



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

LUCIANA VIEIRA QUEIROZ LABRE

**Relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral
e fatores prognósticos em câncer de mama**

Goiânia

2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

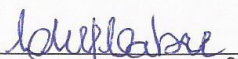
Nome completo do autor: Luciana Vieira Queiroz Labre

Título do trabalho: Relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral e fatores prognósticos em câncer de mama

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 05/06/18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

LUCIANA VIEIRA QUEIROZ LABRE

**Relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral
e fatores prognósticos em câncer de mama**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Tropical e
Saúde Pública da Universidade Federal de
Goiás para obtenção do Título de Doutor em
Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi

Goiânia

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L126 Labre, Luciana Vieira Queiroz.

Relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral e fatores prognósticos em câncer de mama / Luciana Vieira Queiroz Labre. – 2018.

121 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora : Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos.

Co-orientadora : Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi.

Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública)–Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2018.

Bibliografia : p. 84–92.

1. Mamas - Câncer. I. Santos, Silvia Helena Rabelo. II. Saddi, Vera Aparecida. III. Título.

CDD 616.99449



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 - e-mail: ppgmtsp.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE LUCIANA VIEIRA QUEIROZ

LABRE - Aos vinte e seis dias do mês de abril do ano de 2018 (26/04/2018), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. SILVIA HELENA RABELO SANTOS, RUFFO DE FREITAS JÚNIOR, ALINE CARVALHO BATISTA, MARA RÚBIA NUNES CELES e NÁDIA DO LAGO COSTA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **“RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE MACRÓFAGOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL E FATORES PROGNÓSTICOS EM CÂNCER DE MAMA”** em nível de DOUTORADO, área de concentração em **PATOLOGIA**, de autoria de **LUCIANA VIEIRA QUEIROZ LABRE** discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora Profa. Dra. SILVIA HELENA RABELO SANTOS, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1034/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos

Prof. Dr. Ruffo de Freitas Júnior

Profa. Dra. Aline Carvalho Batista

Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes

Profa. Dra. Nádia do Lago Costa

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada
APROVADA
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **DOUTOR EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em **PATOLOGIA**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 19 h 06 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral e fatores prognósticos em câncer de mama

Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos (FF/UFG)

Prof. Dr. Ruffo de Freitas Júnior (FM/UFG)

Profa. Dra. Aline Carvalho Batista (FO/UFG)

Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Nádia do Lago Costa (FO/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Dedico este trabalho aos meus filhos, Pedro Paulo e Maria Beatriz.

AGRADECIMENTOS

A realização do doutorado foi um percurso com aprendizados que, sem dúvida, foram adquiridos graças à ajuda de pessoas especiais.

Agradeço

À Profa. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos pela oportunidade de desenvolver meu trabalho, com orientação primorosa e dedicada, com exemplo de ética, que me influencia e mostra como a profissão de professor é gratificante e realizadora.

À Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi, que através de sua co-orientação participou ativamente desta pesquisa, repassando-me seu amplo conhecimento e aprimorando os resultados obtidos.

A todos os amigos do Laboratório de Diversidade Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás), do Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia do Hospital Araújo Jorge e do Laboratório de Biologia Tumoral e Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge, que acompanharam e participaram ativamente do desenvolvimento deste estudo.

Às amigas Jessica e Lyriane, companheiras de pesquisa, de dificuldades e de superações. A contribuição de vocês foi fundamental para a obtenção dos resultados desta pesquisa.

Aos técnicos Ricardo e Ana Paula, que com seu apoio operacional, companheirismo e prestatividade constante contribuíram significativamente no decorrer deste estudo.

Ao Hospital Araújo Jorge, em especial ao Setor de Anatomia Patológica (SAP), por fornecer o material necessário para este estudo na forma dos prontuários e lâminas das pacientes, as quais, em seu silêncio, contribuíram de maneira fundamental para a obtenção de todos os resultados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), pelo companheirismo e aprendizado que compartilhamos nesses anos.

Aos meus pais, a quem ofereço este trabalho, pelo apoio incondicional, por me fornecer suporte em meus momentos de desânimo e cansaço e por nunca me deixar desistir, sempre entendendo a importância que a educação e o estudo têm na formação do ser humano.

À minha vovó Maria Moraes e à minha tia Zaira, minha madrinha, que fisicamente não estão mais entre nós, mas que puderam acompanhar parte deste sonho. Minha eterna gratidão pelo intenso amor a mim concedido.

À minha irmã, Mariana, e sua família, que guardo em meu coração e de quem tenho muito orgulho.

Ao meu marido, Emival, a quem defino como “meu porto seguro”, pela lealdade, ajuda, conselhos e amor, por preencher os meus momentos de ausência em casa, por acreditar em meu sonho e me ajudar a realizá-lo.

Aos meus filhos, Pedro Paulo e Maria Beatriz, minha razão de viver, por sempre entender e nunca me cobrar pelas faltas, ao contrário, fazendo de mim o maior exemplo de realização como pessoa e profissional.

A toda a minha família, tios e primos, pelo companheirismo e contribuição para meu crescimento pessoal.

Aos meus amigos queridos, que mesmo sem entender muito acerca deste trabalho, tanto me ouviram e apoiaram neste período.

À minha grande amiga Suzana Oellers, que foi apoio fundamental e ajuda de imenso valor na lapidação deste trabalho. Sua colaboração na revisão e tradução dos textos foi de extrema importância.

E a todos que vêm trilhando comigo este caminho, compartilhando incertezas, tristezas, alegrias e vitórias.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Classificação histológica do câncer de mama	16
1.2 Biomarcadores do câncer de mama	17
1.2.1 Receptor de estrógeno (RE)	18
1.2.2 Receptor de progesterona (RP)	19
1.2.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)	19
1.2.4 Tumores triplo negativos e não triplo negativos	20
1.3 Subtipos do câncer de mama	21
1.4 Fatores prognósticos do câncer de mama	23
1.5 Macrófagos associados a tumor (TAMs)	25
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MÉTODOS	35
4.1 Desenho do estudo	35
4.2 Tamanho amostral	35
4.3 Coleta de dados	35
4.4 Seleção de casos	36
4.4.1 Critérios de inclusão	36
4.4.2 Critérios de exclusão	36
4.5 Variáveis dependentes	38
4.6 Variáveis independentes	38
4.7 Análises imuno-histoquímicas	38
4.7.1 Marcadores CD68 e CD163 de macrófagos	38
4.7.2 Contagem das células	39
4.7.2 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	41

Artigo 1 – Impact of tumour-associated macrophages (TAMs) in tumour microenvironment as prognostic markers in breast cancer	42
Abstract	43
Introduction	44
Materials and methods	45
PATIENTS AND TISSUE SAMPLES	45
IMMUNOHISTOCHEMISTRY	45
CELL COUNT	46
STATISTICAL ANALYSIS	47
Results	47
Discussion	48
Acknowledgements	50
Author contributions	50
References	51
Artigo 2 – M2-type macrophages in tumour microenvironment as prognostic markers in women with breast cancer	64
Abstract	65
Introduction	66
Materials and methods	67
PATIENTS AND TISSUE SAMPLES	67
IMMUNOHISTOCHEMISTRY	67
CELL COUNT	68
STATISTICAL ANALYSIS	68
Results	69
Discussion	69
References	71
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	84
APÊNDICES	93
APÊNDICE A Procedimento operacional padrão para imuno-histoquímica de tecido parafinado, Versão 1	93

APÊNDICE B Procedimento operacional padrão para imuno-histoquímica de tecido parafinado, Versão 3	100
ANEXOS	108
Anexo A Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer de Goiás (CEP/ACCG)	108
Anexo B Normas de publicação no periódico Histopathology	111
Anexo C Recibo de submissão do Artigo 1 ao periódico Histopathology	121

QUADROS, GRÁFICOS, TABELAS E FIGURAS

Figura 1.	Tipos histológicos de câncer de mama.	17
Quadro 1.	Fatores prognósticos mais importantes do câncer de mama.	24
Quadro 2.	Critérios do sistema de estadiamento tumoral TNM para câncer de mama.	26
Figura 2.	Representação esquemática da polarização de macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos ativados alternativamente (M2).	28
Figura 3.	Fluxograma de distribuição dos casos estudados.	37
Artigo 1 – Impact of tumour-associated macrophages (TAMs) in tumour microenvironment as prognostic markers in breast cancer		
Table 1.	Association between CD68+ expression (Group 1 x Group 2) and clinicopathologic characteristics	54
Table 2.	Multivariate analysis between CD68+ expression (Group 1 x Group 2) and clinicopathologic characteristics	56
Table 3.	Correlation between CD68+ expression (Group 1 x Group 2) and clinicopathologic characteristics	57
Table 4.	Univariate and multivariate analyses between the mean number of CD68+ cells (high and low infiltrate) and clinicopathologic characteristics	58
Figure 1.	Representative examples of breast cancer tumour marked with CD68+: A. Positive control; B. Group 1 (number of cells with strong tagging in $\geq 30\%$ of tumour surface); C. Group 2 (number of cells with strong tagging in $< 30\%$ of tumour surface).	62
Figure 2.	Kaplan-Meier analysis of overall survival rate based on the CD68+ cells expression of patients with breast cancer (log-rank test, $p = 0.03$).	63

Figure 3.	Kaplan-Meier analysis of overall survival rate based on the mean number of CD68+ cells of patients with breast cancer (log-rank test, $p = 0.04$)..	63
------------------	--	----

Artigo 2 – M2-type macrophages in tumour microenvironment as prognostic markers in women with breast cancer

Table 1.	Clinicopathologic characteristics of breast cancer cases included in this study	74
Table 2.	Bivariate and multivariate analyses between CD163+ cell infiltration (high infiltration x low infiltration) e clinicopathologic characteristics	76
Figure 1.	A. Positive control, xanthogranuloma. Slides showing breast cancer tumour marked with CD163+: B. Low infiltration; C. High infiltration.	79
Figure 2.	Kaplan-Meier analysis of overall survival rate based on the mean number of CD163+ cells of patients with breast cancer (log-rank test, $p = 0.8227$).	80

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer de Goiás
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	Grupamento de diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CXCL10	Ligante 10 da quimiocina CXC
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ER	<i>Estrogen receptor</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
HCC	Carcinoma hepatocelular
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2, <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA-DRA	Antígeno leucocitário humano do MHC, classe II, DR alfa
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LPS	Lipopolissacarídeos
M1	Macrófagos ativados de forma clássica, <i>classically activated macrophages</i>
M2	Macrófagos ativados alternativamente, <i>alternatively activated macrophages</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NCI	<i>National Cancer Institute</i>

