e sua correlação com o aumento do infiltrado pós-quimioterapia neoadjuvante.

**Secundários**

Correlacionar a presença de TILs com:

1. Idade;
2. Status menopausa;
3. Estadiamento;
4. Grau;
5. Mudança de níveis no infiltrado pós-quimioterapia neoadjuvante.

**REFERÊNCIAS**

1. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH,*et al.* Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3997–4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984.
2. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA,*et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;26(8):1275-81. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4147.
3. Swisher SK, Vila J, Tucker SL, Bedrosian I, Shaitelman SF, Litton JK,*et al.* Locoregional Control According to Breast Cancer Subtype and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Undergoing Breast-conserving Therapy. *Annals of Surgical Oncology*. 2016;23(3):749-56. doi: 10.1245/S10434-015-4921-5.
4. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, Van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F,*et al.* Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2018;52:16-25. doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2017.10.003.
5. Salgado R, Loi S. Tumour infiltrating lymphocytes in breast cancer: increasing clinical relevance. *The Lancet Oncology*. 2018;19(1):3-5. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30905-1.
6. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V,*et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Annals of Oncology*. 2014;25(3):611-8. doi: 10.1093/ANNONC/MDT556.
7. Prowell TM, Beaver JA, Pazdur R. Residual Disease after Neoadjuvant Therapy - Developing Drugs for High-Risk Early Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2019;380(7):612-5. doi: 10.1056/NEJMP1900079.
8. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ,*et al.* Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. 2016;13(4):228-41. doi: 10.1038/NRCLINONC.2015.215.

9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *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(3):209-49. doi: 10.3322/CAAC.21660.
10. Instituto Nacional de Câncer. Estatísticas de câncer [Internet]. [citado em 2022 Maio 28]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.
11. Amorim GL da S, Assad DX, Ferrari BL, Rosa DD, Pereira BP, Clara RO, *et al.* Breast oncology and the COVID-19 pandemic: Recommendations from the Brazilian Society of Clinical Oncology (SBOC). *Brazilian Journal of Oncology*. 2020;16(0):1-7. doi: 10.5935/2526-8732.20190024.
12. Dinmohamed AG, Visser O, Verhoeven RHA, Louwman MWJ, Van Nederveen FH, Willems SM, *et al.* Fewer cancer diagnoses during the COVID-19 epidemic in the Netherlands. *The Lancet Oncology*. 2020;21(6):750-1. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30265-5.
13. Tachibana BMT, Ribeiro RL de M, Federicci ÉEF, Feres R, Lupinacci FAS, Yonekura I, *et al.* The delay of breast cancer diagnosis during the COVID-19 pandemic in São Paulo, Brazil. *Einstein*. 2021;19:eAO6721. doi: 10.31744/EINSTEIN\_JOURNAL/2021AO6721.
14. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016;13(11):674-90. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66.
15. Fusco N, Sajjadi E, Venetis K, Ivanova M, Andoloro S, Guerini-Rocco E, *et al.* Low-risk triple-negative breast cancers: Clinico-pathological and molecular features. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2022;172:103643. doi: 10.1016/J.CRITREVONC.2022.103643.
16. Burugu S, Asleh-Aburaya K, Nielsen TO. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer*. 2016;24(1):3-15. doi: 10.1007/S12282-016-0698-Z.
17. Melo Gagliato D de, Cortes J, Curigliano G, Loi S, Denkert C, Perez-Garcia J, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in Breast Cancer and implications for clinical practice. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*. 2017;1868(2):527-37. doi: 10.1016/J.BBCAN.2017.10.003.
18. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014;384(9938):164-72. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8.
19. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human

epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(9):983-91. doi: 10.1200/JCO.2014.58.1967.

20. Hong J, Rui W, Fei X, Chen X, Shen K. Association of tumor-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant chemotherapy with pathological complete response and prognosis in patients with breast cancer. *Cancer Medicine*. 2021;10(22):7921-33. doi: 10.1002/CAM4.4302.

21. Lee HJ, Lee JJ, Song IH, Park IA, Kang J, Yu JH, *et al*. Prognostic and predictive value of NanoString-based immune-related gene signatures in a neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer: relationship to tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2015;151(3):619-27. doi: 10.1007/S10549-015-3438-8.

22. Lee JS, Yost SE, Yuan Y. Neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer: Recent progresses and challenges. *Cancers*. 2020;12(6). doi: 10.3390/CANCERS12061404.

23. Asano Y, Kashiwagi S, Goto W, Takada K, Takahashi K, Hatano T, *et al*. Prediction of survival after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer by evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden. *BMC Cancer*. 2017;17(1). doi: 10.1186/S12885-017-3927-8.

24. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, *et al*. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Annals of Oncology*. 2014;25(3):611-8. doi: 10.1093/ANNONC/MDT556.

25. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, González-Billalabeitia E, Conesa MAV, García TG, *et al*. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*. 2014;16(6). doi: 10.1186/S13058-014-0488-5.

26. International TILS Working Group [Internet]. [citado em 2022 Jun. 9]. Disponível em: <https://www.tilsinbreastcancer.org/>.

27. Ruan M, Tian T, Rao J, Xu X, Yu B, Yang W, *et al*. Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers. *Diagnostic Pathology*. 2018;13(1):1-11. doi: 10.1186/S13000-018-0743-7

28. Dieci MV, Miglietta F, Guarneri V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells*. 2021 Jan 23;10(2):223. doi: 10.3390/cells10020223. PMID: 33498711. PMCID: PMC7911608.

