



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**JÉSSICA OLIVEIRA CARVALHO**

**Caracterização morfológica do câncer de mama triplo negativo e correlação  
com a resposta à quimioterapia neoadjuvante**

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Mestre  
em Patologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques

Coorientador nacional: Prof<sup>º</sup>. Dr. Eduardo Carvalho Pessoa

Coorientador internacional: Prof<sup>º</sup>. Dr. Fernando Carlos de Landèr Schmitt

Botucatu, 2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**JÉSSICA OLIVEIRA CARVALHO**

**Caracterização morfológica do câncer de mama triplo negativo e correlação  
com a resposta à quimioterapia neoadjuvante**

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Mestre  
em Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques

Coorientador nacional: Prof<sup>o</sup>. Dr. Eduardo Carvalho Pessoa

Coorientador internacional: Prof<sup>o</sup>. Dr. Fernando Carlos de Landêr Schmitt

Botucatu, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carvalho, Jéssica Oliveira.

Caracterização morfológica do câncer de mama triplo negativo e correlação com a resposta à quimioterapia neoadjuvante / Jéssica Oliveira Carvalho. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Mariângela Esther Alencar Marques

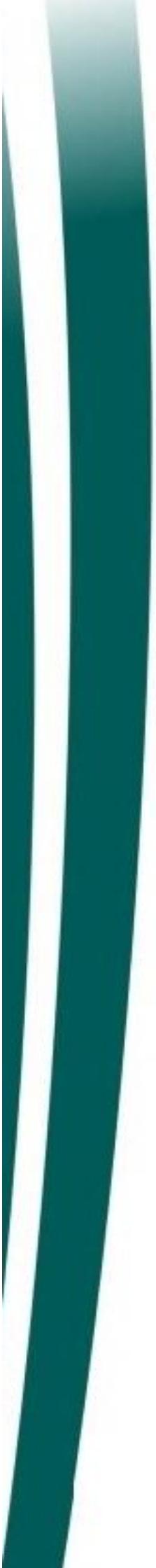
Coorientador: Eduardo Carvalho Pessoa

Coorientador: Fernando Carlos de Landèr Schmitt

Capes: 40105008

1. Mamas - Câncer - Prognóstico. 2. Neoplasias.  
3. Quimioterapia. 4. Leucócitos.

Palavras-chave: Linfócitos; Neoplasias da mama; Neoplasias de mama triplo negativas; Prognóstico; Quimioterapia.



## **Dedicatória**

**Aos meus pais, João Manoel e Adriana,**

**A minha irmã, Laura,**

**Aos meus professores e meus pacientes.**



# **Agradecimientos**

A Deus Pai, pelas bênçãos e oportunidades, pelo refúgio nos momentos mais difíceis.

A minha família, principalmente aos meus pais, Adriana e João Manoel, e irmã, Laura, por todo o apoio, companheirismo, amor e dedicação.

Ao meu namorado, Júlio César e meus sogros, Rose e Luiz, por todo o carinho e afeto.

A minha orientadora, Dra. Mariângela Marques, por todo o suporte, atenção, paciência, amizade, pelos exemplos de docência, pesquisadora e patologista.

Ao Dr Eduardo Carvalho, pelo valoroso aprendizado e incentivo.

Ao Dr Fernando Schmitt, por toda a paciência, pelo conhecimento que foi me passado e pelo voto de confiança na realização desse trabalho.

A Eloísa, por ter me ajudado com a estatística, pela paciência e ensinamentos.

Aos amigos, todos eles, principalmente, Jéssica Cursi, Bruna Pagnin, Júlia Thalita, Bruno Miamoto, Flávia Barbin, Rodrigo Zogheib, Thiago Meinicke, Camila Vilela, Gabriela Lodi, Jaqueline Melo, Conjeto Neto, Tayenne Gomes, Kamille Tuma, Logan Costa, Alexandre Carneiro, Lucas Cardoso, Rodrigo Minotelli, Daniel Luiz e todos os outros, por todo o apoio e por ouvir meus desabafos.

Aos doutores da banca (Dra Gisele Nai; Dr Cleverson Soares; Dra Maria Luiza Cotrim e Dr José Cândido Xavier) pela disposição, participação e opinião.

Aos docentes, médicos, em especial ao Dr Marcelo Padovani, residentes, funcionários e servidores do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB UNESP) por todas as suas contribuições.

Às nossas pacientes, algumas, já falecidas, justificativa maior de nossas pesquisas: investigar, avançar, descobrir, melhorar, promover saúde.



**Epígrafe**

“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício,  
assim como não existe tranquilidade sem paciência.”

Chico Xavier



## **Resumo**

**Introdução:** O Câncer de Mama é uma doença complexa e heterogênea que compreende vários subtipos biologicamente definidos, associados a comportamentos clínicos distintos, com diferentes respostas à terapêutica. O carcinoma mamário triplo negativo (CMTN) é um subtipo definido por critério imuno-histoquímico, caracterizado como tumores negativos para receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) e HER2. Os triplo negativos são um subgrupo de neoplasias que possuem um perfil heterogêneo, apresentam comportamento agressivo, padrões distintos moleculares, morfológicos e de metástases, além de falta de terapias específicas. Eles representam aproximadamente 15% dos carcinomas mamários. **Objetivos:** Correlacionar as características morfológicas dos CMTN com a resposta terapêutica à quimioterapia neoadjuvante. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas 76 amostras de pacientes com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma mamário triplo negativo, no período entre 2008 e 2018. Foram analisados dados clínicos/epidemiológicos; avaliadas as características morfológicas microscópicas dos tumores triplo negativos: infiltrado linfocitário, estroma e celularidade tumoral e correlacionado com a resposta à quimioterapia neoadjuvante. **Resultados:** A associação entre o infiltrado inflamatório e a resposta à quimioterapia neoadjuvante foi estatisticamente significativa ( $p = 0.0103$ ). Dos 19 casos que tiveram resposta completa à quimioterapia neoadjuvante, 15 casos (78,95%) apresentavam infiltrado inflamatório linfocitário (moderado a intenso) e 4 casos (21,05%) apresentavam pouco ou nenhum infiltrado. Em relação as pacientes que tiveram ausência de resposta ao tratamento, 10 biópsias (71,43%) não continham linfócitos, enquanto apenas 4 biópsias (28,57%) apresentavam infiltrado. Quando se avalia o estroma ou a celularidade tumoral, com infiltrado linfocitário e resposta à quimioterapia, independentemente de estroma/celularidade tumoral serem abundantes ou escasso, há uma boa resposta quimioterápica quando tem moderado a intenso infiltrado. **Conclusão:** O infiltrado inflamatório linfocitário está associado a uma melhor resposta à quimioterapia neoadjuvante.

**Palavras-chave:** neoplasias da mama; neoplasias de mama triplo negativas; quimioterapia; linfócitos; prognóstico.



# **Abstract**

**Introduction:** Breast Cancer is a complex and heterogeneous disease that comprises several biologically defined subtypes, associated with different clinical behaviors, with different responses to therapy. Triple negative breast cancer (TNBC) is a subtype defined by immunohistochemical criteria, characterized as estrogen receptor (ER), progesterone receptor (RP) and HER2 negative tumors. Triple negatives are a subgroup of neoplasms that have a heterogeneous profile, aggressive behavior, distinct molecular, morphological and metastatic patterns, and lack of specific therapies. They represent approximately 15% of breast carcinomas. **Objectives:** To correlate the morphological characteristics of TNBC with the therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy. **Materials and methods:** Seventy-six samples from patients with pathological diagnosis of TNBC between 2008 and 2018 were selected. We analyzed clinical / epidemiological data; the microscopic morphological characteristics of triple negative tumors: lymphocyte infiltrate, stroma and tumoral cellularity and correlated with response to neoadjuvant chemotherapy were selected and evaluated. **Results:** The association between inflammatory infiltrate and response to neoadjuvant chemotherapy was statistically significant ( $p = 0.0103$ ). Of the 19 cases that had a complete response to neoadjuvant chemotherapy, 15 cases (78.95%) had lymphocyte inflammatory infiltrate (moderate to severe) and 4 cases (21.05%) had little or no infiltrate. Regarding patients who had no response to treatment, 10 biopsies (71.43%) did not contain lymphocytes, while only 4 biopsies (28.57%) had infiltrate. When evaluating tumor stroma or cellularity with lymphocyte infiltrate and response to chemotherapy, regardless of whether tumor stroma / cellularity is abundant or scarce, there is a good chemotherapy response when it has moderate to intense infiltrate. **Conclusion:** Inflammatory lymphocyte infiltrate is associated with a better response to neoadjuvant chemotherapy.

**Keywords:** breast neoplasms; triple negative breast neoplasms; drug therapy; lymphocytes; prognosis.



## **Lista de figuras**

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1</b> – carcinoma ductal invasivo -----	página24
<b>Figura 2</b> – carcinoma lobular invasivo -----	página24
<b>Figura 3</b> – imunomarcção de receptor de estrógeno e progesterona-----	página26
<b>Figura 4</b> – imunomarcção de HER2 -----	página27
<b>Figura 5</b> – subtipos histopatológicos -----	página29
<b>Figura 6</b> – carcinoma adenoide-cístico da mama -----	página30
<b>Figura 7</b> – carcinoma medular -----	página31
<b>Figura 8</b> – carcinoma metaplásico -----	página32
<b>Figura 9</b> – carcinoma apócrino -----	página33

### MATERIAIS E MÉTODOS

<b>Figura 1</b> - Exemplos de semiquantificação usada para avaliar a intensidade de infiltrado linfocitário -----	página54
<b>Figura 2</b> - Exemplos de semiquantificação usada para avaliar a intensidade de estroma intratumoral -----	página54
<b>Figura 3</b> - Exemplos de semiquantificação usada para avaliar a intensidade de celularidade tumoral -----	página55



## **Lista de tabelas**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Avaliação clínica-epidemiológica; características morfológicas e resposta à quimioterapia neoadjuvante-----**página 57**

**Tabela 2** - Associação das variáveis idade e tamanho do tumor inicial --**página 58**

**Tabela 3** – Associação das variáveis: infiltrado linfocitário; estroma e celularidade tumoral com a resposta à quimioterapia neoadjuvante (resposta patológica) ----**página 59**

**Tabela 4** – Associação de tamanho tumoral, infiltrado linfocitário e resposta patológica à quimioterapia -----**página 60**



## **Lista de siglas**

## LISTA DE SIGLAS

**CMTN:** câncer de mama triplo negativo

**RE:** receptor de estrógeno

**RP:** receptor de progesterona

**HER2:** receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

**FISH:** hibridização *in situ* por fluorescência

**CDI:** carcinoma ductal invasivo

**CAC:** carcinoma adenoide-cístico

**H&E:** hematoxilina-eosina

**PD-1:** proteína de morte celular programada 1

**PDL-1:** proteína ligante de morte programada 1

**QN:** quimioterapia neoadjuvante

**RPC:** resposta patológica completa



## Sumário

## SUMÁRIO

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
1. CÂNCER DE MAMA .....	23
1.1 Definição, epidemiologia e morfologia .....	23
1.2 Imunofenótipo, genética e tratamento .....	24
2. CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO .....	27
2.1 Definição/Imunofenótipo .....	27
2.2 Epidemiologia, genética e biologia .....	27
2.3 Morfologia .....	28
2.4 Fatores preditivos e prognósticos .....	34
2.5 Resposta à quimioterapia neoadjuvante .....	35
3. REFERÊNCIAS .....	36
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	45
<b>OBJETIVOS</b> .....	47
<b>ARTIGO</b> .....	49
RESUMO .....	49
1- INTRODUÇÃO .....	50
2- MATERIAIS E MÉTODOS .....	51
3- RESULTADOS .....	57
4- DISCUSSÃO .....	61
5- REFERÊNCIAS .....	64
<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>ANEXO</b> .....	70



# **Revisão de literatura**

# 1 CÂNCER DE MAMA

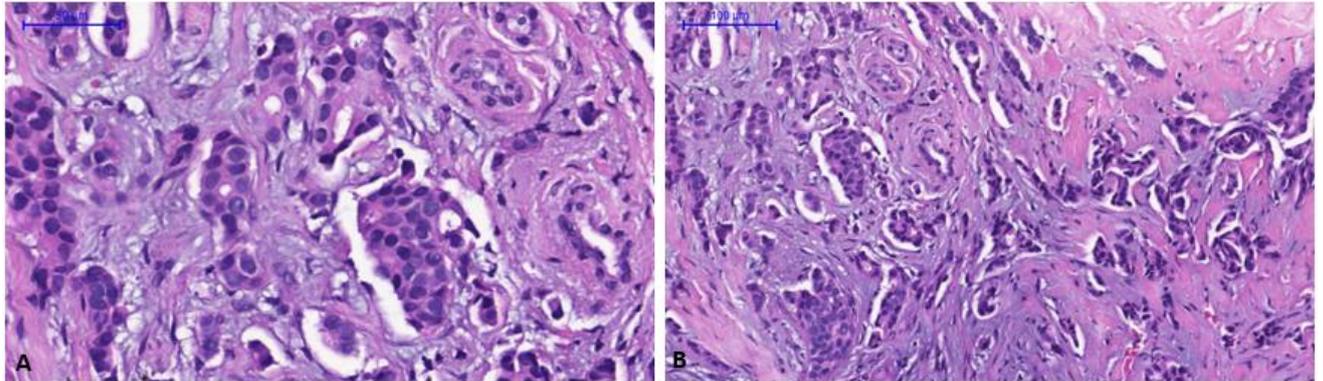
## 1.1 Definição, epidemiologia e morfologia

O Câncer de Mama é a neoplasia maligna que representa a causa mais comum de morte entre as mulheres no mundo. As últimas estimativas do projeto Globocan, realizado pela *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, revelaram que a incidência de câncer de mama no mundo foi de 2.088.849 (11.6%) casos, sendo registrados 626.679 (6.6%) óbitos por essa doença (1,2). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) divulgou estimativa de 59.700 casos novos de câncer de mama no país para 2019, representando 29,5 % dos cânceres em mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma. Segundo o INCA, em 2016 ocorreram 16.069 mortes de mulheres por câncer de mama no Brasil (3,4).