Ni	<i>Not informed</i>
95% CI	<i>95% confidence interval</i>
NO	Óxido nítrico
NTN	Não triplo negativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
OSCC	Carcinoma de células escamosas orais
PBS	Tampão fosfato salino, <i>phosphate buffered saline</i>
PR	<i>Progesterone receptor</i>
PUC-Goiás	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
RE	Receptor de estrógeno
RNS	Espécies reativas de nitrogênio, <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, <i>reactive oxygen species</i>
RP	Receptor de progesterona
SAP	Setor de Anatomia Patológica
TAMs	Macrófagos associado a tumor, <i>tumour-associated macrophages</i>
TLR	Receptores do tipo <i>toll</i>
TN	Triplo negativo
TNBC	<i>Triple-negative breast cancer</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNM	Tamanho do tumor primário, envolvimento linfonodal e metástase à distância
UFG	Universidade Federal de Goiás
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, <i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Introdução: A análise de possíveis biomarcadores associados ao comportamento mais agressivo dos carcinomas de mama, vinculada a informações clínicas e de prognóstico, pode fornecer dados importantes na abordagem de pacientes com câncer de mama. Há indicações de que a presença de macrófagos associados a tumor (TAMs) no microambiente tumoral esteja associada a pior prognóstico para mulheres com câncer de mama. **Objetivo:** Avaliar a importância da presença de macrófagos no microambiente tumoral em neoplasias de mama. **Métodos:** Este estudo de corte transversal retrospectivo incluiu 93 casos de mulheres com câncer de mama ductal invasivo e submetidos à análise imuno-histoquímica dos marcadores para macrófagos CD68 (M1/M2) e CD163 (M2). A contagem de células marcadas com CD68+ e CD163+ foi realizada em região peritumoral, considerando campos *hot spot*, e os casos em estudo foram classificados em de baixa infiltração ou alta infiltração utilizando avaliação semiquantitativa de marcação celular. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa Stata 13.0 (Stata Corp., College Station, TX, Estados Unidos), com análises bivariada, considerando o nível de significância de $p < 0,05$, e multivariada tendo as variáveis com $p < 0,2$ sido submetidas ao teste de regressão logística. O método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank foram utilizados na análise das curvas de sobrevida. **Resultados:** Níveis elevados de TAMs (CD68+) correlacionaram-se significativamente com: idade das pacientes, presença de metástase à distância, estadiamento tumoral mais avançado, ausência de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e câncer de mama triplo negativo (TN). A redução da taxa global de sobrevida nos casos de mulheres com câncer de mama estudados foi significativamente associada com alta infiltração de TAMs (CD68+). A alta infiltração de TAMs fenótipo M2 (CD163+) foi significativamente correlacionada com as variáveis independentes presença de metástase à distância, ausência de RE e câncer de mama TN. **Conclusões:** A associação entre a análise de biomarcadores TAMs e a obtenção de informações clínicas e de prognóstico mostrou que a presença elevada de infiltrado macrofágico tem valor prognóstico significativo, agregando informações sobre a relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral de casos de mulheres com carcinoma de mama e as características clínico-patológicas do tumor. Em adição a isso, os TAMs despontam como possíveis marcadores prognósticos para o câncer de mama.

Palavras chave: Câncer de mama. Macrófagos. Biomarcadores. Fatores prognósticos.

ABSTRACT

Introduction: The analysis of possible biomarkers associated with the more aggressive behavior of breast cancer, together with clinical information and prognosis, can provide important data for the treatment of patients with breast cancer. Some evidence show that the presence of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor microenvironment is associated with a worse prognosis for women with breast cancer. **Objective:** Evaluate the importance of the presence of macrophages in the tumor microenvironment in breast cancer. **Methods:** This cross-sectional retrospective study included 93 cases of women with invasive ductal carcinoma that underwent immunohistochemical analyses of macrophages CD68 (M1/M2) and CD163 (M2) markers. CD68+ and CD163+ marked cells were counted in the peritumoral region, considering hot spot microscopic fields, and the cases studied were classified into low infiltrate or high infiltrate using a semiquantitative assessment evaluation of cell marking. Statistical analyses were performed using the software Stata 13.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA), with bivariate analysis, considering a significance level of $p < 0.05$, and multivariate analysis, submitting the variables with $p < 0.2$ to logistic regression. The Kaplan-Meier method and the log-rank test were employed in the analyses of the overall survival rate curves. **Results:** High levels of TAMs (CD68+) significantly correlated with: age, presence of distant metastases, more advanced cancer staging, absence of estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) and triple-negative breast cancer (TNBC). The decrease in overall survival rate in the cases of women with breast cancer studied was significantly associated with high TAM infiltrate (CD68+). High M2-type macrophage infiltrate (CD163+) was significantly correlated with the independent variables presence of distant metastases, absence of ER and TNBC. **Conclusions:** The association between the analysis of TAM biomarkers and the obtention of clinical and prognosis information showed that the presence of high TAM infiltrate has significant prognostic value, adding information about the relationship between the presence of macrophages in the tumor microenvironment in cases of women with breast cancer and the clinicopathologic characteristics of the tumor. Furthermore, TAMs emerge as possible prognostic markers for breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Macrophages. Biomarkers. Prognostic factors.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo tipo mais comum e o mais frequente entre as mulheres, representando 25% do total de casos no mundo em 2012 (WHO, 2012). As taxas de incidência e mortalidade do câncer de mama são altas tanto em países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, sendo a quinta causa de morte por câncer em geral (522.000 óbitos) e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres (DAI et al., 2016). A estimativa para o Brasil é de 59.700 casos novos a cada ano do biênio 2018-2019, com risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Este tipo de câncer também é o primeiro com maior frequência em mulheres em todas as regiões do Brasil, exceto na região Norte, onde o tipo mais incidente é o de colo de útero (INCA, 2017).

Por se tratar de doença sistêmica, e não local, é importante identificar alguns fatores de relevância no aparecimento do câncer de mama. Entre os principais fatores, estão as questões hormonais, o período reprodutivo da mulher, os hábitos alimentares e os hábitos físicos (ROCK et al., 2015; ROSNER et al., 2015).

As mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, que têm a função de impedir o surgimento de tumores por intermédio da reparação de moléculas de DNA danificadas, são caracterizadas por defeitos no processo de recombinação homóloga no reparo de quebra de DNA de cadeia dupla. Em comparação com a população em geral, os pacientes com mutações germinativas em qualquer um destes genes têm risco de câncer de mama aumentado entre 20 a 30 vezes (DONEPUDI et al., 2014). Os fatores genéticos, como as mutações dos genes BRCA1 e BRCA2, são de relevante importância quando se avalia a existência de origem familiar e a agressividade do tipo de tumor em mulheres diagnosticadas com câncer de mama, podendo influenciar gerações na família com mutações presentes. Esses dois marcadores são utilizados para identificar indivíduos que têm alto risco de desenvolver câncer de mama e de ovário (GROSS et al., 2016; SCHMADEKA; HARMON; SINGH, 2014).

Na maioria dos casos, o câncer de mama pode ser percebido em suas fases iniciais por intermédio dos seguintes sinais e sintomas: nódulo (caroço), fixo e geralmente

indolor, sendo esta a principal manifestação da doença, que está presente em cerca de 90% dos casos quando o câncer é percebido pela própria mulher; pele da mama avermelhada, retraída ou com aparência de casca de laranja; alterações no bico do peito (mamilo); pequenos nódulos nas axilas e/ou no pescoço; saída de líquido anormal das mamas (INCA, 2018).

Embora tenham sido feitos progressos consideráveis no tratamento do câncer de mama, sua heterogeneidade continua representando desafios tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico. A detecção eficaz da heterogeneidade do câncer de mama é importante, pois há tendência de que o tratamento seja feito de forma cada vez mais individualizada. Assim, na atualidade, os tratamentos do câncer de mama utilizados baseiam-se em características clínicas das pacientes, critérios anatomopatológicos dos tumores, marcadores imuno-histoquímicos e critérios de imagem. Esses métodos permitem a melhor caracterização da heterogeneidade do câncer de mama, proporcionando o estabelecimento de um plano terapêutico eficaz (SONG et al., 2016).

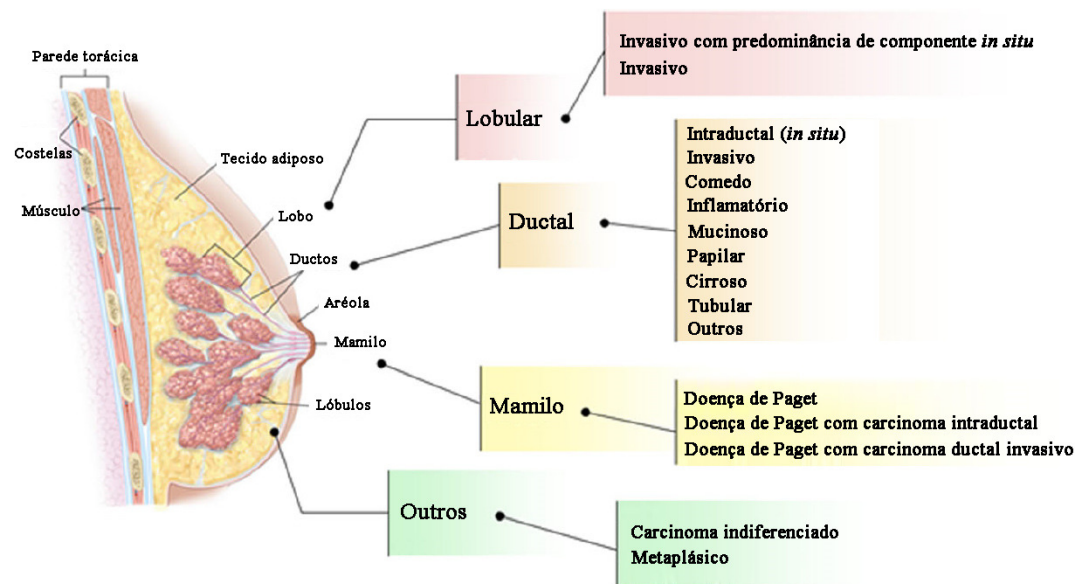
1.1 Classificação histológica do câncer de mama

Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em conjunto com o *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e o *National Cancer Institute* (NCI), publicou a Classificação para Tumores de Mama, com mais de 20 tipos histológicos diferentes da doença, de acordo com a morfologia do tumor (LAKHANI et al., 2012). A partir disso, foi recomendada a classificação histológica de todos os carcinomas (Figura 1), com exceção do carcinoma medular (POURTEIMOOR; MOHAMMADI-YEGANEH; PARYAN, 2016; SINN; KREIPE, 2013).

Os três tipos histológicos mais comuns de câncer de mama são: carcinoma ductal invasivo ($\pm 55\%$), carcinoma ductal *in situ* ($\pm 13\%$) e carcinoma lobular invasivo ($\pm 5\%$). A classificação histológica do câncer de mama apresenta fragilidades em decorrência das limitações e da subjetividade da histopatologia (POURTEIMOOR; MOHAMMADI-YEGANEH; PARYAN, 2016). A nova classificação da OMS enumera tanto carcinoma ductal *in situ* como neoplasia lobular como lesões precursoras do câncer de mama, mas enfatiza que seu comportamento clínico e as recomendações terapêuticas são diferentes e têm de ser baseadas na biologia da doença (LAKHANI et

al., 2012). Para agrupar tumores com amplo espectro biológico e de comportamento clínico diferente dentro das mesmas categorias, a graduação histológica e a avaliação imuno-histoquímica para biomarcadores moleculares são fundamentais, de modo a aumentar o valor discriminatório entre os diferentes tipos (carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma ductal invasivo e carcinoma lobular invasivo) (POURTEIMMOOR; MOHAMMADI-YEGANEH; PARYAN, 2016).

Figura 1. Tipos histológicos de câncer de mama.



Fonte: Adaptada de Pourteimoor, Mohammadi-Yeganeh e Paryan (2016, p. 14479, tradução nossa).

1.2 Biomarcadores do câncer de mama

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea tanto com relação à clínica quanto à morfologia, a qual é influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, o que dificulta seu controle (DAI et al., 2016). A heterogeneidade tumoral do carcinoma de mama é um dos maiores desafios a ser enfrentado, tendo em vista que tumores com os mesmos tipos histológicos, estádios e graus de diferenciação podem apresentar

desfechos distintos em relação aos fatores prognósticos e às respostas aos tratamentos instituídos (PATANI; MARTIN; DOWSETT, 2013; SONG; MERAJVER; LI, 2015).