1. Kurozumi S, Inoue K, Matsumoto H, Fujii T, Horiguchi J, Oyama T, *et al.* Prognostic utility of tumor-infiltrating lymphocytes in residual tumor after neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab for HER2-positive breast cancer. *Sci Rep.* 2019;9:1583. doi: 10.1038/s41598-018-38272-1.
2. Ochi T, Bianchini G, Ando M, Nozaki F, Kobayashi D, Criscitiello C, *et al.* Predictive and prognostic value of stromal tumour-infiltrating lymphocytes before and after neoadjuvant therapy in triple negative and HER2-positive breast cancer. *Eur J Cancer.* 2019;118:41-8. doi: 10.1016/j.ejca.2019.05.014.
3. Luen SJ, Savas P, Fox SB, Salgado R, Loi S. Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer. *Pathology.* 2017 Feb;49(2):141-155. doi: 10.1016/j.pathol.2016.10.010. PMID: 28049579.
4. Demaria S, Volm MD, Shapiro RL, Yee HT, Oratz R, Formenti SC, *et al.* Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Oct;7(10):3025-30. PMID: 11595690.
5. Axelrod ML, Nixon MJ, Gonzalez-Ericsson PI, Bergman RE, Pilkinton MA, McDonnell WJ, *et al.* Changes in Peripheral and Local Tumor Immunity after Neoadjuvant Chemotherapy Reshape Clinical Outcomes in Patients with Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2020 Nov 1;26(21):5668-81. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3685. PMID: 32826327. PMCID: PMC7642197.
6. Takada K, Kashiwagi S, Asano Y, Goto W, Morisaki T, Shibutani M, *et al.* Differences in tumor-infiltrating lymphocyte density and prognostic factors for breast cancer by patient age. *World Journal of Surgical Oncology.* 2022;20(38). doi: 10.1186/s12957-022-02513-5.
7. Loibl S, Jackisch C, Lederer B, Untch M, Paepke S, Kummel S, *et al.* Outcome after neoadjuvant chemotherapy in young breast cancer patients: a pooled analysis of individual patient data from eight prospectively randomized controlled trials. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;152(2):377-87. doi: 10.1007/s10549-015-3479-z.
8. Luen SJ, Salgado R, Dieci MV, Vingiani A, Curigliano G, Gould RE, *et al.* Prognostic implications of residual disease tumor-infiltrating lymphocytes and residual cancer burden in triple-negative breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Annals of Oncology.* 2019 Feb 01;30(2):236-242. doi: 10.1093/annonc/mdy547.
9. Prowell TM, Beaver JA, Pazdur R. Residual Disease after Neoadjuvant Therapy - Developing Drugs for High-Risk Early Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2019 Feb 14;380(7):612-615. doi: 10.1056/NEJMp1900079. PMID: 30763188.

10. Provenzano E, Bossuyt V, Viale G, Cameron D, Badve S, Denkert C, et al. Standardization of pathologic evaluation and reporting of postneoadjuvant specimens in clinical trials of breast cancer: recommendations from an international working group. *Mod. Pathol.* 2015;28(9):1185-1201. doi: 10.1038/modpathol.2015.74.
11. Galluzzi L, Buque A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer Cell.* 2015;28(6):690-714. doi: 10.1016/j.ccell.2015.10.012.
12. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. 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.
13. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2016;13(4):228-41. doi: 10.1038/nrclinonc.2015.215.
14. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, et al. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2016 Mar 15;22(6):1499-509. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1125. Erratum in: *Clin Cancer Res.* 2019 Feb 15;25(4):1437. PMID: 26515496; PMCID: PMC4794351.
15. Dieci MV, Criscitiello C, Goubar A, Viale G, Conte P, Guarneri V, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann. Oncol.* 2014;25(3):611-8. doi: 10.1093/annonc/mdt556. PMID: 24401929. PMCID: PMC3933248.

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O processo para descoberta e desenvolvimento de novos marcadores é longo e complexo. Os TILs, no cenário de doença residual pós-neoadjuvante, vêm mostrando ser um marcador imunológico onde a avaliação apresenta-se de forma mais simplificada com o uso de material disponível na rotina, ajudando assim a caracterizar o microambiente tumoral e na estimativa de quão imunogênico pode ser esse tumor. Nos últimos anos, diversos estudos têm mostrado a importância do valor preditivo e prognóstico dos TILs, assim como seu papel crescente na imunoterapia e na estratificação de pacientes pós-quimioterapia neoadjuvante.

## **PERSPECTIVAS**

Na última década, diversos estudos e medicamentos foram sendo desenvolvidos com a finalidade de melhor atender pacientes em tratamento, entre eles pacientes com câncer de mama. A quimioterapia clássica, cuja finalidade baseava-se em um ataque direto a células cancerígenas, vem dando espaço para novas estratégias, nas quais o sistema imune apresenta-se como principal alvo na identificação e combate ao câncer.

Entretanto, estimular o sistema imune é uma tarefa complexa e, embora as indicações de tratamentos alvos venham crescendo de forma significativa, o tratamento não consegue ser eficaz para todos. Portanto, novas estratégias que levem em consideração todas as alterações sofridas e apresentadas pelo sistema imunológico no combate a evolução tumoral devem ser melhor discutidas, podendo auxiliar no benefício e escolha de uma população alvo.