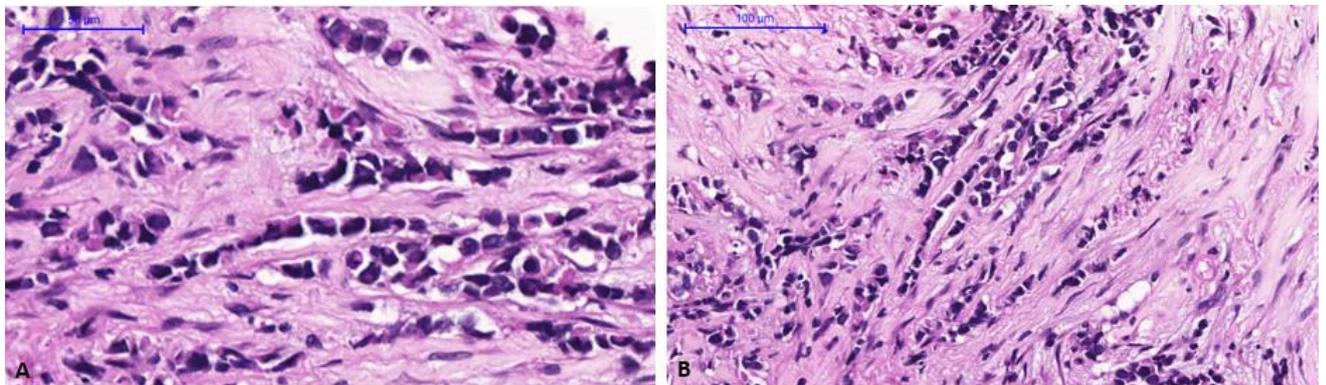
O câncer de mama mais comum é o carcinoma mamário, uma doença complexa e heterogênea, que compreende vários subtipos biologicamente definidos, associados a comportamentos clínicos distintos, com diferentes respostas à terapêutica, exigindo estratégias de tratamento específicas (5–8). O subtipo morfológico mais comum é o carcinoma ductal invasivo (figura 1), também conhecido como carcinoma mamário invasivo de tipo não especial, correspondendo cerca de 80% dos cânceres de mama invasivos. A idade média de acometimento desse subtipo é 60 anos. Menos de 15% são diagnosticados antes dos 45 anos de idade. A característica histopatológica varia conforme o imunofenótipo de cada tumor. Pode ser de baixo grau (grau I) nuclear a alto grau (grau III), mitoses podem ser raras a frequentes, com ninhos de células formando glândulas, túbulos bem formados a áreas papilíferas ou pouco tubulares (9,10).

O segundo subtipo morfológico mais comum é o carcinoma lobular invasivo (figura 2), correspondendo 5-15% dos tumores invasores da mama. É o mais comum dos subtipos especiais. Além de ser o carcinoma mamário mais associado a metástases a distância com tumor primário oculto. Ocorre, geralmente, em mulheres com mais de 50 anos. Há perda da adesão celular e padrão difuso de infiltração, com células soltas, em filas lineares “indianas” e escassa desmoplasia (11–13).

Os subtipos morfológicos mucinosos, cribriformes, micropapilares, tubulares, medulares, inflamatórios e metaplásicos são os menos comuns. Esses subtipos morfológicos de câncer de mama podem ser subdivididos em classificações com base na análise de suas estruturas moleculares, ou seja, através da expressão de biomarcadores (proteínas) ou perfis de expressão gênica (7).



**Figura 1 (A e B): Carcinoma ductal invasivo:** ninhos de células epiteliais tumorais formando glândulas, que infiltram, apresentando pleomorfismo nuclear moderado, em meio à estroma desmoplásico (A – coloração H &E, x200); (B – coloração H &E, x100).



**Figura 2 (A e B): Carcinoma lobular invasivo:** células neoplásicas com perda de adesão celular, em filas lineares, com padrão difuso de infiltração (A – coloração H &E, x200); (B – coloração H &E, x100).

## 1.2 Imunofenótipo, genética e tratamento

Estudo feito por Perou et al (2000) (14), classificou o carcinoma mamário em cinco subtipos moleculares inicialmente, através de estudos de perfil de expressão baseados em *microarray* feito com 8102 genes. São eles: *normal like*, luminal A, luminal B, superexpressão de HER2 e basaloide (*basal like*) (15).

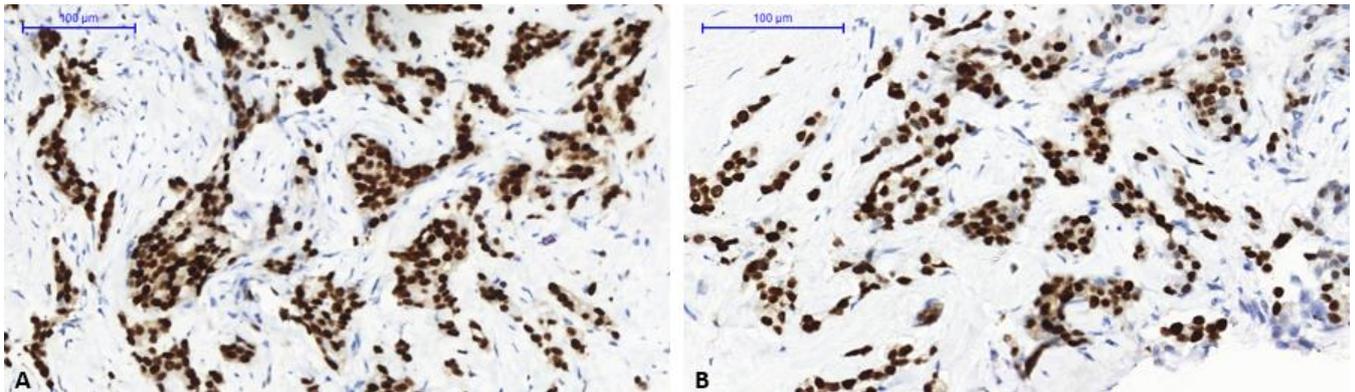
A identificação molecular desses biomarcadores por *microarray* de DNA é baseada em análise complexa de expressão gênica. Devido à complexidade, o custo elevado desse método, na prática, a imuno-histoquímica é aplicada para identificar subtipos imuno-histoquímicos de tumores mamários que se aproximam da classificação molecular e a estratificar os pacientes com câncer de mama em diferentes grupos de risco, além de auxiliar na escolha das terapias oncológicas (5). A classificação imuno-histoquímica demonstrou correspondência com as análises genômicas, sendo utilizada na rotina, como método simples, financeiramente viável, com a vantagem de avaliar a expressão de proteínas no contexto da morfologia do tumor (16,17).

Painéis imuno-histoquímicos são itens obrigatórios utilizados na rotina dos serviços de patologia buscando reproduzir com certa aproximação os perfis de expressão gênica, através de marcadores como: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e Ki67, marcador de proliferação celular (8,16–19). O RE é um fator de transcrição nuclear que estimula o crescimento de células epiteliais das mamas normais, quando ativado pelo hormônio de estrogênio. Em carcinomas mamários invasivos que expressam RE, a proliferação também pode ser ativada nas células neoplásicas. O RE regula a expressão de RP. Quando a neoplasia mamária expressa RP, ele é ativado pelo hormônio de progesterona, que também estimula o crescimento de células tumorais (20).

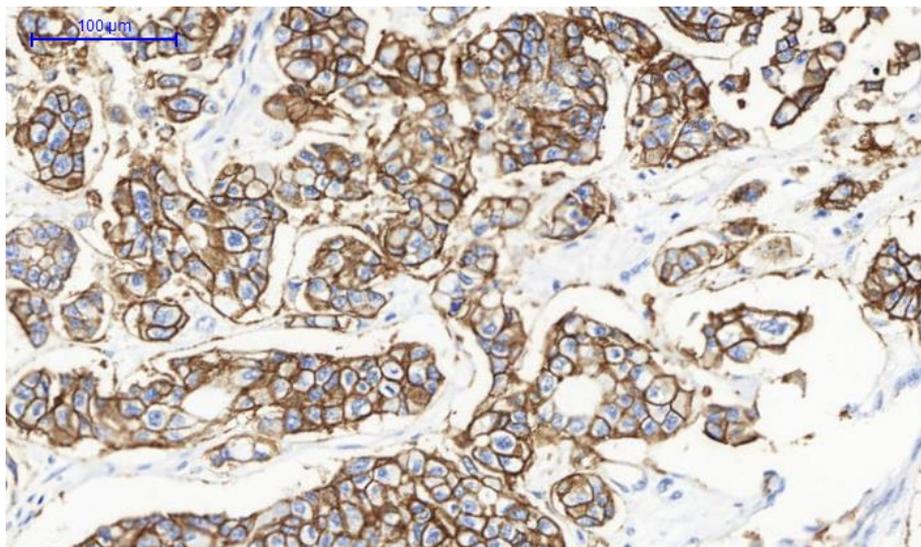
O HER2 é uma proteína transmembrana que, em condições habituais, regula a proliferação, crescimento e sobrevivência celular. Quando há uma superexpressão de HER2, existem proteínas em excesso funcionando como receptores de fator de crescimento induzindo uma proliferação celular acelerada. Na imuno-histoquímica avalia-se a quantidade desses receptores transmembrana presentes nos tumores, se eles estão superexpressos, consideram-se positivos (score 3). Quando o HER2 é duvidoso (score 2), é necessária a sua avaliação pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), que analisa se há um aumento no número de cópias do gene HER2, ou seja, se está amplificado. Quando há amplificação do HER2 confirma-se a sua positividade. O HER2 é negativo quando na imuno-histoquímica tem pouca ou nenhuma expressão da proteína (score 0 e 1) ou não é amplificado pelo método de FISH (20–22).

Os tumores classificados como luminal A são positivos para RE e/ou RP (figura 3), são negativos para amplificação e/ou superexpressão HER2 e apresentam uma baixa taxa de proliferação celular, com índice de Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas. O luminal B é também positivo para pelo menos um dos receptores hormonais (RE e RP), podem ser positivos ou negativos para HER2, e quando é negativo para HER2, apresentam alta taxa de proliferação celular, com Ki67 igual ou superior a 14%. Atualmente, vem sendo aceito Ki67 de 20% como limiar entre baixo e alto índice de proliferação celular. Os tumores de superexpressão de HER2 são RE e RP negativos e HER2 positivos (figura 4) (8,16–19,23).

O tratamento indicado para carcinomas mamários positivos para receptores hormonais é a terapia hormonal, tal como o tamoxifeno. Ele se liga no RE e impede o estrogênio de ativá-lo, tirando o estímulo de proliferação das células tumorais. Em tumores mamários invasivos que superexpressam HER2 estão indicadas terapias com anticorpos monoclonais contra a proteína HER2, como por exemplo, o trastuzumab (20).



**Figura 3: A – Receptor de estrógeno positivo:** Expressão nuclear forte e difusa (3+/3+) do RE (clone EP1, x100). **B – Receptor de progesterona positivo:** Expressão nuclear forte e difusa (3+/3+) do RP (clone PgR636, x100).



**Figura 4: Escore 3 - Imunomarcção positiva de HER-2:** coloração circunferencial da membrana e grossa, em mais de 10% das células (clone SP3, x200).

## 2 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

### 2.1 Definição/Imunofenótipo

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é um subtipo definido por critério imunohistoquímico. É caracterizado como tumores que não possuem expressão de RE, RP e HER2, ou seja, são negativos para todos esses marcadores (6,7,24–27). Os triplo negativos são um subgrupo de neoplasias que possuem um perfil heterogêneo, apresentam comportamento agressivo, padrões distintos moleculares, morfológicos e de metástases, além de falta de terapias específicas (6,7,24–30).

### 2.2 Epidemiologia; genética e biologia

O CMTN representa aproximadamente 15% dos carcinomas mamários (6,24,26). São diagnosticados cerca de 200.000 casos de triplo negativos por ano. Quando compara-se a idade de acometimento com os luminais, os CMTN são mais comuns em mulheres

com menos de 40 anos de idade (31). Segundo estudo feito por Trivers et al (2009) (32) comparando mulheres de 50 anos e de 40 anos, houve um risco duas vezes maior de desenvolvimento do triplo negativo em mulheres com idade menor ou igual a 39 anos. Além disso, mulheres negras apresentavam mais esse imunofenótipo do que as brancas (32–34).

O subtipo que mais predomina entre mulheres que são portadoras de uma mutação deletéria da linha germinativa no BRCA1 é o carcinoma triplo negativo. Cerca de 57 a 80% das pacientes com diagnóstico de câncer de mama e que são portadoras de mutações BRCA1 exibe o imunofenótipo triplo negativo. Em contrapartida menos de 20 % dos carcinomas mamários esporádicos são CMTN (35–38).

A grande maioria dos tumores *basal-like* são triplo negativos, e a maioria dos carcinomas triplo negativos são basaloides (cerca de 80%). O subtipo basaloides, é caracterizado por um perfil de expressão de genes semelhantes a camada basal-mioepitelial da mama normal, cuja existência foi revelada por estudos de perfil de expressão baseados em *microarray*. Apresentam altas taxas de proliferação celular e demonstram um prognóstico mais reservado (6–8,26,27). Outros subtipos moleculares, mais recentemente descobertos, que também representam subconjuntos de câncer de mama triplo negativo, são *claudin-low* e o molecular apócrino (6,7,28).