A expressão gênica por microarranjos mostrou a existência de múltiplos subtipos moleculares. Essa classificação gerou grande interesse devido à sua significativa associação com prognóstico, resposta à terapia e consequente potencial para definir o tratamento de pacientes com câncer de mama (SONG; MERAJVER; LI, 2015).

As células mamárias normais e algumas células do câncer de mama contêm receptores que podem se ligar a determinadas substâncias, como hormônios ou fatores de crescimento, que circulam no sangue. As expressões dos três principais biomarcadores, denominados receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), variam amplamente nos diferentes tipos de câncer de mama (DAI et al., 2016; PATANI; MARTIN; DOWSETT, 2013).

1.2.1 Receptor de estrogênio (RE)

O RE é o biomarcador mais importante e prevalente para a classificação do câncer de mama, pois fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino (LUO et al., 2016; NIU et al., 2016). Tumores positivos para RE são, em grande parte, bem diferenciados, menos agressivos e associados a melhor resultado após a ressecção cirúrgica do tumor do que os RE negativos. Também têm melhor resposta à terapia endócrina adjuvante, com mortalidade reduzida em cerca de um terço nas mulheres tratadas com 5 anos de modulador seletivo de RE (SERRA et al., 2014).

O RE tem sido considerado como o mais poderoso fator preditivo identificado no câncer de mama. Tumores positivos para RE compreendem até 75% dos casos de câncer de mama e acometem, em sua maioria, mulheres acima de 50 anos (LUO et al., 2016).

A obesidade é um fator de risco que vem sendo reconhecido como de muita importância no diagnóstico do câncer de mama RE positivo. Sabe-se que o peso corporal tem associação direta com o câncer de mama pós-menopausa, aumentando seu risco (ROCK et al., 2015; ROSNER et al., 2015).

1.2.2 Receptor de progesterona (RP)

Os tumores RP positivos compreendem 65% a 75% dos cânceres de mama, e vários estudos têm sugerido suas implicações clínicas na classificação de tais tumores (SERRA et al., 2014). Os tumores que apresentam receptores hormonais positivos têm melhor resposta ao tratamento medicamentoso quando comparados com os grupos de tumores que apresentam apenas um receptor hormonal positivo (DONEPUDI et al., 2014). A representação de característica positiva e negativa para definir o estado do receptor também é utilizada para prever a resposta dos tumores à terapia endócrina (DONEPUDI et al., 2014).

1.2.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)

O oncogene do HER2 codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), que é uma proteína normal presente em várias células do corpo. Entretanto, no câncer de mama, sua presença amplificada (entre 13% a 20%), com intensa expressão da proteína, está associada com mau prognóstico. Assim, o HER2 deve ser medido e avaliado em todas as pacientes com câncer de mama (LUO et al., 2016; PATANI; MARTIN; DOWSETT, 2013). As pacientes com câncer de mama com essa amplificação apresentam doença mais agressiva, com reduzida chance de cura se não forem tratadas corretamente (DONEPUDI et al., 2014).

O HER2 é um alvo importante de uma variedade de novas terapias de câncer de mama, incluindo vacinas e fármacos, como o trastuzumab, anticorpo monoclonal que tem como alvo a proteína HER2. Ele se liga à proteína HER2 e ativa células do sistema imune, auxiliando o organismo a combater o tumor. O trastuzumab impede que HER2 transmita sinais que estimulam o crescimento do tumor. Por ser um medicamento específico para pacientes com câncer de mama HER2 positivo, os efeitos colaterais são muito menores em comparação com a quimioterapia citotóxica convencional (LUO et al., 2016; MATSUDA et al., 2017).

1.2.4 Tumores triplo negativos e não triplo negativos

A avaliação em conjunto dos RE e RP é uma variante importante para diferenciar o tipo de câncer de mama (DONEPUDI et al., 2014). Estima-se que 40% dos tumores que apresentam RE positivo e RP negativo são menos sensíveis ao tratamento endócrino, particularmente os metastáticos em tratamento com moduladores seletivos de RE. Os tumores RE e RP positivos estão associados a idade mais avançada, menor tamanho do tumor e menor taxa de mortalidade. Já os RE e RP negativos (18% a 25% dos tumores, sendo 85% grau 3) estão associados a maior taxa de recorrência e sobrevida global inferior e não respondem à terapia medicamentosa endócrina (DONEPUDI et al., 2014; LUO et al., 2016).

Ensaios empregando RE, RP e HER2 para pacientes recém-diagnosticadas com câncer de mama são importantes, pois estes biomarcadores podem se relacionar com fatores prognósticos. Pacientes com tumores que apresentam positividade para um ou mais dos três receptores, que podem ser chamados de câncer de mama não triplo negativos (NTN), podem ter melhor prognóstico, com boa resposta a tratamentos convencionais, como quimioterapia e terapia hormonal (DONEPUDI et al., 2014).

Os tumores que não apresentam em sua superfície as expressões de RE, RP e HER2 são chamados câncer de mama triplo negativos (TN) (YUAN et al., 2014). Entre todos os subtipos do câncer de mama, os tumores desse grupo têm despertado especial interesse. Cerca de 10% a 20% dos cânceres de mama estão nessa categoria e apresentam mau prognóstico, padrão inicial de metástase agressivo e relativa falta de alvos terapêuticos quando comparados aos cânceres de mama RE, RP e HER2 positivos. Com a falta de terapias direcionadas para os tumores TN, os regimes de tratamento frequentemente não conseguem retardar sua progressão. Desse modo, torna-se importante identificar e caracterizar os biomarcadores RE, RP e HER2 do câncer de mama (DAI et al., 2016; MOUH et al., 2016; SCHMADEKA; HARMON; SINGH, 2014).

Os tumores TN apresentam maior incidência em mulheres jovens, abaixo de 40 anos, e em decorrência de sua forte capacidade de invasão, têm prognóstico desfavorável, grande malignidade e alta recorrência. Consequentemente, as pacientes com tumores TN têm menor taxa de sobrevida em comparação com aquelas afetadas

por outros tipos de câncer de mama (BRENNER et al., 2016; JOYCE; KERIN; DWYER, 2016). No que concerne aos diagnósticos por imagem, os tumores TN são mais propensos a ficar ocultos na mamografia e na ultrassonografia, tendo proporção muito menor de detecção em abordagens primárias (diagnóstico e estadiamento) em relação a outros tipos de câncer de mama (LEHMAN; PIETENPOL, 2014).

Devido a essa heterogeneidade e dificuldade de diagnóstico dos tumores TN, a imuno-histoquímica exerce papel importante no auxílio do diagnóstico e conduta terapêutica. Pacientes com tumores TN não respondem à terapêutica endócrina ou direcionada para HER2 e o tratamento recomendado envolve uma combinação de terapias comumente utilizadas, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia neoadjuvante (JOYCE; KERIN; DWYER, 2016).

1.3 Subtipos do câncer de mama

Acredita-se que as divergências evidenciadas no comportamento biológico entre tumores microscopicamente similares possam ser justificadas pela complexidade do câncer de mama e pelo acúmulo de alterações moleculares (LINDSTEN et al., 2017). Assim sendo, o estudo do perfil molecular do carcinoma de mama, proposto por Perou e outros (2000), permitiu distinguir os subtipos tumorais e os conceitos nos quais se baseia a classificação molecular atual. O perfil molecular correlaciona os subtipos de carcinoma de mama com parâmetros clínicos, como as diferenças significativas em termos de incidência, fatores de risco, fatores prognósticos, tempo de sobrevida, tempo livre de doença e sensibilidade ao tratamento (MAKKI, 2015; PRAT et al., 2015).

Os biomarcadores avaliados no momento do diagnóstico permitem identificar os subtipos do câncer de mama que mostram utilidade para orientar de forma eficaz o tratamento sistêmico. As análises de microarranjos de DNA permitiram a classificação dos cânceres de mama, indicando cinco tipos essenciais: luminal A, luminal B, superexpressor de HER2, *basal-like* e *normal-like* (PEROU et al., 2000). Esses tipos mostraram-se diferentes na evolução clínica do câncer de mama (PATANI; MARTIN; DOWSETT, 2013; SONG; MERAJVER; LI, 2015).

O subtipo luminal A é o mais comum, correspondendo a cerca de 30% a 40% dos casos, e apresenta origem em células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-

lobulares, com baixo grau histológico, baixo grau de pleomorfismo nuclear e baixa atividade mitótica (ZHENG et al., 2016). É caracterizado por níveis mais altos de RE e RP, HER2 negativo e baixo índice do antígeno nuclear de proliferação celular Ki67, apresentando bom prognóstico e baixa taxa de recidiva em relação a outros subtipos. O tratamento baseia-se principalmente em terapia hormonal e radioterapia (MAKKI, 2015).

O subtipo luminal B compreende de 15% a 20% dos cânceres de mama e tem fenótipo mais agressivo, alto grau histológico, alto índice proliferativo e pior prognóstico. Este subtipo tem maiores taxas de recorrência e menores taxas de sobrevivência após recidiva em comparação com o subtipo luminal A (YERSAL; BARUTCA, 2014). Está significativamente associado a maior risco de recorrência e a menor sobrevida livre da doença específica em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico. Também está associado à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno, demonstrando beneficiar-se mais do que o subtipo luminal A de quimioterapia associada a antiestrogênicos (ZHENG et al., 2016).

O subtipo superexpressor de HER2, que ocorre em 15% a 20% dos casos, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para RE e RP. As pacientes têm aumento da sensibilidade a certos agentes citotóxicos, resistência em relação a agentes hormonais e propensão a metástase cerebral e visceral. Indica-se a prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica que apresente alta sensibilidade à terapia alvo-específica com anticorpo monoclonal (YERSAL; BARUTCA, 2014).

O subtipo *basal-like*, que tende a ocorrer em mulheres mais jovens, tem ocorrência estimada também em 15% a 20%. Está associado com alto grau histológico e alto grau nuclear, presença de zonas de necrose ou fibrose centrais, infiltrado linfocitário e características medulares com elevado índice de proliferação celular, elevado índice de Ki67 e elevada taxa de mutação p53. A maioria dos tumores deste subtipo tem característica infiltrante, com crescimento sólido, comportamento clínico agressivo e elevada taxa de metástase cerebral e pulmonar (MAKKI, 2015; YERSAL; BARUTCA, 2014). Os tumores deste subtipo expressam níveis elevados de marcadores mioepiteliais basais, tais como CK5, CK14 e CK17, e não expressam RE, RP e HER2. Embora esses tumores não apresentem resposta à terapia endócrina ou à terapia com anticorpos monoclonais, mostram sensibilidade à quimioterapia neoadjuvante (MAKKI, 2015).

Os tumores do tipo *normal-like* são responsáveis por cerca de 5% a 10% de todos os carcinomas de mama. Eles expressam características genéticas de tecido adiposo e apresentam prognóstico intermediário entre tumores dos tipos luminal A e B e *basal-like*. Como faltam as expressões de RE, RP e HER2, os tumores deste subtipo também podem ser classificados como TN, mas não são considerados *basal-like*, pois não expressam os marcadores mioepiteliais basais. Existem poucos estudos sobre este subtipo e seu significado clínico permanece indeterminado (BARROS; LEITE, 2015; ZHENG et al., 2016).