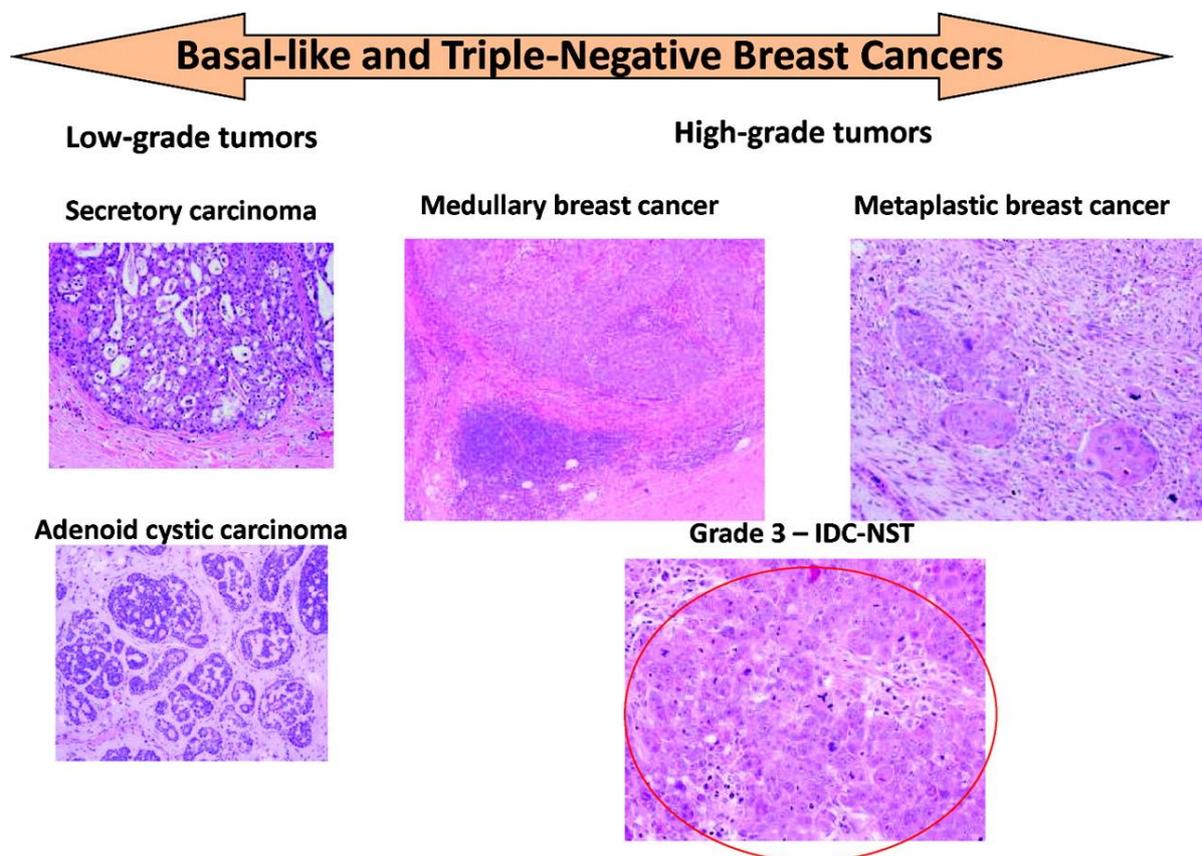
O subtipo molecular *claudin-low*, em comparação com os basaloides, exibe o imunofenótipo triplo negativo em menor frequência (29). Ele representa cerca de 5 a 10% de todos os carcinomas mamários (18,28) e está relacionado a uma menor sobrevida, com prognóstico reservado (39,40). Esse tipo de tumor está associado à pacientes mais jovens, é de alto grau, geralmente são extensos no tamanho, com margens circunscritas e presença de abundante infiltrado inflamatório (39). Eles são ricos em genes associados à transição epitelial para mesenquimal, células-tronco cancerígenas, de genes ligados à resposta imune e de células iniciadoras de câncer. Além de geralmente demonstrarem altos níveis de instabilidade genômica (8,29,39–42).

O subtipo molecular apócrino se apresenta como triplo negativo, porém com quase a totalidade de expressão de receptores androgênicos (RA), os quais estão ausentes nos *claudin-low* e basaloides. Por isso, esse subtipo foi também chamado de receptor de andrógeno luminal. Eles correspondem cerca de 10% dos tumores triplo negativos (28,30).

## 2.3 Morfologia

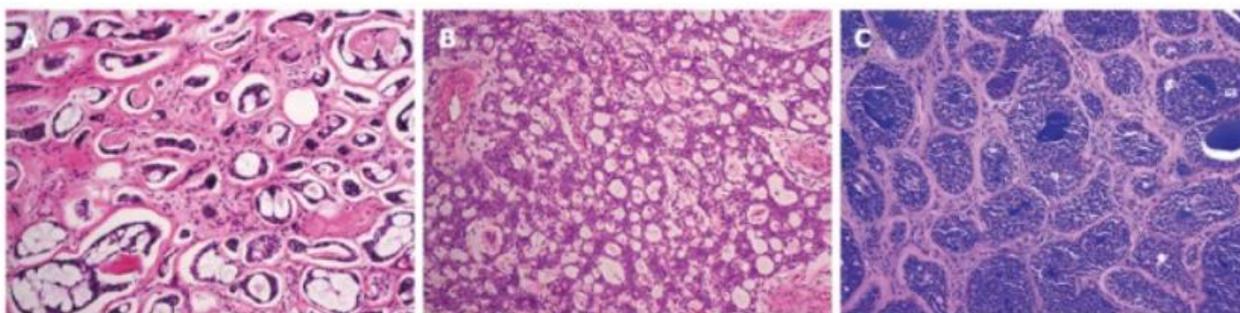
Alguns subtipos de CMTN também podem ser identificados pela avaliação histopatológica. Sendo assim, o subtipo histológico mais comum do CMTN, é o carcinoma ductal invasivo (CDI), correspondendo cerca de 90% de todos os casos de triplo negativos (42,43). Na histologia, os CDI triplo negativos, em sua maioria, são de alto grau (grau III), com núcleos grandes e nucléolos evidentes, apresentam bordas circunscritas ou lobuladas, padrão de crescimento sincicial-like, com fibrose central e/ou necrose e frequentemente com infiltrado linfocitário de permeio (9,28).

Além disso, o CMTN apresenta uma alta prevalência de subtipos histopatológicos raros, como adenoide cístico (90 a 100% dos casos histopatológicos classificados como adenoide cístico são triplo negativos), medular (95%), metaplásico (90%) e apócrino (40 a 60%). (Figura 5) (42,44,45).



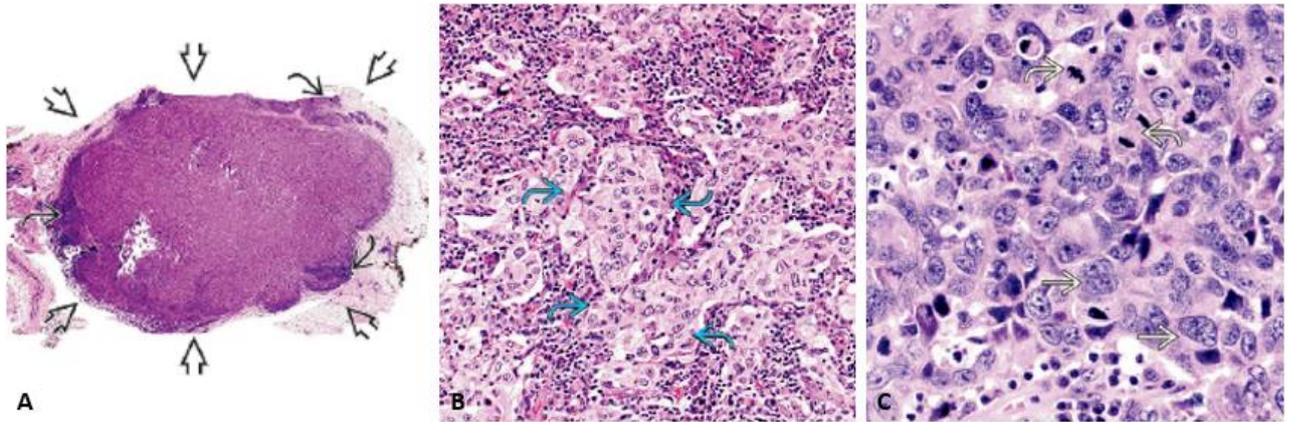
**Figura 5\*:** Subtipos histopatológicos dos carcinomas mamários triplo negativos. À esquerda encontram-se os subtipos adenoide cístico da mama e secretor, sendo relativamente menos agressivos quando comparados com os subtipos representados à direita, que são rapidamente progressivos. IDC-NST: Carcinoma ductal invasivo – tipo não especial. (Coloração H & E; x 100). \*Figura retirada do artigo Hudis CA, et al. 2011. (45)

O carcinoma adenoide-cístico (CAC) apresenta semelhança histológica aos tumores das glândulas salivares. Ele é caracterizado por uma dupla população de células (epiteliais e mioepiteliais) disposto em três padrões arquiteturais: tubular-trabecular, cribriforme e sólido-basaloide. (Figura 6). Macroscopicamente, na maioria dos casos, a neoplasia é bem circunscrita (46). Esse subtipo têm um melhor prognóstico comparado aos demais tumores triplo negativos e também em relação aos CAC das glândulas salivares (39,45,47–50).



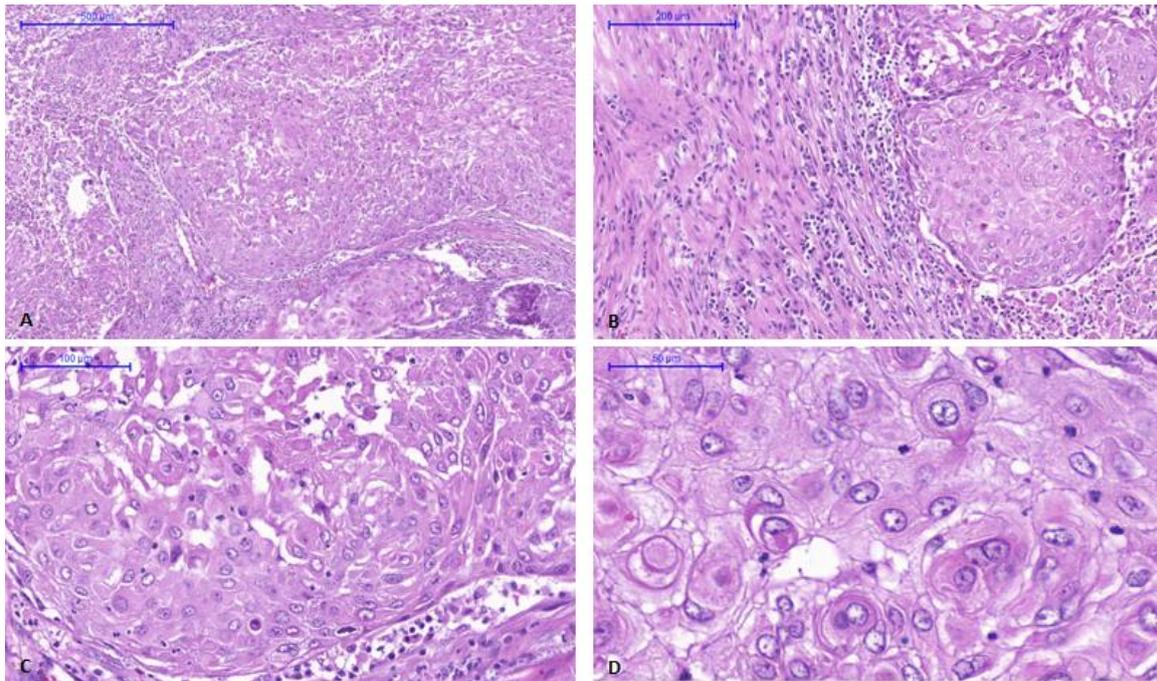
**Figura 6\*:** Carcinoma adenoide-cístico da mama. A: arquitetura tubular-trabecular; B: cribriforme; C: crescimento sólido-basaloide. (Coloração H & E; ampliação original x 100). \*Figura retirada do artigo Miyai K, et al. 2014. (46)

O carcinoma medular ocorre mais frequentemente em pacientes jovens, geralmente em mulheres com mutação do gene BRCA1 (51,52). São raros, correspondendo cerca de 1 a 10 % de todos os carcinomas mamários (53,54). No exame macroscópico são caracterizados por serem bem circunscritos, marrom-acastanhados, com áreas de necrose e hemorragia. Microscopicamente, as células tumorais são pouco diferenciadas (alto grau), com crescimento de padrão sincicial e geralmente com abundante infiltrado linfoplasmocitário de permeio (figura 7). Eles apresentam uma maior taxa de sobrevida comparado ao carcinoma ductal invasivo (54–57).



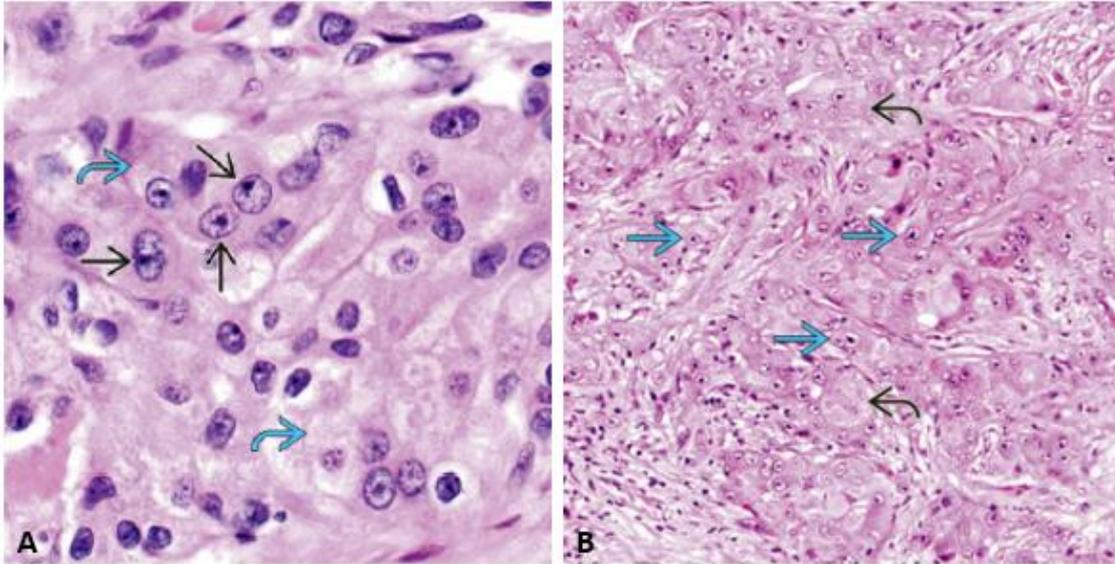
**Figura 7\*:** Carcinoma medular. **A:** borda bem circunscrita (coloração H &E, x40); **B:** crescimento sincicial com extenso infiltrado linfocitário de permeio (coloração H &E, x200); **C:** alto grau nuclear (seta retilínea) e frequente figuras de mitose (seta curva), (coloração H &E, x400). \*Figura retirada do livro Hicks G.D. Diagnostic Pathology – Breast; second edition. 2016; 2(40): 276 – 781 (10).

O carcinoma metaplásico é raro, corresponde menos de 1% de todos os carcinomas mamários. Ele apresenta-se como uma massa grande, bem circunscrita. Na microscopia (figura 8), pode ser constituído em partes ou inteiramente por componentes de células fusiformes, escamosas e/ou mesenquimais (sarcomatoso), além de ter produção de matriz (condroide ou óssea). Esse tumor apresenta prognóstico ruim, principalmente quando há mais de 90% de componente escamoso. Geralmente é mais agressivo e frequentemente refratário ao tratamento (58–62).



**Figura 8: Carcinoma metaplásico:** **A:** carcinoma metaplásico da mama com área predominantemente escamosa (coloração H &E, x40); **B:** transição de área: com células fusiformes e células escamosas (coloração H &E, x100); **C:** células escamosas (coloração H &E, x200); **D:** maior aumento – componente escamoso (coloração H &E, x400).

O carcinoma apócrino invasivo tem uma incidência menor que 1% a 4%. Cerca de 35% dos CMTN com essa morfologia apresentam positividade para receptores de andrógeno. Esse subtipo apresenta características apócrinas em quase todas as células tumorais (mais de 90%). Na histologia, as células são grandes, com citoplasma amplo, eosinofílico, granular e o núcleo claro/vesiculoso com nucléolo evidente (figura 9). O prognóstico é similar aos carcinomas mamários de tipo não especial (62,63).



**Figura 9\*:** Carcinoma apócrino. A (aumento 400x): nucléolo evidente (seta preta), citoplasma granular e eosinofílico (seta azul-curva); B (aumento 200x): crescimento sólido, células tumorais com núcleo redondo e nucléolo proeminente (seta azul) e citoplasma amplo e eosinofílico (seta preta-curva). \*Figura retirada de Hicks G.D. Diagnostic Pathology – Breast; second edition. 2016; 2(51): 366 – 388 (10).

O infiltrado linfocitário presente em alguns tumores é um importante parâmetro morfológico a ser avaliado, especialmente visando possibilidades terapêuticas imunomoduladoras. Alguns estudos mostraram que a infiltração linfocitária no tumor estão ligados ao aumento da resposta à quimioterapia neoadjuvante em carcinomas mamários.<sup>(13,21)</sup> São carcinomas que tem um melhor prognóstico. O subgrupo dos triplo negativos, em geral, tem níveis de infiltrado linfocitário mais elevados do que outros tipos de câncer de mama (64–66).

A proteína de morte celular programada 1 (PD-1) desempenha um importante papel na regulação do sistema imunológico. Ela limita a função efetora de células T nos tecidos. Um dos seus ligantes, o ligante de morte programada 1 (PD-L1), é expresso em células imunológicas, mas pode ser expresso também em vários tipos de neoplasia, entre eles o câncer de mama. Fisiologicamente, a ligação PD-L1/PD-1 promove uma tolerância imunológica nos tecidos periféricos e essa via de sinalização é usada também pelas células tumorais para inibir a imunidade antitumoral (67–71). Agentes imunomoduladores que bloqueiam o eixo PD-1/PD-L1 mostram uma eficácia nessas neoplasias, mas a resposta a essa terapia varia entre os pacientes e estratégias de imunoterapia ainda estão em desenvolvimento (67,72).

## 2.4 Fatores Preditivos e Prognósticos

A quimioterapia neoadjuvante (QN) é o tratamento de escolha dos CMTN até o presente momento. Os pacientes com esse tipo de neoplasia não se beneficiam da terapia endócrina ou anti-HER2 (26). A QN é um tratamento pré-cirúrgico em que permite a redução da carga tumoral, aumenta a taxa de cirurgias conservadoras, pode tratar tumores micrometastáticos de início e guiar a extensão da quimioterapia adjuvante nos casos de resposta patológica incompleta. (73–77).

Os tipos de QN incluem associações de taxanos (por exemplo, paclitaxel, docetaxel) e antraciclina (exemplo, epirrubicina, doxorubicina), com outros medicamentos, como ciclofosfamida e fluorouracil (78). Além disso, a adição de platina (carboplatina) ao tratamento quimioterápico foi investigada como uma abordagem promissora para a otimização da quimioterapia. Em alguns estudos observaram-se que no CMTN, diferente do carcinoma HER2 positivo, os pacientes tiveram uma melhor resposta e um aumento na taxa de sobrevida. A resposta ao tratamento foi melhor em pacientes que não tinham mutação no gene BRCA1 e em pacientes que tinham abundante infiltrado linfocitário tumoral. Em contrapartida, outros estudos não observaram diferença de eficácia com o uso de carboplatina (26).

O CMTN apresenta um pior prognóstico a curto prazo (cinco primeiros anos) quando comparado a outros carcinomas mamários (79–81). Há uma pior sobrevida e um aumento do número de mortes nos três primeiros anos após o diagnóstico. A longo prazo, a taxa de mortalidade e recorrência diminui consideravelmente e é similar aos outros subtipos (80,82).

O CMTN geralmente está associado à metástases precoces viscerais, como fígado, pulmão e cérebro, diferente dos luminais, que apresentam metástases mais tardias e localizadas em osso (45,80,83,84). A média de sobrevida após diagnóstico de metástase cerebral é de seis meses (85,86).

## 2.5 Resposta à Quimioterapia Neoadjuvante

A resposta à quimioterapia avaliada na histologia é caracterizada por fibrose hialina, proliferação de fibroblastos jovens, neoformação de capilar e/ou infiltrado inflamatório crônico, com hemossiderófagos (87).

Segundo o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC 2017), a resposta quimioterápica pode ser completa, parcial ou ausente. A resposta patológica completa (RPC) só pode ser avaliada pela análise histopatológica e é caracterizada por ausência de neoplasia invasora residual na mama e ausência de metástase/micrometástase linfonodal. Presença de carcinoma *in situ* após tratamento, com ausência de carcinoma invasor é também considerado RPC. Quando há tumor infiltrativo residual na mama e/ou metástase em linfonodos, com diminuição do tamanho do tumor original e presença de fibrose hialina entre outras características de resposta na microscopia é resposta parcial e quando não há alteração no tamanho do tumor, ou há aumento do volume tumoral é considerado ausência de resposta à quimioterapia (88).

Nesse contexto, mesmo com todos os conhecimentos expostos, ainda são necessários mais estudos sobre o CMTN. Por ser um dos subtipos de carcinoma mamário mais agressivo, têm-se procurado marcadores prognósticos a fim de se identificar aquelas pacientes que evoluirão com pior desfecho e, dessa forma, criar estratégias para a tentativa de modificar de alguma forma seu tratamento e curso evolutivo.

### 3- REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
2. Matsuda Tomohiro. Breast Source: Globocan 2018. International Agency for Research on Cancer 2018 [Internet]. March. 2019. p. 1–2. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
3. INCA. A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas. 2019. 1–89 p.
4. INCA. Estimativa 2016-2017 [Internet]. Sobre as Estimativas. 2016. 2 p. Available from: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/sobre-as-estimativas.asp>
5. Budczies J, Bockmayr M, Denkert C, Klauschen F, Lennerz JK, Györffy B, et al. Classical pathology and mutational load of breast cancer – integration of two worlds. *J Pathol Clin Res.* 2016;2(1):225–38.
6. William D. Foulkes, M.B., B.S., Ph.D., Ian E. Smith MD, and Jorge S. Reis-Filho, M.D. PD. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1938-48.
7. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *Am J Pathol* [Internet]. 2013;183(4):1113–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>
8. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5–23.
9. Anderson WF et al. How Many Etiological Subtypes of Breast Cancer: Two, Three, Four, or More? *Breast Dis.* 2015;26(4):296–7.
10. David G. Hicks, MD Susan C. Lester, MD P. Diagnostic Pathology Breast. 2016. 238–241 p.
11. Rakha EA, El-Sayed ME, Menon S, Green AR, Lee AHS, Ellis IO. Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;111(1):121–7.
12. Engstrøm MJ, Opdahl S, Vatten LJ, Haugen OA, Bofin AM. Invasive lobular breast cancer: The prognostic impact of histopathological grade, E-cadherin and molecular subtypes. *Histopathology.* 2015;66(3):409–19.

13. David G. Hicks, MD Susan C. Lester, MD P. *Diagnostic Pathology Breast*. 2016. 250–257 p.
14. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Ress CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
15. Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. *Pathology*. 2017;49(2):111–9.
16. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736–50.
17. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina*. 2011;39.
18. Lachapelle J, Foulkes WD. Triple-negative and basal-like breast cancer: Implications for oncologists. *Curr Oncol*. 2011;18(4):161–4.
19. Barros ACS de, Leite KRM. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. *Rev Bras Mastol*. 2015;25(4):146–55.
20. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J. Lakhani, S.R., Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver M. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. 2012. 22 p.
21. Haddad CF. Trastuzumab no câncer de mama. *Femina* [Internet]. 2010;38(2):73–8. Available from: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2010/v38n2/a001.pdf>
22. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 2001;37(SUPPL. 4):3–8.
23. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;153(3):477–91.
24. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer - Current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009;20(12):1913–27.
25. Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology*. 2008;22(11):1233–9.
26. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, von Minckwitz G. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *Lancet* [Internet]. 2017;389(10087):2430–42. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0)

27. Rakha E.A. et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):9–11.
28. Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of Triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(23):6380–8.
29. Sabatier R, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Chaffanet M, Viens P, et al. Claudin-low breast cancers: Clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. *Mol Cancer.* 2014;13(1):1–14.
30. Brian D. Lehmann, Joshua A. Bauer, Xi Chen MES, A. Bapsi Chakravarthy YS and JAP. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. 2011;121(7).
31. Carey K Anders M, Lisa A Carey M. ER/PR negative, HER2-negative (triple-negative) breast cancer. In 2019.
32. Trivers K et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control.* 2009;20(7):1071–1082.
33. Gierach GL, Burke A, Anderson WF. Epidemiology of triple negative breast cancers. *Breast Dis.* 2010;32(1–2):5–24.
34. Millikan RC et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2008;109(1):123–39. Available from: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351538762%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1007/s10549-007-9632-6%5Cnhttp://sfx.galib.uga.edu/sfx\\_emu1?sid=EMBASE&iissn=01676806&id=doi:10.1007/s10549-007-9632-6&atitle=Epidemiology+of+basal-](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351538762%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1007/s10549-007-9632-6%5Cnhttp://sfx.galib.uga.edu/sfx_emu1?sid=EMBASE&iissn=01676806&id=doi:10.1007/s10549-007-9632-6&atitle=Epidemiology+of+basal-)
35. Phipps AI, Buist DSM, Malone KE, Barlow WE, Porter PL, Kerlikowske K, et al. Family history of breast cancer in first-degree relatives and triple-negative breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;126(3):671–8.
36. Foulkes W.D. et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(9):19–22.
37. Gonzalez-angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Jennifer K, Potter J, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):1082–9.
38. Abramson VG, Lehmann BD, Ballinger TJ, Pietenpol JA. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer.* 2015;121(1):8–16.
39. Dias K, Dvorkin-Gheva A, Hallett RM, Wu Y, Hassell J, Pond GR, et al. Claudin-low breast cancer; clinical & pathological characteristics. *PLoS One.* 2017;12(1):1–

- 17.
40. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5).
  41. Hennessy BT, Stenke-hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee J, Fridlyand J, et al. Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. *Cancer Res.* 2010;69(10):4116–24.
  42. Khosravi-Shahi P, Cabezón-Gutiérrez L, Custodio-Cabello S. Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018;14(1):32–9.
  43. Reddy GM, Suresh PK, Pai RR. Clinicopathological features of triple negative breast carcinoma. *J Clin Diagnostic Res.* 2017;11(1):EC05–8.
  44. Criscitiello C, Azim HA, Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2012;23(SUPPL. 6).
  45. Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. *Oncologist* [Internet]. 2011;16 Suppl 1(suppl 1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278435>
  46. Miyai K. Adenoid cystic carcinoma of breast: Recent advances. *World J Clin Cases.* 2014;2(12):732.
  47. Ghabach B, Anderson WF, Curtis RE, Huycke MM, Lavigne JA, Dores GM. Adenoid cystic carcinoma of the breast in the United States (1977 to 2006): A population-based cohort study. *Breast Cancer Res.* 2010;12(4).
  48. WELLS CA, NICOLL S, FERGUSON DJP. Adenoid cystic carcinoma of the breast: a case with axillary lymph node metastasis. *Histopathology.* 1986;10(4):415–24.
  49. Wetterskog D, Lopez-Garcia MA, Lambros MB, A'Hern R, Geyer FC, Milanezi F, et al. Adenoid cystic carcinomas constitute a genomically distinct subgroup of triple-negative and basal-like breast cancers. *J Pathol.* 2012;226(1):84–96.
  50. Martelotto LG, De Filippo MR, Ng CK, Natrajan R, Fuhrmann L, Cyrt J, et al. Genomic landscape of adenoid cystic carcinoma of the breast. *J Pathol.* 2015;237(2):179–89.
  51. Armes JE, Venter DJ. The pathology of inherited breast cancer. *Pathology.* 2002;34(4):309–14.