1.4 Fatores prognósticos do câncer de mama

O câncer de mama não tem uma causa única. Diversos fatores estão relacionados com o aumento do risco de desenvolver a doença, entre os quais, destacam-se: idade, fatores endócrinos, história reprodutiva, fatores comportamentais, ambientais, genéticos e hereditários (SHIGDAR et al., 2013).

Fatores prognósticos e preditivos constituem ferramentas importantes para a individualização da terapia do câncer de mama com o objetivo de fornecer tratamentos eficientes a pacientes com excelente perfil de baixo risco. Desse modo, evitam-se efeitos colaterais indesejáveis e, muitas vezes, tratamentos excessivos (LOPES et al., 2015).

Fatores preditivos são entendidos como marcadores que auxiliam a fazer predições sobre a possibilidade de o paciente vir a desenvolver algum tipo de doença. Com isso, pretende-se propiciar ao paciente o conhecimento prévio de uma doença para a qual tenha predisposição, quer seja por fatores genéticos e hereditários ou por fatores comportamentais e ambientais, com o objetivo de vislumbrar a melhor forma de prevenção ou mesmo de amenização. Portanto, visa-se a prevenção de doenças (CHOI et al., 2018).

Entende-se como fator prognóstico qualquer marcador, à época do diagnóstico ou do tratamento cirúrgico, que possa ser associado ao tempo livre de doença ou à sobrevida global na ausência de terapia sistêmica adjuvante. Esses fatores podem ser usados para prever a história natural do tumor. A aplicação criteriosa de fatores prognósticos estabelecidos e validados é essencial para aumentar a utilização de terapia sistêmica e, conseqüentemente, diminuir a mortalidade (LOPES et al., 2015; STIVAL et al., 2012). Para estabelecer um diagnóstico preciso, torna-se relevante validar alguns

fatores prognósticos, como o tamanho do tumor, a presença de linfonodos acometidos pelo tumor, a presença de receptores hormonais, o grau histológico, o tipo histológico e a idade no momento do diagnóstico (STIVAL et al., 2012). Os mais importantes fatores prognósticos do câncer de mama estão relacionados no Quadro 1.

Quadro 1. Fatores prognósticos mais importantes do câncer de mama.

Idade	A idade da paciente na época do diagnóstico é fator importante, pois está diretamente relacionada ao período da menopausa e, conseqüentemente, à ação hormonal no crescimento tumoral.
Tamanho tumoral	O tamanho tumoral é uma variável essencial para estabelecer uma proposta terapêutica para a paciente. Há relação direta entre tamanho tumoral, acometimento axilar, taxa de recorrência da doença e metástase à distância. Assim, quanto maior o tumor, pior o prognóstico.
Grau histológico	O grau histológico é fator muito importante, porquanto tem associação significativa com a sobrevida de pacientes de câncer de mama. O sistema de classificação mais comumente utilizado para avaliar o grau de diferenciação tumoral combina grau nuclear, formação tubular e frequência mitótica.
Acometimento axilar	É considerado um dos fatores prognósticos mais importantes. A presença de metástases axilares é um fator independente e aponta para característica mais agressiva do tumor. O número de linfonodos acometidos tem relação direta com o prognóstico da paciente. O risco de comprometimento dos linfonodos axilares é diretamente proporcional ao tamanho do tumor.
Receptores hormonais	Os receptores hormonais são considerados tanto fatores prognósticos quanto fatores preditivos. A presença de RE e RP é forte fator preditivo para o tratamento hormonal, utilizado após o tratamento cirúrgico, quimioterápico e radioterápico por um período de 5 anos.
Oncogene HER2	O HER2 é uma glicoproteína transmembranária envolvida no controle do crescimento celular. Sua superexpressão está associada a maior agressividade tumoral, taxas de recorrência mais altas e maior número de linfonodos positivos.

Fonte: Baseado em Lopes e outros (2015).

Alguns fatores prognósticos têm dupla função, pois além de exercer este papel, também podem ser considerados fatores preditivos. Isso permite o estabelecimento de terapias específicas para o tratamento do tumor (LOPES et al., 2015).

O sistema de estadiamento tumoral é utilizado para determinar tanto a extensão do câncer presente no organismo de um paciente quanto sua localização. Também é a forma como se determina a progressão da doença (INCA, 2017). Para o câncer de

mama, o estadiamento engloba fatores prognósticos importantes descritos anteriormente, sendo classificado por meio do sistema TNM, da AJCC, que avalia o tamanho do tumor primário (T), o envolvimento linfonodal (N) e a metástase à distância (M), como mostrado no Quadro 2.

Os fatores prognósticos clássicos para o câncer de mama, como estadiamento tumoral, tipo e grau histológico, expressão de receptores hormonais e idade são relevantes nas decisões de conduta terapêutica de pacientes com neoplasia mamária. Porém, em decorrência da heterogeneidade do câncer de mama, o curso clínico da doença e a sobrevida variam entre pacientes. Assim, fatores como potencial de metastatização do tumor e relação entre o processo inflamatório no microambiente tumoral e o comportamento da neoplasia estão sendo estudados e avaliados com relevância no prognóstico de mulheres com câncer de mama (CHOI et al., 2018).

1.5 Macrófagos associados a tumor (TAMs)

O microambiente tumoral é rico em células do sistema imune que têm importante atuação no tecido neoplásico, podendo interferir em seu desenvolvimento e progressão (QUAIL; JOYCE, 2013). O sistema imune pode atuar antecedendo a existência da célula tumoral, contribuir para a transformação de célula normal em cancerígena e, posteriormente, atuar durante a instalação e a progressão do tumor (PELLO et al., 2012).

A inflamação é considerada uma característica do câncer e pode desempenhar papel em praticamente todos os aspectos da biologia do tumor, incluindo iniciação, promoção, angiogênese e metástase (BAUMGARTEN; FRASOR, 2012). As principais características da inflamação associada ao câncer incluem infiltração de leucócitos, presença de mediadores solúveis (citocinas e quimiocinas), remodelação de tecidos e angiogênese (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGGER, 2016; LINDSTEN et al., 2017).

Os próprios tumores são capazes de gerar e responder aos microambientes inflamatórios. Contribuem para um microambiente inflamatório fatores tais como alterações oncogênicas dentro do tumor, hipóxia, secreção de moléculas que atraem células inflamatórias e necrose de células tumorais (MANTOVANI et al., 2017).

Quadro 2. Critérios do sistema de estadiamento tumoral TNM para câncer de mama.

Tumor primário (T)	Indica o tamanho do tumor primário e se este se disseminou para outras áreas. O T, acompanhado de um número (0 a 4), é usado para descrever o tumor primário, particularmente o seu tamanho	TX – Tumor principal não pode ser avaliado T0 – Nenhum sinal de tumor foi detectado Tis – Carcinoma <i>in situ</i> T1 – Tumor com até 2 cm de diâmetro T2 – Tumor entre 2 cm e 5 cm de diâmetro T3 – Tumor com mais de 5 cm de diâmetro T4 – Tumor de qualquer tamanho que invadiu o tórax ou a pele
Linfonodos regionais (N)	Descreve se existe disseminação da doença para os linfonodos regionais ou se há evidência de metástases em trânsito. Também pode ser acompanhado de um número (0 a 3), que indica se a doença se disseminou para os gânglios linfáticos	NX – Linfonodos regionais não podem ser avaliados N0 – Linfonodos próximos estão livres N1 – Tumor se disseminou para 1 ou 3 linfonodos axilares e/ou linfonodos mamários internos N2 – Tumor se disseminou para 4 ou 9 linfonodos axilares ou para linfonodos mamários internos N3 – Tumor se disseminou para 10 ou mais linfonodos axilares, com pelo menos uma área da doença maior do que 2 mm, ou tumor se disseminou para os gânglios linfáticos claviculares, com pelo menos uma área da doença maior do que 2 mm
Metástase à distância (M)	Indica se existe presença de metástase em outras partes do corpo	M0 – Ausência de metástases à distância M1 – Metástases à distância
Estágios do câncer de mama: Estágio 0 – Tis, N0, M0 Estágio IA – T1, N0, M0 Estágio IB – T0 ou T1, N1mi, M0 Estágio IIA – T0 ou T1, N1 (mas, não N1mi), M0; T2, N0, M0 Estágio IIB – T2, N1, M0; T3, N0, M0 Estágio IIIA – T0 a T2, N2, M0; T3, N1 ou N2, M0 Estágio IIIB – T4, N0 a N2, M0 Estágio IIIC – Qualquer T, N3, M0 Estágio IV – Qualquer T, qualquer N, M1		

Fonte: Adaptado de AJCC (2018).

As células do sistema imune são especialistas em reconhecer patógenos e eliminar rapidamente células infectadas. Porém, são também essenciais para promover a ativação do sistema de adaptação do reparo tecidual e de remodelagem (SZEBENI et al., 2017). Essas células se acumulam em tumores sólidos, como os da mama, causando o acúmulo de substâncias promotoras do crescimento celular, fatores angiogênicos e moléculas imunossupressoras, e assumindo fenótipos diferentes, dependendo das substâncias a que são expostas (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGER, 2016). Nesse contexto, ganham importância algumas células do sistema imune, como monócitos, macrófagos, células dendríticas, *natural killers* e granulócitos, além de fibroblastos e da matriz extracelular (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGER, 2016; SZEBENI et al., 2017).

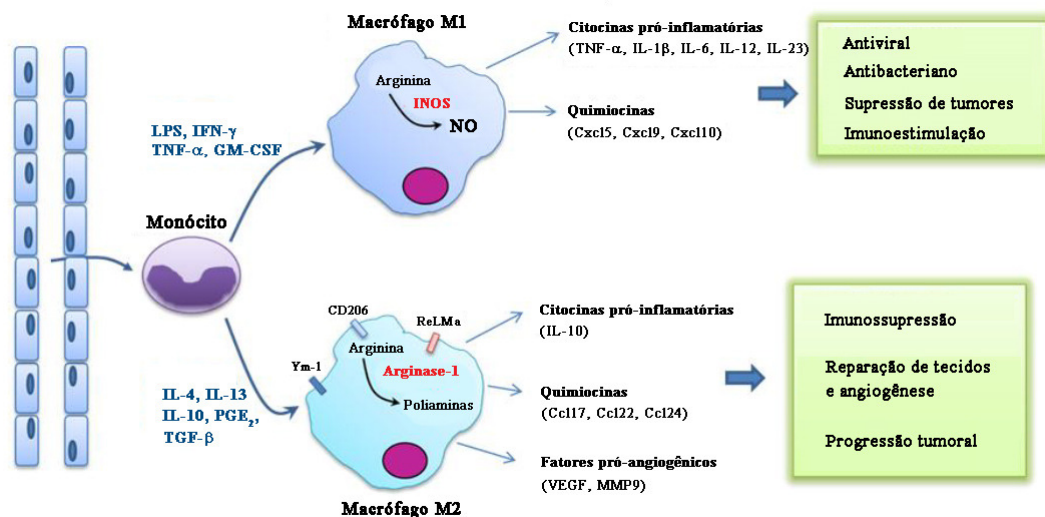
Os macrófagos são células fagocíticas heterogêneas envolvidas em múltiplos processos, tanto em condições homeostáticas como durante a resposta imunológica após lesão tecidual ou exposição a um patógeno (BISWAS; ALLAVENA; MANTOVANI, 2013). São capazes de realizar funções diversificadas, como inflamação, atividade antimicrobiana, imunorregulação, remodelação de tecidos e promoção de tumores, dependendo do microambiente (PELLO et al., 2012). Além disso, são caracterizados por marcante heterogeneidade, que pode ser parcialmente atribuída à sua origem por autorrenovação de células pós-mitóticas residentes e por subconjuntos de monócitos recrutados (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGER, 2016). Outro elemento determinante da heterogeneidade dos macrófagos é o microambiente. Sob condições homeostáticas, com o tecido hospedeiro influenciando profundamente a diferenciação dos macrófagos, no caso de uma resposta inflamatória ou imune há geração de uma ampla gama de estados de ativação polarizados (MANTOVANI et al., 2017).