52. Farshid G, Balleine RL, Cummings M, Waring P, Cuninghame TK. Morphology of Breast Cancer as a Means of Triage of Patients for BRCA1 Genetic Testing *Gelareh*. 2006;30(11):1357–66.
53. Rosen P. P et al. Medullary carcinoma of the breast. *APMIS, Suppl*. 1997;105(75):5–31.
54. Wargotz ES, Silverberg SG. Medullary carcinoma of the breast: A clinicopathologic study with appraisal of current diagnostic criteria. *Hum Pathol*. 1988;19(11):1340–6.
55. Rakha EA, Aleskandarany M, El-Sayed ME, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO, et al. The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer [Internet]*. 2009;45(10):1780–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.02.014>
56. Vu-Nishino H, Tavassoli FA, Ahrens WA, Haffty BG. Clinicopathologic features and long-term outcome of patients with medullary breast carcinoma managed with breast-conserving therapy (BCT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;62(4):1040–7.
57. Huober J, Gelber S, Goldhirsch A, Coates AS, Viale G, öhlschlegel C, et al. Prognosis of medullary breast cancer: Analysis of 13 International Breast Cancer Study Group (IBCSG) trials. *Ann Oncol*. 2012;23(11):2843–51.
58. Lim KH, Oh DY, Chie EK, Han W, Im SA, Kim TY, et al. Metaplastic breast carcinoma: Clinicopathologic features and prognostic value of triple negativity. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(2):112–8.
59. Rakha EA, Tan PH, Varga Z, Tse GM, Shaaban AM, Climent F, et al. Prognostic factors in metaplastic carcinoma of the breast: A multi-institutional study. *Br J Cancer [Internet]*. 2015;112(2):283–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2014.592>
60. Pezzi CM, Patel-Parekh L, Cole K, Franko J, Klimberg VS, Bland K. Characteristics and treatment of metaplastic breast cancer: Analysis of 892 cases from the national cancer data base. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(1):166–73.
61. Schwartz TL, Mogal H, Papageorgiou C, Veerapong J, Hsueh EC. Metaplastic breast cancer: Histologic characteristics, prognostic factors and systemic treatment strategies. *Exp Hematol Oncol*. 2013;2(1):1–6.
62. Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N, Cancellato G, Iorfida M, Balduzzi A, et al. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: Histologic subtyping to inform

- the outcome. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2013;13(1):31–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2012.09.002>
63. O'Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. *Histopathology*. 2008;52(1):3–10.
  64. Denkert C, Von Minckwitz G, Brase JC, Sinn B V., Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*. 2015;33(9):983–91.
  65. Luen SJ, Savas P, Fox SB, Salgado R, Loi S. Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer. *Pathology*. 2017;49(2):141–55.
  66. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer*. 1992;28(4–5):859–64.
  67. Sobral-Leite M, Van de Vijver K, Michaut M, van der Linden R, Hooijer GKJ, Horlings HM, et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, BRCA1-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018;7(12):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1509820>
  68. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887–95.
  69. Mittendorf EA, Philips A V, Meric-bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. 2014;28.
  70. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793–800.
  71. Mezzadra R, Sun C, Jae LT, Gomez-Eerland R, De Vries E, Wu W, et al. Identification of CMTM6 and CMTM4 as PD-L1 protein regulators. *Nature* [Internet]. 2017;549(7670):106–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature23669>
  72. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455–65.

73. Harbeck N, Gluz O. Neoadjuvant therapy for triple negative and HER2-positive early breast cancer. *Breast* [Internet]. 2017;34:S99–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2017.06.038>
74. Zhang L, Wang XI, Zhang S. Tumor-infiltrating lymphocyte volume is a better predictor of neoadjuvant therapy response and overall survival in triple-negative invasive breast cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2018;80:47–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.05.024>
75. Kaufmann M, Von minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, Mcgale P, Bonnefoi H, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: New perspectives 2006. *Ann Oncol*. 2007;18(12):1927–34.
76. Andrade DAP de, Zucca-Matthes G, Vieira RA da C, Andrade CT de AE de, Costa AM da, Monteiro AJ de C, et al. Neoadjuvant chemotherapy and pathologic response: a retrospective cohort. *Einstein (Sao Paulo)*. 2013;11(4):446–50.
77. Silva EHL de S, Paloschi JRA, Caldeira JR de F, Joioso A. Estudo comparativo de resposta à quimioterapia neoadjuvante em dose total, entre câncer de mama e metástase axilar, conforme resultados de imunoistoquímica, no Serviço de Mastologia do Hospital Amaral Carvalho em Jaú, SP. *Rev Bras Mastol*. 2015;25(2):46–50.
78. Desa DE, Bhanote M, Hill RL, Majeski JB, Buscaglia B, D'Aguiar M, et al. Second-harmonic generation directionality is associated with neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer core needle biopsies. *J Biomed Opt*. 2019;24(08):1.
79. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15):4429–34.
80. Lin N.U et al. Clinicopathological Features, Patterns of Recurrence, and Survival Among Women With Triple-Negative Breast Cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 2012;22(118):5463–72.
81. Sørliie 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 U S A*. 2003;100(14):8418–23.
82. 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. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275–81.

83. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008;68(9):3108–14.
84. Lin N U et al. Sites of Distant Relapse and Clinical Outcomes in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: High Incidence of Central Nervous System Metastases. *Cancer.* 2008;113(10):2638–45.
85. Niwińska A, Murawska M, Pogoda K. Breast cancer subtypes and response to systemic treatment after whole-brain radiotherapy in patients with brain metastases. *Cancer.* 2010;116(18):4238–47.
86. Anders C K et al. The Prognostic Contribution of Clinical Breast Cancer Subtype, Age and Race among Patients with Breast Cancer Brain Metastases Carey. *Cancer.* 2011;117(8):1602–11.
87. Osório CABT, Júnior MAC, Soares FA. Avaliação de resposta patológica em câncer de mama após quimioterapia neoadjuvante: Padronização de protocolo adaptado. *J Bras Patol e Med Lab.* 2012;48(6):447–53.
88. MahuI B. Amin, MD F. *AJCC Cáncer Staging Manual.* 2017. 589–626 p.



## **Justificativa**

## **JUSTIFICATIVA**

Apesar de todos os estudos realizados e os conhecimentos expostos, ainda existe uma busca por um maior entendimento do tema, com informações que possam ter uma aplicabilidade clínica. Esse estudo propôs, de forma mais prática, econômica e com aplicação clínica viável, caracterizar morfolologicamente os carcinomas mamários triplo negativos, subdividindo os mesmos segundo parâmetros histológicos pré-determinados, baseados na observação da rotina diária do patologista e associá-los com a resposta terapêutica à quimioterapia neoadjuvante, tratamento de escolha desse grupo até o presente momento. A proposta deste estudo é mostrar resultados que corroboram com a literatura, identificando características morfológicas dos tumores que se associam a uma boa resposta à quimioterapia neoadjuvante.



# Objetivos

## **OBJETIVOS**

### **A) GERAIS**

- Associar as características morfológicas dos carcinomas mamários triplo negativos com a resposta terapêutica à quimioterapia neoadjuvante.

### **B) ESPECÍFICOS**

- Associar o infiltrado linfocitário intratumoral com a resposta à quimioterapia neoadjuvante.
- Associar o estroma tumoral com a resposta à quimioterapia neoadjuvante.
- Associar a celularidade tumoral com a resposta à quimioterapia neoadjuvante.
- Caracterização epidemiológica das pacientes com câncer de mama triplo negativo.

# Artigo

\*Artigo científico apresentado conforme as normas especificadas no Human Pathology (acessado por

<https://www.elsevier.com/journals/human-pathology/0046-8177/guide-for-authors>)

## Artigo científico

### CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E ASSOCIAÇÃO COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE.

Jéssica Oliveira Carvalho<sup>1</sup>, Mariângela Esther Alencar Marques<sup>2</sup>, Eduardo Carvalho Pessoa<sup>3</sup>, Fernando Carlos de Lânder Schmitt <sup>4</sup>

(1) MD, MSc, residente de patologia do Departamento de Patologia/ Faculdade de medicina/ Universidade Estadual Paulista- FMB UNESP (email: joliveiracarvalho@icloud.com)

(2) MD, PhD, patologista, Docente Depto. De Patologia FMB UNESP (email: mmarques@fmb.unesp.br)

(3) MD, PhD, mastologista, Docente Depto De Mastologia FMB UNESP (email: carvalho-pessoa@hotmail.com)

(4) MD, PhD, patologista, Professor da Universidade do Porto/IPATIMUP (email: fschmitt@ipatimup.pt)

Endereço para correspondência: Rua Castro Alves, 1014 – Centro, Jataí – GO, Brasil. CEP: 75800021

HUMAN PATHOLOGY

#### **RESUMO:**

**Introdução:** O Câncer de Mama é uma doença complexa e heterogênea que compreende vários subtipos biologicamente definidos. O carcinoma mamário triplo negativo (CMTN) é um subtipo definido por critério imuno-histoquímico, caracterizado como tumores negativos para receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) e HER2. Eles apresentam comportamento agressivo, padrões distintos moleculares e morfológicos, além de falta de terapias específicas. **Objetivos:** Associar as características morfológicas dos CMTN com a resposta terapêutica à quimioterapia neoadjuvante. **Materiais e métodos:** Selecionou-se 76 amostras de pacientes com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma mamário triplo negativo, no período entre 2008 e 2018. Foram analisados dados clínicos/epidemiológicos; avaliadas as características

morfológicas microscópicas (infiltrado linfocitário, estroma e celularidade tumoral) e a resposta à quimioterapia neoadjuvante. **Resultados:** A associação entre o infiltrado inflamatório e a resposta à quimioterapia neoadjuvante foi estatisticamente significativa ( $p = 0.0103$ ). Dos 19 casos que tiveram resposta completa à quimioterapia neoadjuvante, 15 (78,95%) apresentavam infiltrado inflamatório linfocitário (moderado a intenso) e 4 (21,05%) apresentavam pouco ou nenhum infiltrado. Em relação as pacientes que tiveram ausência de resposta ao tratamento, 10 biópsias (71,43%) não continham linfócitos, enquanto apenas 4 biópsias (28,57%) apresentavam infiltrado linfocitário (moderado a abundante). Quando se avaliou o estroma ou a celularidade tumoral, com infiltrado linfocitário e resposta à quimioterapia, independentemente de estroma/celularidade tumoral serem abundantes ou escasso, houve uma boa resposta quimioterápica quando havia moderado a intenso infiltrado linfocitário. **Conclusão:** O infiltrado inflamatório linfocitário é um importante parâmetro morfológico a ser avaliado, já que está associado com boas respostas à quimioterapia neoadjuvante.

**Palavras-chave:** neoplasias da mama; neoplasias de mama triplo negativas; quimioterapia; linfócitos; prognóstico.

## 1- INTRODUÇÃO

O Câncer de Mama é a neoplasia maligna que representa a causa mais comum de morte entre as mulheres no mundo. As últimas estimativas do projeto Globocan, realizado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em 2018, revelaram que a incidência de câncer de mama foi de 2.088.849 (11.6%) casos, sendo registrados 626.679 (6.6%) óbitos por essa doença (1,2).

O câncer de mama mais comum é o carcinoma mamário, uma doença complexa e heterogênea, que compreende vários subtipos biologicamente definidos, associados a comportamentos clínicos distintos, com diferentes respostas à terapêutica, exigindo estratégias de tratamento específicas (3,4).

Estudo feito por Perou et al (5), classificou o carcinoma mamário em cinco subtipos moleculares inicialmente, através de estudos de perfil de expressão baseados em *microarray* feito com 8102 genes. São eles: *normal like*, luminal A, luminal B, superexpressão de HER2 e basaloide (*basal like*).

A identificação molecular desses biomarcadores por *microarray* de DNA é baseada em análise complexa de expressão gênica e tem elevado custo. Na prática clínica, a imunohistoquímica é utilizada para identificar subtipos imuno-histoquímicos que se aproximam da classificação molecular (3). A classificação imuno-histoquímica demonstrou correspondência aceitável com as análises genômicas, sendo utilizada na rotina, como método simples, financeiramente viável, com a vantagem de avaliar a expressão de proteínas no contexto da morfologia do tumor (6, 7).