Como apresentam alta plasticidade, os macrófagos têm um amplo espectro de estados de ativação, os quais vão desde os macrófagos ativados de forma clássica (M1) até os macrófagos ativados alternativamente (M2) (DEHNE et al., 2017; SZEBENI et al., 2017). Os M1 secretam: interferon- γ (IFN- γ) por estímulos de lipopolissacarídeos (LPS); citocinas inflamatórias, como as interleucinas (IL) IL-6 e IL-12; espécies reativas de oxigênio (ROS); espécies reativas de nitrogênio (RNS); e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (WANG; LIANG; ZEN, 2014). Os M1 são responsáveis por eliminação de agentes patogênicos, destruição de tecidos e resistência tumoral, em virtude de sua grande atividade citotóxica e da resposta imune que desencadeiam. A

ação dos M1 é mediada por estímulos de IFN- γ , TNF- α , receptores do tipo *toll* (TLR) e LPS, enquanto a dos M2 é mediada por IL-4 e IL-13, atuando por intermédio do receptor IL-4R (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGER, 2016).

A ação dos M1 leva à produção de IL-1, IL-12, IL-23, TNF- α e ligante 10 da quimiocina CXC (CXCL10), bem como de ROS e RNS, como o óxido nítrico (NO), que tem potente atividade microbicida. Além disso, os M1 expressam altos níveis antigênicos das classes I e II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), o que lhes permite funcionar como células apresentadoras de antígenos. Os marcadores humanos validados dos M1 incluem os grupamentos de diferenciação (CD) CD14, CD16, CD64, CD68, CD86 e antígeno leucocitário humano do MHC, classe II, DR alfa (HLA-DRA) (MANTOVANI et al., 2017), como apresentado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da polarização de macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos ativados alternativamente (M2).



Fonte: Adaptada de Hortelano (2014, p. 2, tradução nossa).

Os M2 têm propriedades imunomoduladoras e estão associados a remodelação de tecidos, angiogênese e progressão tumoral (Figura 2). Os M2 podem ser subdivididos em M2A, M2B e M2C. Os M2A surgem a partir de estímulos produzidos por IL-4 ou IL-13 e liberam citocinas de remodelação da matriz. Expressam baixos níveis das citocinas inflamatórias e perdem a capacidade de liberação e de produção de ROS e

RNS, importantes para a ação tumoricida. Entre os RNS, o NO é a principal molécula, e interage com proteínas e ácidos ribonucleicos, inibindo a proliferação das células tumorais (FERIOTTI et al., 2013; SOUSA et al., 2015).

Nos tecidos neoplásicos, os sinais que orquestram a função dos TAMs são diversos e variam entre diferentes tumores, ou mesmo em diferentes partes do mesmo tumor (MANTOVANI et al., 2017). Os TAMs representam o principal componente do infiltrado imunológico do estroma de tumores sólidos, já que podem representar até 50% da massa tumoral, e desempenham papel fundamental no desenvolvimento do tumor (SZEKENI et al., 2017).

Os TAMs secretam fatores solúveis, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que induzem a angiogênese e aliviam parcialmente o estresse hipóxico em tumores de crescimento rápido (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGGER, 2016). A angiogênese é um evento crítico essencial para o crescimento e a persistência de tumores sólidos e suas metástases, como o câncer de mama (LI et al., 2016). Em adição a isso, os TAMs dão suporte para a sobrevivência, a migração e a invasão de células tumorais por meio da secreção de fatores de crescimento, tais como EGF e fator de crescimento de fibroblasto (FGF), e quimiocinas, como CXCL1/2. Os TAMs não apenas segregam fatores de crescimento como também facilitam a liberação de fatores pró-tumorigênicos da matriz extracelular (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGGER, 2016; MANTOVANI et al., 2017). Por outro lado, os TAMs também podem colaborar com uma eficaz resposta antitumoral através da produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-12, IL-23 e IFN- γ , e da interação com as células do sistema imune adaptativo, CD4, CD8 e linfócitos T (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGGER, 2016; MANTOVANI et al., 2013; MANTOVANI et al., 2017).

Os marcadores estabelecidos para detectar a presença de macrófagos são MAC 387, CD11c (Ki-M1), CD68 (Ki-M1P, Ki-M6, Ki-M8, Kp-1 e PG-M1), Max.1, Max.2, Max.3, Max.11 e HAM56. Os macrófagos também reagem com os anticorpos vimentina, fator XIIIa (apenas os macrófagos alveolares) e CD4. Os M1 são comumente identificados pela coloração do antígeno CD11c, ao passo que os M2 são identificados pelos antígenos CD163 e MRC1 (MOHAMMED et al., 2012a; WEBER et al., 2018).

A ocorrência de infiltrado inflamatório no câncer de mama pode relacionar-se positivamente a diversos fatores prognósticos, como alto grau histológico, negatividade para RE e RP e invasão vascular. Os linfócitos e macrófagos são as principais células

presentes no infiltrado inflamatório peritumoral no câncer de mama (MOHAMMED et al., 2012b). A atividade imunológica dos TAMs no câncer de mama está relacionada à produção de citocinas, tais como IL-10 e TGF- β , que promovem a imunossupressão local e colaboram com o crescimento e a progressão do tumor, podendo, portanto, estar relacionadas com mau prognóstico (BRADY; CHUNTOVA; SCHWERTFEGER, 2016).

Em um estudo de coorte incluindo 144 pacientes com câncer de mama invasivo, a infiltração e a localização dos macrófagos CD163+ e CD68+ em estroma tumoral apresentaram relevância clínica como fatores prognósticos. A maior infiltração de CD163+ no estroma tumoral foi fortemente associada a características clínico-patológicas menos favoráveis, como tamanho do tumor, RE e RP negativos. Na região próxima ao tumor, o número de CD163+ não se correlacionou de maneira significativa com nenhuma característica clínico-patológica, assim como a presença de CD68+ tanto no estroma tumoral quanto na região próxima ao tumor. A alta infiltração de CD68+ esteve associada com redução da sobrevida do grupo avaliado (MEDREK et al., 2012).

Ao analisar retrospectivamente amostras de tumor de pacientes com câncer de mama tratadas com tamoxifeno, provenientes de um estudo prospectivo randomizado e de uma coorte multi-institucional, confirmou-se que a migração de TAMs teve associação significativa com alto grau histopatológico. As pacientes com altas taxas de infiltração de TAMs tiveram sobrevida livre de doença significativamente menor em 5 anos do que aquelas com baixas taxas. Além disso, para as pacientes com linfonodos axilares negativos, alta infiltração de TAMs indicou taxas de sobrevida acentuadamente mais baixas do que as observadas para aquelas com baixa infiltração. A análise multivariada confirmou que a presença de elevada população de TAMs foi fator prognóstico independente para pacientes com câncer de mama (ZHANG et al., 2013).

Pacientes com alta infiltração de TAMs representaram 35,9% dos 287 casos de câncer de mama de um estudo retrospectivo. A alta infiltração de TAMs foi associada com maior proporção de linfonodos positivos e invasão vascular. As pacientes com câncer de mama TN com elevada infiltração de TAMs apresentaram risco significativamente mais elevado de desenvolver metástases. A análise multivariada mostrou que a infiltração de TAMs foi fator prognóstico ruim, independentemente da taxa de sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama TN (YUAN et al., 2014).

Em outro estudo retrospectivo, com 36 pacientes, a quantidade de TAMs foi preditiva para o crescimento eficiente do tumor e a disseminação metastática por meio da circulação sanguínea. A maior expressão de CD68 foi observada em áreas com estroma fibroso macio ou em áreas com relação estromal e parenquimatosa máxima. Foi confirmada a correlação inversa entre tamanho do tumor e expressão de CD68 nas lacunas das estruturas tumorais tubulares ($R = -0,67$; $p = 0,02$) (BULDAKOV et al., 2015).

Utilizando imuno-histoquímica em um amplo estudo de coorte em pacientes com tumores de mama primários, constatou-se que, clinicamente, um número elevado de macrófagos M2 CD163+ está fortemente associado com a proliferação rápida destes tumores. No referido estudo, evidenciou-se que a presença do marcador CD163 correlacionou-se com fatores sabidamente associados a mau prognóstico, tais como RE negativo, grau 3 do estadiamento TNM e tipo de câncer ductal invasivo (SOUSA et al., 2015).

Em estudo com 48 pacientes, demonstrou-se correlação entre maior infiltração de macrófagos CD68+ e gravidade do tumor. As pacientes com tumores TN e alta infiltração de macrófagos CD68+ tiveram taxas de sobrevida reduzidas em comparação com o grupo com baixa infiltração (WANG; LIANG; ZEN, 2014).

TAMs foram analisados em cultura de células de tumores de mama TN em alta e baixa expressão em relação à citocina G-CSF, que atua em respostas inflamatórias e imunomoduladoras. Foram utilizados anticorpos CD68 para determinar a presença de macrófagos e o marcador CD163 para M2. Notou-se que a presença de maior número de M2 CD163+ relacionou-se com maior expressão da citocina G-CSF em tumores de mama, o que pode promover a migração de células tumorais, validando uma ação pró-inflamatória dos TAMs (HOLLMÉN et al., 2015).

O início precoce do câncer de mama, a alta proliferação e a infiltração de células imunitárias foram avaliados em amostras de tecido com câncer de mama e de tecido normal. Os autores encontraram maior número de células CD68+ e CD163+ nas amostras de tecido com câncer de mama do que naquelas sem câncer de mama. Concluíram que os tecidos com câncer de mama podem ter maior infiltração de macrófagos, o que pode estar associado a papéis de pró-tumor durante a progressão da doença (SAWE et al., 2016).

Estudos recentes mostraram que o aumento de TAMs nos tumores mamários correlaciona-se com características clínico-patológicas das pacientes, como alto grau histológico e linfonodos acometidos, caracterizando possível associação entre a infiltração elevada de macrófagos e um prognóstico ruim do câncer de mama (LINDSTEN et al., 2017; YUAN et al. 2014). No microambiente tumoral, os TAMs produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas, bem como de fatores de crescimento, os quais desempenham papéis essenciais no crescimento de tumores e metástases (WEBER et al., 2018). Com base em hipóteses que sugerem que a alta infiltração de TAMs se relaciona com prognóstico ruim do câncer de mama, interessa analisar a possível associação entre a presença de TAMs e fatores clínicos e patológicos de pacientes com câncer de mama e avaliar o impacto desta presença no microambiente tumoral como possível marcador prognóstico para o câncer de mama.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma doença muito heterogênea, com vários padrões de tumores, os quais podem ter características de desenvolvimento semelhantes, porém, com desfechos diferentes em relação a fatores prognósticos. O carcinoma de mama ductal invasivo é um tipo histológico com presença de pleomorfismo celular e capacidade infiltrativa alta, o que lhe confere alto poder invasivo. Os TAMs representam o principal componente do infiltrado imunológico do estroma de tumores sólidos, desempenhando importante papel em seu desenvolvimento. Os TAMs podem exibir atividade pró-tumoral, como efeito anti-inflamatório, imunossupressão, fatores tróficos de crescimento e sobrevivência e fatores angiogênicos.

A análise de possíveis biomarcadores macrofágicos associados ao comportamento mais agressivo dos carcinomas de mama, bem como as informações clínicas e de prognóstico, podem ser úteis na abordagem de pacientes com estas neoplasias. A compreensão acerca da presença de TAMs no microambiente tumoral contribui para o melhor entendimento do comportamento biológico da neoplasia mamária, em especial do tipo tumoral de maior agressividade, o TN. Em adição a isso, os TAMs despontam como possíveis marcadores prognósticos para o câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a relação da presença de macrófagos no microambiente tumoral e o seu valor prognóstico em casos de mulheres com câncer de mama em um hospital oncológico de referência.

3.2 Objetivos específicos

- a. Detectar macrófagos no microambiente tumoral em casos de mulheres com câncer de mama;
- b. Analisar a relação entre a presença de macrófagos e os fatores clínico-patológicos em casos de mulheres com câncer de mama;
- c. Analisar a relação entre a presença de macrófagos e a sobrevida em casos de mulheres com câncer de mama.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Este é um estudo de corte transversal retrospectivo constituído de um grupo de mulheres com diagnóstico histopatológico de carcinoma de mama. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer de Goiás (CEP/ACCG), protocolo nº 1.537.899 (Anexo A). Por ser um estudo de natureza retrospectiva, para o qual foram utilizadas amostras de biópsias ou de peças cirúrgicas incluídas em parafina de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama, houve a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Tamanho amostral

O estudo incluiu um grupo de 93 casos de mulheres com diagnóstico histopatológico confirmado de câncer de mama. A seleção foi feita a partir de uma busca ativa nos registros dos exames anatomopatológicos realizados no Setor de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Araújo Jorge, no município de Goiânia, GO, com os diagnósticos histopatológicos já especificados. As lâminas coradas por hematoxilina-eosina de cada exame anatomopatológico foram revistas e os casos foram selecionados de acordo com os diagnósticos histológicos, através de análises imuno-histoquímicas para RE, RP e HER2, realizadas pelo laboratório do SAP do Hospital Araújo Jorge, e descritos nos prontuários.

4.3 Coleta de dados

Os dados clínicos e histopatológicos foram coletados dos prontuários médicos, revistos manualmente para correção e, posteriormente, inseridos em planilha digital (Microsoft Excel).

4.4 Seleção de casos

Para compor o presente estudo, foram selecionados 234 registros do SAP do Hospital Araújo Jorge de mulheres diagnosticadas com carcinoma de mama entre os anos de 2006 e 2007. Os espécimes tumorais relativos ao diagnóstico primário foram levantados a partir do arquivo de blocos em parafina. Desses, apenas 93 registros obedeceram aos critérios de inclusão estabelecidos.

4.4.1 Critérios de inclusão

No presente estudo, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão:

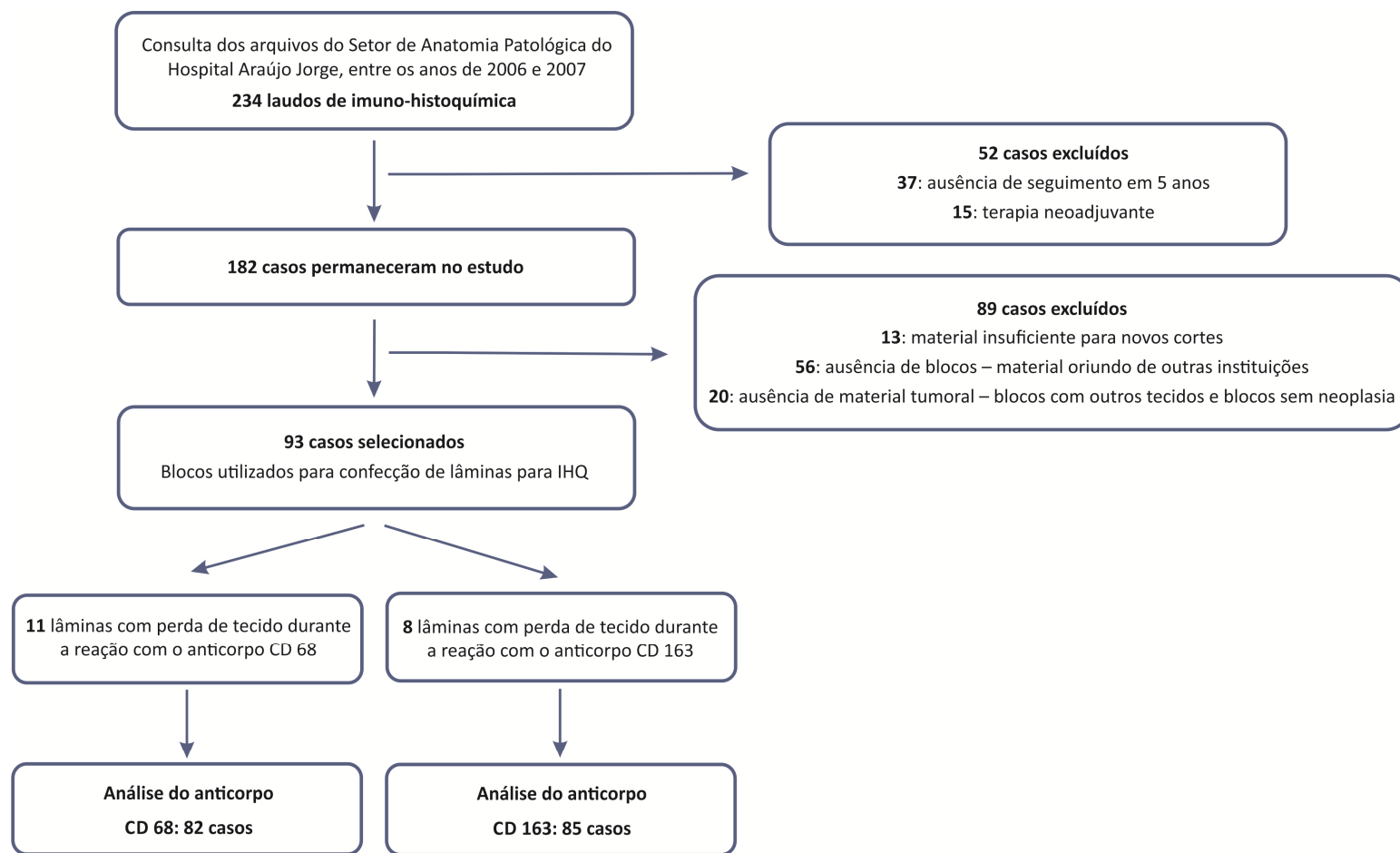
- a. Mulheres com diagnóstico de câncer de mama ductal invasivo;
- b. Tumores com painel imuno-histoquímico de RE, RP e HER2 confirmado;
- c. Dados clínico-patológicos disponíveis nos prontuários;
- d. Seguimento clínico por 5 anos;
- e. Amostras de tumor em blocos de parafina com material disponível e suficiente para as análises.

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os casos de:

- a. Outros tipos de câncer não ductal;
- b. Pacientes do sexo masculino;
- c. Pacientes submetidas a terapias neoadjuvantes;
- d. Amostras de tumor em blocos de parafina oriundas de outras instituições (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma de distribuição dos casos estudados.



Fonte: Original da autora para este trabalho.

4.5 Variáveis dependentes

As expressões dos biomarcadores macrófagos CD68 e CD163 foram utilizadas como variáveis dependentes.

4.6 Variáveis independentes

As variáveis independentes deste estudo foram as características clínico-patológicas de mulheres com câncer de mama e a evolução clínica da doença.

4.7 Análises imuno-histoquímicas

Neste estudo, foram selecionadas amostras de tumor em blocos de parafina e, a partir destas, foram confeccionadas lâminas para as análises imuno-histoquímicas utilizando o método da imunoperoxidase associada a polímeros.

4.7.1 Marcadores CD68 e CD163 de macrófagos

Para a análise imuno-histoquímica da expressão do marcador para macrófagos CD68, foi utilizado anticorpo monoclonal CD68, que é um marcador pan-macrófago, frequentemente utilizado como marcador universal para TAMs (anti-CD68 humano-específico KP1, DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos, diluição 1:500) empregando o método da imunoperoxidase associada a polímeros (kit comercial Novolink Max Polymer Detection System Novocastra, Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Utilizou-se o procedimento operacional padrão do Laboratório de Imuno-histoquímica da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-Goiás) (Apêndice A).

Para a análise imuno-histoquímica da expressão do marcador para macrófagos M2, foi utilizado anticorpo monoclonal CD163 (anti-CD163 humano-específico IGG1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos, diluição 1:100) empregando o método da imunoperoxidase associada a polímeros (kit comercial Mini EnVision Detection System DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados

Unidos). Utilizou-se o procedimento operacional padrão do Laboratório de Imuno-histoquímica da PUC-Goiás (Apêndice B).

As análises imuno-histoquímicas para macrófagos CD68 e CD163 foram realizadas em 82 em 93 amostras, respectivamente. Os cortes de tumores de mama, montados em lâminas silanizadas, foram desparafinizados em xilol, em temperatura controlada e, depois, reidratados em uma série de lavagens em álcool (100%, 80% e 50%, respectivamente). Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor úmido, em panela de pressão elétrica de 5 L (Britânia Eletrodomésticos, Curitiba, PR), por 7 min, utilizando citrato 10 mM, pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente para resfriamento por cerca de 20 min e lavadas em água corrente. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 10V a 3% por 10 min e, em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente e enxaguadas com tampão fosfato salino (PBS). Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas a 4°C, durante a noite, em solução de PBS contendo 1% de albumina bovina. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em água corrente e PBS e incubadas por 30 min com o polímero contendo cerne de dextran. Depois de uma nova lavagem com água corrente e PBS, a reação foi revelada com tetra-hidroclorato de 3-3'diaminobenzidina por 5 min e as lâminas foram levemente contraincoradas com hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool e xilol e montadas com lamínula usando Entellan Novo (Merk KGaA, Darmstadt, Alemanha). Um controle positivo foi incluído em cada reação realizada, utilizando um caso de carcinoma de boca invasor de células escamosas, provado previamente como positivo para CD68, e um caso de xantogranuloma, provado previamente como positivo para CD163. Todas as reações foram processadas nas mesmas condições ambientais.

4.7.2 Contagem das células

As lâminas foram avaliadas de forma cega por dois observadores independentes e a contagem de células ocorreu com a determinação do número de células marcadas pelos biomarcadores em região peritumoral em 10 campos *hot spot*. A contagem de células CD68+ ocorreu com a determinação do número de células marcadas com o anticorpo, utilizando como referência a avaliação semiquantitativa de Hollmén e outros (2015). Os casos foram classificados considerando o número de células marcadas na

superfície do tumor, sendo marcação fraca/moderada em $< 30\%$ da superfície do tumor e marcação forte em $\geq 30\%$ da superfície do tumor. Foram considerados macrófagos corados pelo marcador na região peritumoral em 10 campos de alta potência microscópicos alternados (400x). Os macrófagos CD163+ foram contados considerando o número médio daqueles corados pelo marcador na região peritumoral em cinco campos *hot spot* de alta potência microscópicos alternados (400x), utilizando como referência a avaliação semiquantitativa de Tiainen e outros (2015). Foram considerados: Grupo 1 – casos com baixa infiltração de células CD163+; Grupo 2 – casos com alta infiltração de células CD163+.