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é um subtipo definido por critério imuno-histoquímico. É caracterizado como tumores que não possuem expressão de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) e HER2, ou seja, são negativos para todos esses marcadores (8-10). Os triplo negativos são um subgrupo de neoplasias que possuem um perfil heterogêneo, apresentam comportamento agressivo, padrões distintos moleculares, morfológicos e de metástases, além de falta de terapias específicas (11-13). Eles representam aproximadamente 15% dos carcinomas mamários (8,9).

Os pacientes do subgrupo triplo negativo, do ponto de vista clínico, não se beneficiam de terapia endócrina ou anti-HER2. A quimioterapia é o tratamento de escolha desse grupo, sendo frequentemente empregado o tratamento neoadjuvante para reduzir a carga tumoral, aumentando as taxas de cirurgias conservadoras, e como guia para extensão da quimioterapia adjuvante nos casos de resposta patológica incompleta (14-16).

Os subtipos de CMTN têm respostas diferentes à quimioterapia neoadjuvante. Apesar do seu prognóstico desfavorável quando considerado um grupo único, muitos subtipos de tumores que são triplo negativos respondem bem à quimioterapia (9). A resposta à quimioterapia avaliada na histologia é caracterizada por fibrose hialina, proliferação de fibroblastos jovens, neoformação de capilar e/ou infiltrado inflamatório crônico, com hemossiderófagos (17).

Apesar de todos os estudos realizados e os conhecimentos expostos, ainda existe uma busca por um maior entendimento do tema, com informações que possam ter uma aplicabilidade clínica. O presente estudo identificou casos de CMTN, caracterizando-os quanto a critérios epidemiológicos, clínicos e morfológicos e investigou a correspondência com a resposta à quimioterapia neoadjuvante.

## **2- MATERIAIS E MÉTODOS**

## 2.1-Casuística, seleção de casos e delineamento do estudo

Selecionou-se 76 amostras de pacientes com diagnóstico anatomopatológico de carcinoma mamário triplo negativo (RE, RP e HER2 negativos), no período de janeiro de 2008 até dezembro de 2018, provenientes do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (HC-FMB-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil). Os pacientes foram selecionados por meio de um levantamento retrospectivo de laudos do departamento e revisão de prontuário.

Foram selecionados para a pesquisa todos os casos negativos para RE, RP e HER2, incluindo casos originalmente duvidosos na imuno-histoquímica (score 2) para HER2 com subsequente comprovação de negatividade pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (não amplificado). Foram identificadas um total de 73 pacientes. Três desses pacientes apresentavam dois carcinomas triplo negativos diferentes (bilaterais), correspondendo um total de 76 casos que cumpriram estes requisitos.

Foram analisados dados clínicos/epidemiológicos como a idade das pacientes e o tamanho dos tumores iniciais, que foram obtidos através de exames de imagem no momento do diagnóstico do nódulo/massa (antes da realização da quimioterapia neoadjuvante). Além disso, foram avaliadas três variáveis, que correspondem as características morfológicas microscópicas dos tumores triplo negativos: infiltrado linfocitário, estroma e celularidade tumoral e avaliada a resposta à quimioterapia neoadjuvante (resposta completa, parcial ou ausência de resposta). O estudo tem a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa (CEP) da FMB – UNESP (CAAE: 91391218.9.0000.5411; protocolo 2.763.589; vide anexo).

## 2.2-Avaliação imunofenotípica

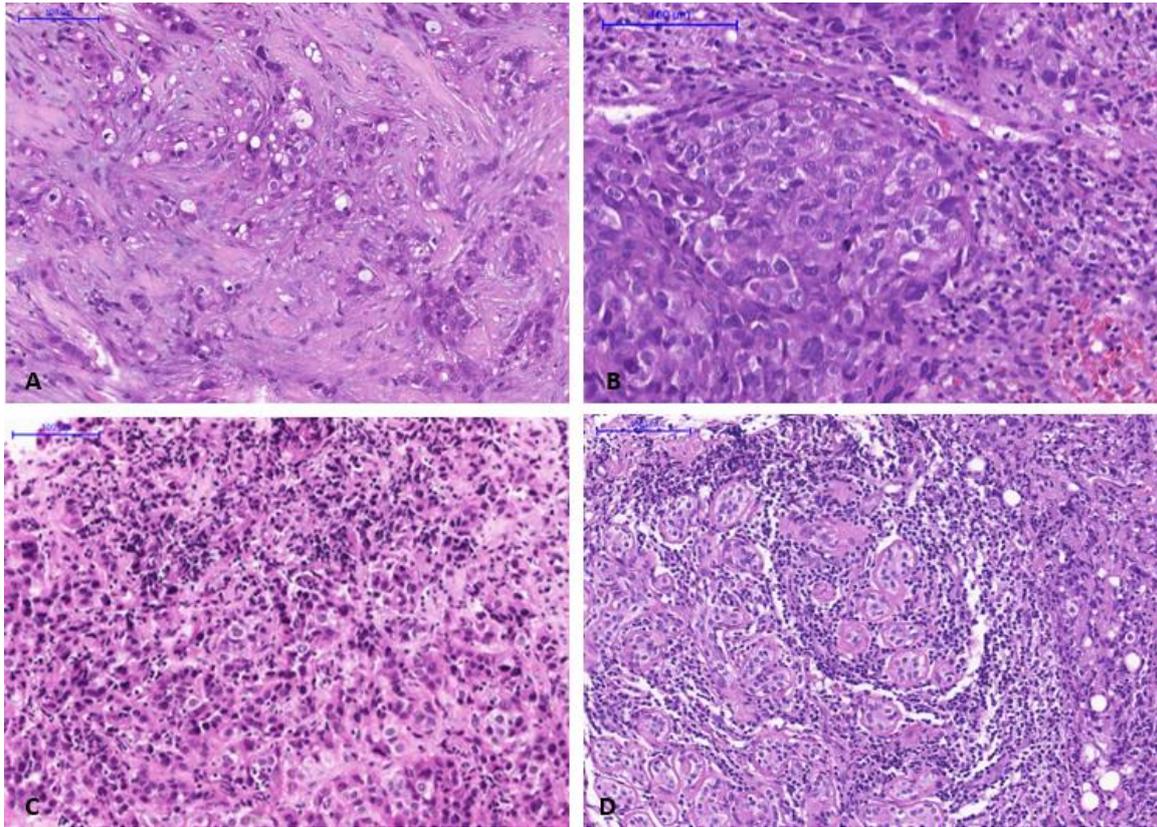
O painel imuno-histoquímico é rotineiramente realizado com os marcadores de RE, RP, HER2 e Ki67, no departamento de Patologia do HCFMB para todos os casos de carcinoma mamário. O estudo imuno-histoquímico utiliza o sistema de detecção de

polímeros com revelação pelo cromógeno diaminobenzidina e contra-coloração com hematoxilina. Todos os anticorpos tiveram como fonte: DAKO. Foi utilizado o clone EP 1, com diluição “pronta para uso” no anticorpo RE. O RP, com diluição também “pronta para uso”, com clone PgR636 e o anticorpo HER-2 foi utilizado numa diluição 1:1000, clone SP3.

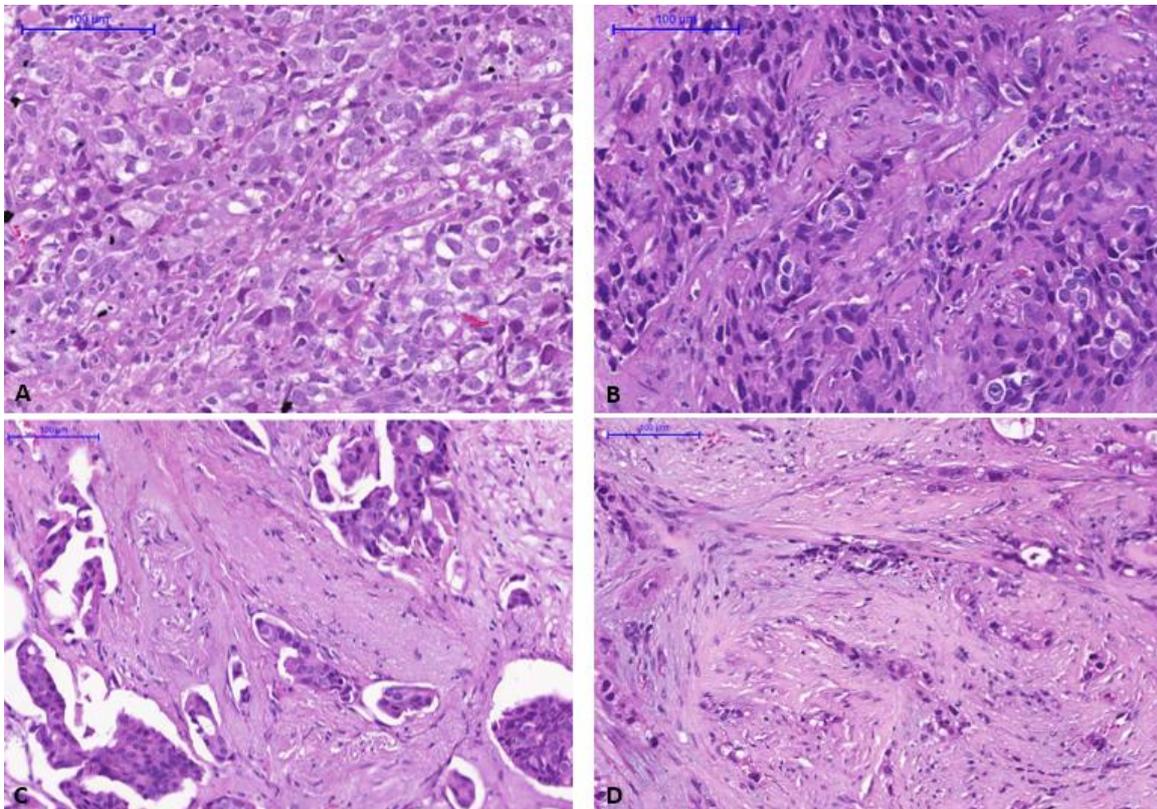
### *2.3-Avaliação morfológica*

Após a seleção dos 76 casos triplo negativos foram revisadas todas as respectivas lâminas coradas pelas colorações de hematoxilina-eosina (HE) das biópsias percutâneas por agulha grossa das lesões mamárias. Foram avaliadas três características morfológicas, separadamente, por dois autores patologistas (M.E.A.M. e J.O.C.): inflamação, estroma e celularidade tumoral.

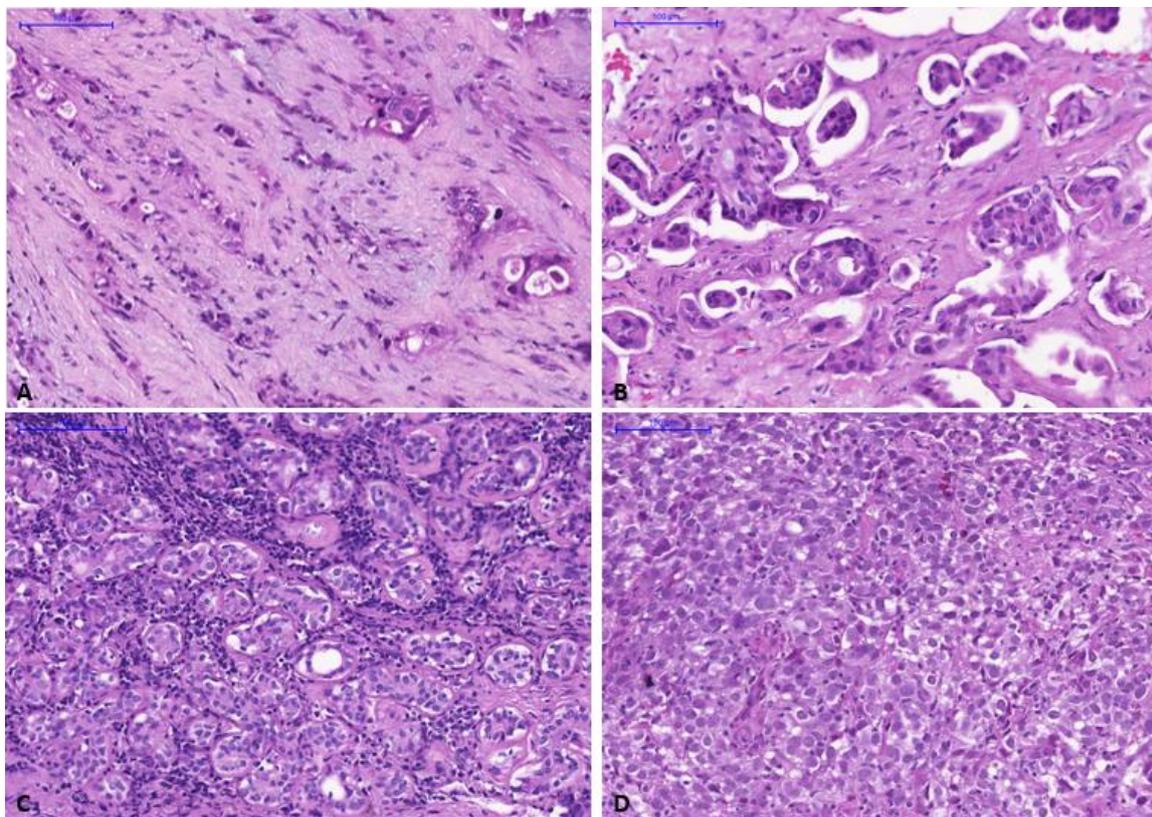
Foi avaliado apenas infiltrado inflamatório mononuclear representado por linfócitos intratumorais. A inflamação, a quantidade de estroma intratumoral e a celularidade tumoral foram graduados de acordo com a intensidade em cruces/porcentagens: 1+ (0 a 25%), 2+ (26 a 50%); 3+ (51 a 75%); 4+ (> 75%). Sendo que 1+ foi considerado “pouco/nenhum”; 2+ e 3+ “moderado” e 4+ “intenso”. Para efeito de comparação, os casos com intensidade 1+ foram denominados de 0 (negativo/escasso) e os casos 2+; 3+ e 4+ foram denominados de 1 (positivo/moderado a abundante) (figuras 1, 2 e 3). As análises das características morfológicas foram feitas em todo o fragmento representado na lâmina, em um aumento de 200x e quando necessário, em 400x. Foi realizada a média da variável em toda a lesão invasora. Não foram consideradas na graduação áreas de necrose e áreas sem invasão e/ou áreas não tumorais (18).



**Figura 1:** Exemplos de semiquantificação usada para avaliar a intensidade de infiltrado linfocitário (escala de cruzes). A: 1+ (0 a 25% de linfócitos); B: 2+ (26 a 50% de linfócitos); C: 3+ (51 a 75% de linfócitos); D: 4+ (> 75% de linfócitos); coloração H &E, x200.



**Figura 2:** Exemplos de semiquantificação usada para avaliar a intensidade de estroma intratumoral (escala de cruzes). A: 1+ (até 25% de estroma); B: 2+ (26 a 50% de estroma); C: 3+ (51 a 75% de estroma); D: 4+ (> 75% de estroma); coloração H &E, x200.



**Figura 3:** Exemplos de semiquantificação usada para avaliar a intensidade de celularidade tumoral (escala de cruzes). A: 1+ (até 25% de celularidade); B: 2+ (26 a 50% de celularidade); C: 3+ (51 a 75% de celularidade); D: 4+ (> 75% de celularidade); coloração H &E, x200.

#### *2.4-Avaliação da resposta à quimioterapia neoadjuvante*

Após a graduação morfológica foi feita uma associação desses grupos morfológicos com as respostas ao tratamento quimioterápico neoadjuvante. A avaliação da resposta à quimioterapia neoadjuvante foi feita através do estudo histopatológico das peças cirúrgicas mamárias. Na macroscopia, as peças foram mapeadas e posteriormente, foram realizadas amostras representativas de todo o leito tumoral. Peças que não apresentaram neoplasia residual foram completamente amostradas para o exame histopatológico. A resposta à

quimioterapia foi classificada como: resposta patológica completa (RPC), parcial e sem resposta conforme a classificação do *American Joint Committee on Cancer* (19).

Sendo assim, A RPC foi avaliada pela análise histopatológica e caracterizada por ausência de neoplasia invasora residual na mama e ausência de metástase/micrometástase linfonodal. Presença de carcinoma *in situ* após tratamento, com ausência de carcinoma invasor também foi considerado RPC. Quando havia tumor infiltrativo residual na mama e/ou metástase em linfonodos, com diminuição do tamanho do tumor original e presença de fibrose hialina entre outras características de resposta na microscopia foi considerado resposta parcial e quando não havia alteração no tamanho do tumor, ou havia aumento do volume tumoral foi considerado ausência de resposta à quimioterapia (19).

### *2.5-Análise estatística*

Para verificar a associação entre a variável “reposta à quimioterapia” e as variáveis explanatórias (inflamação, estroma, celularidade tumoral e tamanho) foi realizado um teste Qui quadrado ou Exato de Fisher, quando necessário. Considerou-se como nível de significância  $p < 0,05$ . Todas as análises foram elaboradas usando-se o programa estatístico SAS versão 9.4.

### 3- RESULTADOS

Na análise epidemiológica, observou-se que das 73 pacientes, 41 (56,16%) delas tinham idade inferior ou igual a 50 anos, sendo que 17 (23,29%) delas apresentavam idade menor ou igual a 40 anos e 24 (32,88%) entre 40 a 50 anos. Além disso, 32 mulheres (43,84%) tinham mais de 50 anos. As análises descritivas do tamanho inicial, características morfológicas dos tumores e a resposta à quimioterapia neoadjuvante são demonstradas na tabela 1. Todas as pacientes com menos de 40 anos apresentavam tumores com medidas superiores a 2,0 cm ( $p=0,046$ ) (Tabela 2).

*Tabela 1. Avaliação clínica-epidemiológica; características morfológicas e resposta à quimioterapia neoadjuvante*

<b>Tamanho</b>	<b>N (=76)</b>	<b>Percentual (%)</b>
≤1,0 cm	4	5,26
1,1 cm a 2,0 cm	9	11,84
2,1 cm a 5,0 cm	49	64,47
> 5,0 cm	14	18,42
<b>Infiltrado linfocitário</b>		
Ausente *	37	48,68
Presente **	39	51,32
<b>Estroma intratumoral</b>		
Escasso *	14	18,42
Abundante **	62	81,58
<b>Celularidade tumoral</b>		
Escassa*	18	23,68
Abundante **	58	76,32
<b>Resposta à quimioterapia</b>		
Ausente	14	18,00
Parcial	43	57,00
Completa	19	25,00

\*ausente/escasso: 1+; \*\* moderado a abundante: 2+ a 4+.

Tabela 2. Associação das variáveis idade e tamanho do tumor inicial

IDADE	TAMANHO*				P-valor
	≤ 1,0	1,1 – 2,0	2,1 – 5,0	>5,0	
≤ 40	0	0	10(20,83%)	7 (50%)	0,046
40 - 50	2 (100%)	4 (44,44%)	15(31,25%)	3 (21,43%)	
>50	0	5 (55,56%)	23(47,92%)	4 (28,57%)	

\*Tamanho inicial do tumor em centímetros.

Quanto ao esquema de quimioterapia usado, dos 76 tumores, 39 casos (52%) usaram o esquema de 4 ciclos de doxorrubicina (antraciclina) associada a ciclofosfamida seguidos por 8 ciclos semanais de paclitaxel (taxano) (4AC+8T), 16 deles (21%) utilizaram 4 ciclos de doxorrubicina associada a ciclofosfamida seguidos por 12 ciclos semanais de paclitaxel com carboplatina (4AC+12TC'); 8 casos (10%) usaram o esquema anterior sem a carboplatina (4AC + 12T) e 13 (17%) usaram seis ciclos de carboplatina associado ao taxano (6TC'). Sendo que, dos 19 tumores que tiveram resposta completa pós tratamento, 8 deles foram usados o esquema 4 ciclos de antraciclina (A) e ciclofosfamida (C), seguidos de 12 ciclos de taxano (T) e carboplatina (C'); um caso usou 4 ciclos de AC, seguidos de 12 ciclos de T; 7 casos usaram 4 ciclos de AC + 8 ciclos de T e 3 deles o esquema de 6 ciclos de carboplatina com taxano.

A associação entre a variável infiltrado inflamatório e a resposta à quimioterapia neoadjuvante foi estatisticamente significativa ( $p = 0.0103$ ). Dos casos que tiveram resposta completa à quimioterapia neoadjuvante, a maioria apresentava infiltrado inflamatório linfocitário (moderado a intenso) (Tabela 3). A associação entre estroma intratumoral e celularidade tumoral com a resposta à quimioterapia neoadjuvante também estão referidas na tabela 3.

Quando se associou as características morfológicas das biópsias, infiltrado linfocitário e estroma intratumoral, com a resposta à quimioterapia neoadjuvante, observou-se que quando há infiltrado inflamatório, independente do estroma ser escasso ou abundante, há uma melhor resposta quimioterápica. Resultados semelhantes são encontrados quando se associa infiltrado inflamatório com celularidade tumoral e a resposta à quimioterapia. Porém, não houve significância estatística nessas associações (Tabela 3).

Tabela 3. Associação das variáveis: infiltrado linfocitário; estroma e celularidade tumoral com a resposta à quimioterapia neoadjuvante (resposta patológica)

		Resposta patológica			p-valor
		Ausente (n=14)	Parcial (n=43)	Completa (n=19)	
<b>Infiltrado linfocitário</b>	Ausente	10 (71,43%)	23 (53,49%)	4 (21,05%)	<b>0,0103</b>
	Presente	4 (28,57%)	20 (46,51%)	15 (78,95%)	
<b>Estroma Intratumoral</b>	Escasso	2 (14,29%)	9 (20,93%)	3 (15,79%)	0,8512
	Abundante	12 (85,71%)	34 (79,07%)	16 (84,21%)	
<b>Celularidade tumoral</b>	Escasso	2 (14,29%)	12 (27,91%)	4 (21,05%)	0,6211
	Abundante	12 (85,71%)	31 (72,09%)	15 (78,95%)	

		Resposta Patológica			P-valor
		Ausente(n=14)	Parcial(n=43)	Completa(n=19)	
<b>Infiltrado Linfocitário</b>	<b>Estroma intratumoral</b>				
Presente	Abundante	4 (28,57%)	17 (39,53%)	13 (68,42%)	0,120
Presente	Escasso	0	3 (6,98%)	2 (10,53%)	
Ausente	Abundante	8 (57,14%)	17 (39,53%)	3 (15,79%)	
Ausente	Escasso	2 (14,29%)	6 (13,95%)	1 (5,26%)	
<b>Infiltrado Linfocitário</b>	<b>Celularidade Tumoral</b>				
Presente	Abundante	3 (21,43%)	15 (34,88%)	11 (57,89%)	0,063
Presente	Escasso	1 (7,14%)	5 (11,63%)	4 (21,05%)	
Ausente	Abundante	9 (64,29%)	16 (37,21%)	4 (21,05%)	
Ausente	Escasso	1 (7,14%)	7 (16,28%)	0	

Houve associação de tumores com tamanho entre 2,0 cm a 5,0 cm, infiltrado inflamatório e resposta à quimioterapia ( $p = 0,006$ ). Quando associam os outros tamanhos, o valor de  $p$  não foi significativo. Os dados estão resumidos na tabela 4.

*Tabela 4. Associação de tamanho tumoral, infiltrado linfocitário e resposta patológica à quimioterapia*

		Tamanho* $\leq 1,0$		(N=4)
		Infiltrado linfocitário		P-valor
		Ausente	Presente	
<i>Resposta patológica</i>				
Ausente	1(33,33%)	0		0,75
Parcial	2(66,67%)	1 (100%)		
Completa	0	0		
		Tamanho* $>1,0$ e $\leq 2,0$		(N=9)
		Infiltrado linfocitário		P-valor
		Ausente	Presente	
<i>Resposta patológica</i>				
Ausente	1(20%)	0		
Parcial	2(40%)	3(75%)		1,0
Completa	2(40%)	1(25%)		
		Tamanho* $>2,0$ e $\leq 5,0$		(N=49)
		Infiltrado linfocitário		P-valor
		Ausente	Presente	
<b>Resposta patológica</b>				
<b>Ausente</b>	<b>7(35%)</b>	<b>2(6,90%)</b>		<b>0,006</b>
<b>Parcial</b>	<b>11(55%)</b>	<b>14(48,28%)</b>		
<b>Completa</b>	<b>2(10%)</b>	<b>13(44,83%)</b>		
		Tamanho* $> 5,0$		(N=14)
		Infiltrado linfocitário		P-valor
		Ausente	Presente	
<i>Resposta patológica</i>				
Ausente	1(11,11%)	2(40%)		
Parcial	8 (88,89%)	2(40%)		0,094
Completa	0	1(20%)		

\* Tamanho avaliado em centímetros

#### 4- DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta uma casuística de 76 casos de CMTN, no qual foram avaliadas as características morfológicas das neoplasias, infiltrado linfocitário, estroma e celularidade tumoral e associados com à resposta quimioterápica neoadjuvante, e analisadas as características clínico-patológicas, como idade e tamanho tumoral. Apesar da limitação do tamanho relativamente pequeno da amostra, há associações significativas que confirmam a importância que o infiltrado linfocitário tem e que sua presença está relacionada a uma boa resposta ao tratamento quimioterápico (resposta patológica completa).

A resposta patológica completa pós quimioterapia é um importante fator preditor de sobrevida. Em nosso estudo, 25% dos casos tiveram resposta completa à quimioterapia neoadjuvante. Esse valor está um pouco inferior aos observados na literatura (20-22). O grupo de trabalho internacional CTNeoBC (*Collaborative Trials in Neoadjuvant Breast Cancer*), que fez uma análise conjunta de 12 ensaios de esquemas quimioterápicos neoadjuvantes em carcinomas mamários, com antraciclinas e taxanos, entre 1990 e 2011, encontraram uma taxa de 34% de respostas patológicas completas pós QN, num total de 1157 casos de CMTN (21). Outro estudo, Zhang L et al (22), mostraram que 26 pacientes (45%), de um total de 58 mulheres com CMTN, atingiram resposta completa pós QN. Todas as pacientes do seu estudo receberam um esquema padrão de quimioterápicos (4 AC + 12 T). Quando comparamos nossa casuística, a maioria da nossa população (52%) usou o esquema de (4 AC + 8T), ou seja, 4 ciclos semanais a menos de taxano, talvez essa seja a justificativa da menor taxa de resposta completa da nossa população. O presente estudo apresenta um aspecto limitante, por ser retrospectivo, num intervalo de 10 anos, o tratamento quimioterápico não está uniformizado, tendo sido utilizados esquemas diferentes de quimioterapias.