4.7.3 Análise estatística

O método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank foram utilizados para análise das curvas de sobrevida com seguimento por um período de 5 anos. Para a realização da análise estatística, os dados foram submetidos às análises bivariada e multivariada. Verificou-se associação entre os fatores clínico-patológicos e os grupos de células marcadas com os macrófagos CD68+ (Grupo 1 e Grupo 2) e CD163+ (Grupo 1 e Grupo 2) por meio de análise bivariada, considerando o nível de significância de 5%. As variáveis com $p < 0,2$ foram consideradas na regressão logística. Para verificar a força da correlação entre os fatores clínico-patológicos e os grupos de contagem dos macrófagos foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Todos os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa Stata 13.0 e o limiar para significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Artigo 1 – Impact of tumour-associated macrophages (TAMs) in tumour microenvironment as prognostic markers in breast cancer

Autores: Luciana V. Q. Labre, Vera A. Saddi, Aline C. Batista, Juliana F. Paes, Nathalia Amaral, Jessica Enocência, Cesar A. S. T. Vilanova-Costa, Erika C. Aquino, Silvia H. Rabelo-Santos

Submetido ao periódico Histopathology (normas de publicação Anexo B; recibo de submissão ao periódico Anexo C)

Artigo 2 – M2-type macrophages in tumour microenvironment as prognostic markers in women with breast cancer

Autores: Luciana V. Q. Labre, Vera A. Saddi, Megmar A. S. Carneiro, Aline C. Batista, Diego A. C. Arantes, Jessica E. P. Ramos, Cesar A. S. T. Vilanova-Costa, Erika C. Aquino, Silvia H. Rabelo-Santos

A ser submetido ao periódico Histopathology (normas de publicação Anexo B)

Impact of tumour-associated macrophages (TAMs) in tumour microenvironment as prognostic markers in breast cancer

short running title: *TAMs as prognostic markers in breast cancer*

Luciana V Q Labre,¹ Vera A Saddi,^{2,3,4} Aline C Batista,⁵ Juliana F Paes,² Nathalia Amaral,² Jessica Enocência,^{2,3,4} Cesar A S T Vilanova-Costa,⁶ Erika C Aquino¹ & Silvia H Rabelo-Santos^{1,7}

¹*Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil,* ²*Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil,* ³*Laboratório de Diversidade Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil,* ⁴*Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia, Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia, GO, Brasil,* ⁵*Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil,* ⁶*Laboratório de Biologia Tumoral e Transplante de Medula Óssea, Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia, GO, Brasil,* ⁷*Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil*

Address for correspondence: Dr. Silvia H Rabelo-Santos, Faculdade de Farmácia, Rua 240, esquina com 5ª Avenida, s/n, Setor Leste Universitário, 74605-170, Goiânia, GO, Brasil.
e-mail: shrabelo@ufg.br

Conflicts of Interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Word count: 2,419.

Aims: Tumour-associated macrophages (TAMs) are major constituents of the immune infiltrate in the stroma of solid tumours, such as breast cancer, and play a fundamental role in their development. This study aimed to correlate the presence of TAMs with clinicopathologic characteristics in 82 cases of breast cancer and assess their impact on tumours as possible prognostic markers.

Methods and results: Cases selected among the records of anatomopathological examinations carried out at a reference center for cancer treatment. The inclusion criteria were: histopathological diagnosis of invasive ductal carcinoma, immunohistochemical profile, clinicopathologic data available in the records, clinical follow-up for 5 years and enough tumour tissue embedded in paraffin blocks to perform immunohistochemical analyses. For the statistical analyses, the cases were classified following a semiquantitative assessment of cell tagging as low infiltration or high infiltration and according to the mean value. High levels of TAMs (CD68+) were significantly correlated with age, distant metastases, more advanced cancer staging, estrogen or progesterone receptors-negative and triple-negative breast cancer (TNBC). The survival rate in cases of breast cancer with higher TAM infiltrate decreased, corroborating previous results. The number of CD68+ cells was a strong independent prognostic factor.

Conclusions: Macrophages are a key component of the breast cancer microenvironment and their presence is a predictor of poor prognosis. High TAM infiltrate significantly impacted relevant prognostic factors for women with breast cancer. It is important to verify whether high TAM infiltrate serves as an indicator of a worse prognosis for women with TNBC.

Keywords: breast cancer, macrophages, biomarkers, CD68

Introduction

Breast cancer is the second most common type of cancer worldwide and the most frequent in women.¹ It is heterogenous regarding clinical and morphological aspects, and tumours microscopically similar have divergent biological behaviour, justified by their complexity and accumulated molecular alterations.² Molecular profiling of breast carcinoma³ allowed the distinction of tumour subtypes and the formulation of concepts for their current molecular classification.^{4,5}

The expression of the three major biomarkers – estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) – vary broadly in different types of breast cancer and can be related to prognostic factors such as tumour size, lymph node involvement, cancer staging (TNM), histological grade, histologic type and patient age.^{5,6} Testing negative for all three receptors means the patient has triple-negative breast cancer (TNBC) and worse prognosis, presenting tumours that are little differentiated, aggressive and less prone to respond to hormone or monoclonal antibody therapies.^{3,7} Patients testing positive for one, two or three receptors (non-TNBC) may have a better prognosis and good response to conventional treatments.⁴

The careful analysis of the aforementioned prognostic factors, established and validated for breast cancer, is essential for guiding clinical decision making and reducing mortality rate.^{8,9} Considering the heterogeneity of breast cancer, factors such as the relationship of the inflammatory process in tumour microenvironment and neoplasia behaviour, tumour progression and presence of distant metastases have been studied, and the results point to their correlation with worse prognosis.¹⁰⁻¹²

In the tumour microenvironment, among the tumour-infiltrating immune cells, macrophages have been calling the attention for their complexity.¹³ They can be polarized into classically (M1) or alternatively (M2) activated macrophages.¹⁴ M1-type and M2-type macrophages respectively activate T helper cells type 1, which directly kill cells infected with pathogenic agents and are tumouricidal,^{13,15} and T helper cells type 2, involved in immunosuppression, angiogenesis and tumour progression.¹³

In neoplastic tissues, several signs, which vary between different tumours or even in different parts of the same tumour, orchestrate tumour-associated macrophage (TAM) function.¹⁵ TAMs are major constituents of the immune infiltrate in the stroma of solid tumours, such as breast cancer, and play a fundamental role in their development.¹⁶ They secrete a wide range

of pro-angiogenic mediators, partially alleviate hypoxic stress in rapidly growing tumours¹³ and produce multiple pro-inflammatory cytokines in response to microenvironmental stimuli.¹⁶ TAMs are probably associated with pro-tumoural features, since clinical evidences indicate a correlation between high TAM infiltration and a worse prognosis in patients with breast cancer.¹⁷ Although some studies indicate that the increase of TAMs in breast tumours correlates with clinicopathologic characteristics of patients and poor prognosis, they do not differentiate tumours in TNBC and non-TNBC.^{18,19} Therefore, this study aimed to correlate the presence of TAMs with clinicopathologic characteristics of patients with breast cancer and assess the impact of their presence on tumour microenvironment as a potential prognostic marker for this type of cancer.

Materials and methods

PATIENTS AND TISSUE SAMPLES

This cross-sectional retrospective study included 82 cases of breast cancer confirmed by histopathologic diagnosis between 2006 and 2007. The samples were selected in an active search from anatomopathological exams carried out in the Immunohistochemistry Laboratory, in the Anatomic Pathology Sector of the Araújo Jorge Hospital, in Goiânia, GO, Brazil.

The inclusion criteria were: histopathological diagnosis of invasive ductal carcinoma, immunohistochemical profile (ER, PR and HER2), clinicopathologic data available in the records, clinical follow-up for 5 years and enough tumour tissue embedded in paraffin blocks to perform immunohistochemical analyses. This study was approved by the Ethics Committee of the Araújo Jorge Hospital (no. 1.537.899).

The patients' follow-up started on the day of the diagnosis and finished on the day of the last appointment or death, over a period of 5 years.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Sections were cut from tissues embedded in paraffin blocks, mounted onto silanised slides, deparaffinized with xylene and rehydrated through graded concentrations of ethanol in water (100%, 80% and 50%) for immunohistochemical analyses of the expression of the macrophage CD68 marker and CD68 monoclonal antibody, a pan-macrophage marker, often

used as a universal TAM marker (human CD68 antigen KP1, DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States, 1:500), using the immunoperoxidase method associated with polymers (commercial kit Novolink Max Polymer Detection System Novocastra, Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Germany). For antigen retrieval, the slides were placed in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) under humid heat, for 7 min. To block endogenous peroxidase activity, the slides were immersed in 3% hydrogen peroxide for 10 min, washed in tap water and rinsed in phosphate buffered saline (PBS). After blocking, the slides were incubated overnight with primary antibody at 4°C in PBS plus 1% bovine serum albumin, washed in tap water and PBS and incubated for 30 min with polymer containing dextran core. After washing in tap water and PBS, the reaction was developed with 3-3'diaminobenzidine tetrahydrochlorate for 5 min, the slides were slightly stained with Harris hematoxylin, dehydrated in ethanol and xylene and mounted with Entellan Novo (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). An invasive oral squamous cell carcinoma, previously proven to be CD68+, was included as a positive control in each reaction. All the analyses were performed under the same environmental conditions.

CELL COUNT

The slides were coded and analysed in a blind fashion by two independent examiners. CD68+ macrophages were counted using a semiquantitative assessment and the following criteria: Group 1, number of cells with weak/moderate tagging < 30% of tumour surface; Group 2, number of cells with strong tagging in $\geq 30\%$ of tumour surface. Of the 82 cases of breast cancer analysed, 23 were in Group 1 and 59 in Group 2 (Figure 1). The mean number of CD68+ macrophages in the tumour surface was counted in 10 alternate high-power microscopic fields (400x). The mean number of CD68+ cells per field was 26.09. Of the 82 cases of breast cancer included in the study, 43 were classified as low infiltrate (Group 1), below the mean number, and 39 were classified as high infiltrate (Group 2), above the mean number of CD68+ cells per field. Both parameters were used in the statistical analysis.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) with a confidence level of 95% ($p < 0.05$). Bivariate and multivariate analyses were carried out. The association between CD68+ macrophage groups and clinicopathologic characteristics was established using bivariate analysis, with significance at the 5% level, and to check the strength of this correlation the Spearman correlation coefficient was employed. Only variables with $p < 0.2$ were included in the logistic regression. The Kaplan-Meier method was used for the analysis of the overall survival rate of the studied groups, whereas the log-rank test was employed for the comparison of the overall survival rate curves.

Results

The mean age of the patients was 54.84 years (31–83 years). The associations between TAMs (CD68+ Groups 1 and 2) and clinicopathologic characteristics, independent variables of this study, are shown in Table 1. The variables that had significant association with a higher number of CD68+ macrophages were age, distant metastases, more advanced cancer staging (TNM), ER-negative, PR-negative and TNBC. No significant associations were found between TAMs and tumour size, number of involved lymph nodes, HER2-negative tumours and histological grade. Patients aged 45 years or younger had a 7.38-fold higher risk ($p < 0.0011$) of having higher number of CD68+ macrophages (Group 2). This risk was 4.29-fold higher ($p < 0.0131$) for patients with distant metastases and 3.39-fold higher ($p < 0.0152$) for grade III and IV tumours. ER-negative, PR-negative patients and patients with TNBC had a 7.02-fold ($p < 0.0003$), 3.65-fold ($p < 0.0100$) and 7.38-fold higher risk ($p < 0.0011$) of being in Group 2, respectively.