Alguns estudos concluíram que os triplo negativos, em geral, tem níveis de infiltrado linfocitário mais elevados (22-25). Em nossa pesquisa, 51,32% dos tumores apresentavam moderada a intensa quantidade de linfócitos intratumorais, evidenciando que mais da metade dos nossos casos haviam níveis elevados de infiltrado linfocitário, estando de acordo com o observado na literatura. O infiltrado linfocitário é um importante parâmetro morfológico a ser avaliado, já que está associado com boas respostas à quimioterapia

neoadjuvante nos carcinomas mamários, consequentemente associado a melhor sobrevida dos pacientes (22,24). A nossa análise corrobora esses estudos, evidenciando uma associação significativa de que a presença de infiltrado linfocitário (moderado a abundante) está associado a uma resposta patológica completa. A nossa casuística revela que quase a totalidade dos tumores (78,95%) com resposta completa ao tratamento apresentam infiltrado linfocitário, enquanto na minoria deles, os linfócitos estão ausentes.

O infiltrado linfocitário presente nos tumores é de extrema relevância, especialmente visando possibilidades terapêuticas imunomoduladoras. Atualmente, a imunoterapia que utiliza o próprio sistema imunológico do paciente para erradicar e atingir células neoplásicas, está sendo explorada como tratamento para os CMTN. Já existem drogas sendo recomendadas para a prática clínica, como por exemplo, o Atezolizumab e Avelumabe, que tem como alvo a proteína ligante de morte programada 1 (PD-L1), e também o Nivolumabe e Pembrolizumabe, que tem a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) como alvos, deixando a resposta antitumoral mais potente (23,24,26).

Os estudos na literatura têm abordado a relação do infiltrado linfocitário com a resposta à quimioterapia, sem levar em consideração a associação de estroma e celularidade tumoral (18,22,24). Em nosso estudo, apesar da associação não ser significativa, observou-se que quando há infiltrado inflamatório linfocitário, independente do estroma ser escasso ou abundante, há uma melhor resposta quimioterápica. Os mesmos resultados são encontrados quando associa infiltrado inflamatório com celularidade tumoral e a resposta à quimioterapia. Independente da celularidade do tumor ser escassa ou abundante, quando está associado a infiltrado inflamatório (moderado a intenso) há mais respostas completas ou parciais. Ou seja, o infiltrado linfocitário é essencial para uma melhor resposta ao tratamento neoadjuvante independentemente da quantidade de estroma e de células tumorais existentes.

Ao avaliar a correlação do tamanho do tumor, resposta do hospedeiro, analisada pelo infiltrado linfocitário e sua consequente resposta à quimioterapia, foi observada que a única associação significativa foi nos tumores intermediários ( $> 2,0$  e  $\leq 5,0$  cm). Do total de tumores que tiveram resposta completa à quimioterapia neoadjuvante, a maioria eram tumores intermediários e desses quase todos apresentavam moderado a abundante infiltrado linfocitário. Ou seja, foi observado que tamanhos intermediários apresentam uma boa resposta tumoral do hospedeiro, com moderado a abundante infiltrado linfocitário e uma consequente boa resposta à quimioterapia, pela presença de linfócitos. Porém, essa associação tem um fator limitante, que é a maior concentração dos pacientes nesse grupo

de tumores de tamanho intermediário e uma pequena amostra dos outros tamanhos, podendo ter influenciado nesse resultado.

O CMTN é mais comum em mulheres mais jovens, quando comparado com os outros subtipos (27-29). Em consonância com esses estudos nossa casuística demonstrou que mais da metade das mulheres com esse diagnóstico tem idade inferior ou igual a 50 anos. Além disso, pacientes mais jovens apresentaram tumores maiores em nosso estudo, equivalente aos dados da literatura, que demonstraram que mulheres jovens apresentavam tumores em estágio mais avançado e conseqüentemente de tamanhos maiores, com pior sobrevida (30, 31).

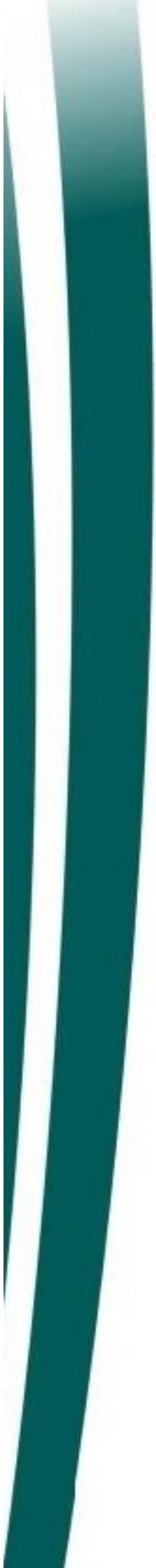
O CMTN é um dos subtipos mais agressivos, com dificuldades terapêuticas específicas, portanto, têm-se procurado marcadores prognósticos a fim de se identificar aquelas pacientes que evoluirão com pior desfecho e criar estratégias para modificar de alguma forma seu tratamento e curso evolutivo. Esse estudo se torna relevante e colaborou com informações importantes sobre prognóstico, reforçando que o infiltrado linfocitário presente nos tumores está associado a melhores respostas à quimioterapia, diferentemente do estroma intratumoral e celularidade tumoral, que não se associaram significativamente com a resposta ao tratamento. Em suma, dentro dos parâmetros avaliados, o infiltrado linfocitário é um preditor de boa resposta ao tratamento quimioterápico (resposta patológica completa). É o critério morfológico mais importante e significativo para a avaliação prognóstica dos tumores triplo negativos, corroborando com os achados da literatura.

## 5- REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
2. Matsuda Tomohiro. Breast Source: Globocan 2018. March. 2019. p. 1–2.
3. Budczies J, Bockmayr M, Denkert C, et al. Classical pathology and mutational load of breast cancer – integration of two worlds. *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 2015;1(4):225-238. doi:10.1002/cjp2.25.
4. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010; 363: 1938–48.
5. 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.
6. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
7. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina*. 2011 (39): 499-503.
8. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Ann Oncol* 2009;20: 1913–27.
9. Denkert C, Liedtke C, Tutt A, et al. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *Lancet* 2017; 389: 2430–42.
10. Anders C, Carey LA. Understanding and Treating Triple-Negative Breast Cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2008;22(11):1233-1243.
11. 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.

12. Nicholas C. Turner and Jorge S. Reis-Filho. Tackling the Diversity of Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* December 1 2013 (19) (23) 6380-6388; DOI:10.1158/1078-0432.CCR-13-0915.
13. Kaufmann M, von Minckwitz G, Bear HD, Buzdar A, MacGale P, Bonnefoi H, et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol*. 2007;18(12):1927-34.
14. Andrade DAP, Zucca-Matthes G, et al. Quimioterapia neoadjuvante e resposta patológica: coorte retrospectiva. *Einstein*. 2013;11(4):446-50.
15. Silva EHLS, Paloschi JRA, Caldeira JRF, Joioso A. Estudo comparativo de resposta à quimioterapia neoadjuvante em dose total, entre câncer de mama e metástase axilar, conforme resultados de imunoistoquímica, no Serviço de Mastologia do Hospital Amaral Carvalho em Jaú, SP. *Rev Bras Mastologia*. 2015;25(2):46-50.
16. Fitzpatrick A, Tutt A. Controversial issues in the neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11:1–15.
17. Osório CABT, Júnior MAC, Soares FA. Avaliação de resposta patológica em câncer de mama após quimioterapia neoadjuvante: Padronização de protocolo adaptado. *J Bras Patol e Med Lab*. 2012;48(6):447–53.
18. Luen SJ, Savas P, Fox SB, Salgado R, Loi S. Tumour-infiltrating lymphocytes and the emerging role of immunotherapy in breast cancer. *Pathology*. 2017;49(2):141–55.
19. MahuI B. Amin, MD F. *AJCC Cáncer Staging Manual*. 2017. 589–626 p.
20. Fitzpatrick A, Tutt A. Controversial issues in the neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2019;11:1–15.
21. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014; 384: 164–172.
22. Zhang L, Wang XI, Zhang S. Tumor-infiltrating lymphocyte volume is a better predictor of neoadjuvant therapy response and overall survival in triple-negative invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2018;80:47–54.
23. Katz H, Alsharedi M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol*. 2018;35(1):1–9.

24. Denkert C, Loibl S, Noske A, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 105–13.
25. Uma Krishnamurti, Ceyda Sonmez Wetherilt, Jing Yang, Limin Peng, Xiaoxian Li. Tumor-infiltrating lymphocytes are significantly associated with better overall survival and disease-free survival in triple-negative but not estrogen receptor–positive breast cancers. *Human Pathology*, Volume 64, 2017, pp. 7-12.
26. Yu LY, Tang J, Zhang CM, et al. New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14:68.
27. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LAG, et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(5).
28. Trivers K et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control*. 2009;20(7):1071–1082.
29. Gierach GL, Burke A, Anderson WF. Epidemiology of triple negative breast cancers. *Breast Dis*. 2010;32(1–2):5–24.
30. Tao ZQ, et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology, *Cell Biochen Byophys* 2015; 72 (2):333-8.
31. Gajdos, C. et al. Stage 0 to Stage III Breast Cancer in Young Women. *Journal of the American College of Surgeons*. 2000, 523–529.

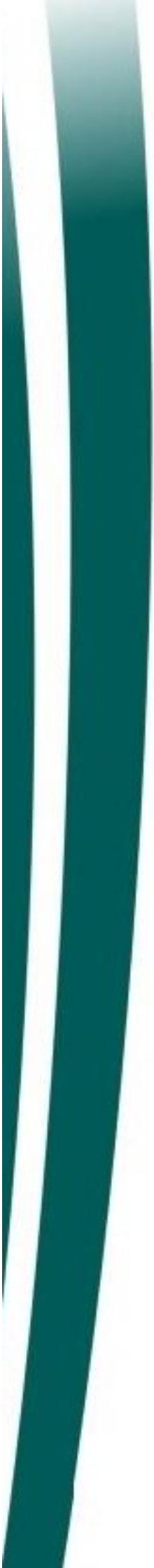


## **Conclusão**

## CONCLUSÃO

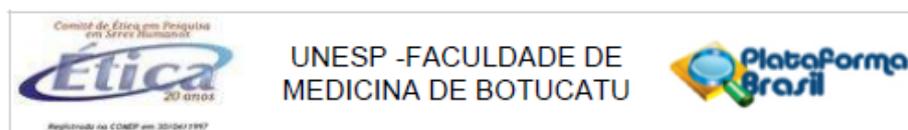
Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- Os CMTN são frequentes em mulheres com idade inferior ou igual a 50 anos.
- Os CMTN, em geral, tem níveis de infiltrado linfocitário mais elevados. O infiltrado linfocitário é um importante parâmetro morfológico a ser avaliado, já que está associado com boa resposta à quimioterapia neoadjuvante (resposta patológica completa). Independentemente do estroma e da celularidade tumoral serem escassos ou abundantes, quando o tumor apresenta moderado a intenso infiltrado linfocitário, está associado a uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico.
- Não houve associação do estroma tumoral e/ou celularidade tumoral com a resposta à quimioterapia neoadjuvante.



# ANEXO

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/aprovando o estudo)



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E CORRELAÇÃO COM A RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

**Pesquisador:** Jéssica Oliveira Carvalho

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 91391218.9.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Patologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.783.589

**Objetivo da Pesquisa:**

Correlacionar as características morfológicas dos carcinomas mamários triplo negativos com a resposta terapêutica à quimioterapia neoadjuvante.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Devido à utilização de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (blocos de parafina) e lâminas, não haverá qualquer risco de contaminação dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Não haverá utilização de materiais radioativos e/ou microorganismos patogênicos.

Os benefícios referem-se a obtenção de resultados que poderão fornecer informações úteis para oncologistas na identificação dos tumores que se beneficiariam da quimioterapia neoadjuvante.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa relevante e adequadamente elaborada. O pesquisador não informa sobre os custos dispendidos na pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta documentação adequada e solicita a dispensa do TCLE, com as seguintes justificativas:

- Os pacientes que serão avaliados, em muitas situações, poderão não ter mais seguimento clínico com a mastologia, seja por deslocamentos ou óbito;
- Os carcinomas triplo negativos são de pior prognóstico e provavelmente os pacientes evoluíram para óbito;
- A revisão das lâminas não acarretará dano, prejuízo ou perda do material estocado no Departamento de Patologia da FMB UNESP. O trabalho será essencialmente morfológico;
- A revisão dos critérios histopatológicos e imunofenotípicos para a caracterização morfológica e a sua correlação com a resposta ao tratamento neoadjuvante tem a finalidade de se obter mais conhecimentos sobre essa patologia, de modo que não haverá mudança no diagnóstico ou

Endereço: Chácara Butignolli, s/n  
Bairro: Rubião Junior  
UF: SP Município: BOTUCATU  
Telefone: (14)3880-1609 CEP: 18.618-970 E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.763.589

tratamento já vigente, tanto do ponto de vista clínico, como patológico.

**Recomendações:**

O projeto deverá ser iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto de pesquisa apresentado encontra-se APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 03 de julho de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP. No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1151902.pdf	12/06/2018 09:11:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	12/06/2018 08:39:45	Jéssica Oliveira Carvalho	Aceito
Outros	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	12/06/2018 08:31:16	Jéssica Oliveira Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_termo.docx	12/06/2018 08:28:10	Jéssica Oliveira Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHCFMB.Pdf	12/06/2018 08:27:39	Jéssica Oliveira Carvalho	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	12/06/2018 08:20:30	Jéssica Oliveira Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	12/06/2018 08:18:05	Jéssica Oliveira Carvalho	Aceito

Continuação do Parecer: 2.763.589

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 10 de Julho de 2018

Assinado por:  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)