In the multivariate analysis, distant metastases and more advanced cancer staging remained associated with Group 2, the former with a 3.22-fold ($p < 0.0012$) and the latter with a 5.55-fold higher risk ($p < 0.0490$) (Table 2). In the correlation test, carried out to evaluate the strength of the results found in the bivariate analysis, the independent variables, such as distant metastases, more advanced cancer staging, ER-negative, PR-negative and TNBC, remained significantly correlated to a higher number of CD68+ macrophages (Group 2) (Table 3).

The cases studied were classified as low infiltrate or high infiltrate whether they were below or above the mean number of CD68+ cells per field, which was 26.09. Patients aged 45 years or younger had a 3.04-fold higher chance ($p < 0.0260$) of having high CD68+ infiltrate than those older than 45 years (Table 4). The cases with absence of ER and PR had a 4.30-fold ($p < 0.0020$) and a 3.22-fold ($p < 0.0120$) higher chance of having high CD68+ infiltrate, respectively. Patients with higher-grade tumours showed a 3.96-fold higher chance ($p < 0.0000$) of having high CD68+ infiltrate than those with lower-grade tumours. Both mitotic index and increased cell pleomorphism had a 3.64-fold higher chance ($p < 0.0340$) of having a higher number of CD68+ cells. After the adjustment for the other variables of the model, the variables age, absence of ER and PR, mitotic index and pleomorphism maintained a statistically significant association, but the histologic grade did not.

The overall survival rate of the 82 patients with breast cancer included in the study, assessed over a 5-year follow-up period, was 73%. Assessing the survival rate of the patients over 5 years in relation to TAM expression (CD68+), those in Group 2 (with higher numbers of CD68+ cells) had a worse prognosis (log-rank test, $p = 0.03$) compared to the women in Group 1 (with lower numbers of CD68+ cells) (Figure 2). The same result was observed assessing the survival rate of the patients over 5 years in relation to the mean number of CD68+ survival rates in the group with higher TAM infiltrate (log-rank test, $p = 0.04$) (Figure 3).

Discussion

In this study, high infiltration of TAMs in tumour tissue was associated with important prognostic factors in breast cancer such as presence of distant metastases, more advanced cancer staging, absence of ER and PR and TNBC. These factors had a positive significant correlation with higher CD68+ count, indicating a worse prognosis. Another important finding of this study was a significant correlation between high numbers of TAMs (CD68+) and higher-grade tumours, distant metastases, absence of ER and PR and a worse prognosis for the cases studied.

TAMs are among the several cells infiltrated in tumour microenvironment in breast cancer and seem to play a major role in tumour progression.¹⁸ Both M1- and M2-type macrophages can infiltrate in tumour microenvironment and secrete a variety of cytokines, chemokines and important growth factors that play a vital role in tumour growth.²⁰ In a study that correlated

the presence of TAMs (CD68+) with clinical parameters in different areas of breast tissue in patients with breast cancer, a higher expression of CD68+ occurred in areas with fibrous and ductal stroma, with maximum correlation between stroma and parenchyma.^{21,22} In the present study, more advanced staging tumours were correlated with a higher number of CD68+ cells, indicating a worse prognosis for the cases analysed.

Tumour angiogenesis consists in the formation of new blood vessels from the existing vascular endothelium. TAMs also secrete soluble factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF), which induce angiogenesis in rapidly growing tumours such as breast cancer.^{13,15,23}

Distant metastases are an important prognostic factor in breast cancer. Metastatic dissemination is preceded and favoured by the formation of new blood vessels as well as by tumour cell proliferation and growth.²⁴ The present results indicate that high infiltration of TAMs is an important factor in the promotion of metastasis in breast cancer. This finding is consistent with the results obtained for other types of carcinoma such as hepatocellular²⁵ and ovarian carcinomas.²⁶ In this study, the presence of distant metastases was also correlated with a higher number of CD68+ cells. In a study carried out to assess the role of TAMs in invasion and metastasis in breast cancer, tumours with a higher number of CD68+ cells were associated with a significantly higher risk of distant metastases.²³

Another important finding was the positive correlation between absence of ER and PR and a high number of CD68+ cells. The presence of hormonal receptors in breast tumours is associated with a good prognosis and indicates a good response to hormone therapy.⁷ The opposite is true, i.e., the absence of hormonal receptors may be related to more aggressive tumours with poor response to treatments.² In a study conducted in Glasgow (Scotland), high numbers of CD68+ cells were also correlated with higher-grade, ER- and PR-negative and HER2-positive tumours.²⁷ However, in a study using co-culture approaches, high expression of CD68+ was associated with high histological grade tumours and lymph node involvement, but not with ER or HER2, different from our results.¹⁹

A significant correlation was found between the presence of high TAM infiltrate and TNBC in this study. Similar results were found in a study in Kenya comparing 68 malignant and 89 non-cancerous samples of breast tissue. TNBC cases were correlated with high TAM infiltrate, indicating a poor prognosis.²⁸ Other studies also showed that high TAM infiltrate was predictive of a poorer overall survival rate and presence of distant metastases in women with TNBC.^{19,20} A metanalysis revealed that high TAM infiltrates were significantly

associated with absence of hormonal receptors, a more aggressive TNBC phenotype and poorer overall survival rates in women with breast cancer. It also showed that the development of TAM-directed therapies may be a promising strategy to improve overall survival rates.²⁹

High infiltration of CD68+ cells was a significant risk factor for a poor overall survival rate in a group of 144 patients with breast cancer in Sweden.²² A high number of CD68+ cells was also correlated with larger tumours, more advanced staging and low overall survival rate, suggesting that this parameter is related to a poorer prognosis for patients with breast cancer.³⁰ The cases with high numbers of CD68+ cells in this study were also associated with lower overall survival rates.

The association between high TAM infiltrates and prognostic factors for breast cancer found in the present study reinforces the importance of following up the presence of these cells in breast tumours. TAMs emerge as strong prognostic factors for breast cancer. Considering the findings of this study, it is important to verify whether high TAM infiltrate serves as an indicator of a worse prognosis for women with TNBC. The behaviour of TAMs in breast cancer should also be investigated, since they infiltrate in the tumour microenvironment and may be potential cell targets in studies of women with breast cancer.

Acknowledgements

The authors thank Ricardo Henrique Silva and Ana Paula Santos for assistance, as well as the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Author contributions

LVQL, VAS, ACB and SHR-S conceived the study and participated in its design. LVQL, JFP, NA, JE and CASTV-C were involved in immunohistochemical reactions. SHR-S, LVQL, VAS, ACB and ECA participated in data analysis, manuscript preparation, results and discussion. SHR-S and JFP performed the revision, interpretation and classification of all histopathological samples and immunohistochemical reactions. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

1. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Breast cancer estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Globocan 2012. Geneve: World Health Organization, 2012. [Accessed: January 16, 2018]: Available from: <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>>
2. Lindsten T, Hedbrant A, Ramberg A *et al.* Effect of macrophages on breast cancer cell-proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int. J. Oncol.* 2017; **51**: 104–114.
3. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; **406**: 747–752.
4. Makki J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* 2015; **8**: 23–31.
5. Prat A, Pineda E, Adamo B *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast* 2015; **24**: S26–S35.
6. Song J, Chen C, Yuan JP, Sun SR. Progress in the clinical detection of heterogeneity in breast cancer. *Cancer Med.* 2016; **5**: 3475–3488.
7. Donepudi MS, Kondapalli K, Amos SJ, Venkanteshan P. Breast cancer statistics and markers. *J. Cancer Res. Ther.* 2014; **10**: 506–511.
8. Paula LM, Moraes LHF, Canto AL *et al.* Analysis of molecular markers as predictive factors of lymph node involvement in breast carcinoma. *Oncol. Lett.* 2017; **13**: 488–496.
9. Zhang H, Zhu W, Biskup E, *et al.* Incidence, risk factors and prognostic characteristics of bone metastases and skeletal-related events (SREs) in breast cancer patients: A systematic review of the real world data. *J. Bone Oncol.* 2018; **11**: 38–50.
10. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol. Histopathol.* 2018; **33**: 133–145.
11. Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stroma cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2013; **32**: 303–315.
12. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumour associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014; **5**: 75.

13. Brady NJ, Chuntova P, Schwertfeger KL. Macrophages: regulators of the inflammatory microenvironment during mammary gland development and breast cancer. *Mediators Inflamm.* 2016; **2016**: 4549676.
14. Wang N, Hongwei L, Ke Z. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Front Immunol.* 2014; **5**: 614.
15. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017; **14**: 399–416.
16. Szebeni G, Vizler C, Kitajka K, Puskas LG. Inflammation and cancer: extra and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters. *Mediators Inflamm.* 2017; **2017**: 9294018.
17. Sousa S, Brion R, Lintunen M *et al.* Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res.* 2015; **17**: 101.
18. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE *et al.* Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2013; **19**: 4196–4205.
19. Ward R, Sims AH, Lee A *et al.* Monocytes and macrophages, implications for breast cancer migration and stem cell-like activity and treatment. *Oncotarget* 2015; **6**: 14687–14699.
20. Yuan ZY, Luo RZ, Peng RJ, Wang SS, Xue C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets Ther.* 2014; **7**: 1475–1480.
21. Buldakov M, Zavyalova M, Krakhma N *et al.* CD68+, but not stabilin-1+ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer. *Immunobiology* 2015; **222**: 31–38.
22. Medrek C, Pontém F, Jiström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* **2012**; **12**: 306.
23. Yang J, Li X, Liu X, Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; **8**: 6656–6664.
24. Altman BJ, Hsieh AL, Sengupta A *et al.* MYC disrupts the circadian clock and metabolism in cancer cells. *Cell Metab.* 2012; **22**: 1009–1019.

25. Kong L, Zhu X, Xu H, Zhang J, Wang WQ. The clinical significance of the CD163+ and CD68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013; **8**: e59771.
26. Biswas S, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin. Immunopathol.* 2013; **35**: 585–600.
27. Mohammed ZM, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* 2012; **107**: 864–873.
28. Sawe RT, Kerper M, Badve S *et al.* Aggressive breast cancer in western Kenya has early onset, high proliferation, and immune cell infiltration. *BMC Cancer* 2016; **16**: 204.
29. Zhao X, Qu J, Sun Y *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget* 2017; **8**: 30576–30586.
30. Li N, Feng L, Liu H *et al.* PARP inhibition suppresses growth of EGFR-mutant cancers by targeting nuclear PKM2. *Cell Rep.* 2016; **15**: 843–856.

Tables

Table 1. Association between CD68+ expression (Group 1 x Group 2) and clinicopathologic characteristics

Clinicopathologic characteristic	No. patients	Group 1	Group 2	OR	Fisher <i>p</i>	95% CI
Age						
≤ 45	34	3	31	7.38	0.0011*	1.84–41.95
> 45	48	20	28			
Tumour size						
T3 ≥ 5 cm; T4 = chest wall	33	7	26	0.555	0.2581	0.17–1.70
T1 ≤ 2 cm; 2 cm = T2 < 5cm	49	16	33			
Distant metastases						
Yes	32	4	28	4.29	0.0131*	1.20–19.13
No	50	19	31			
Tumour grade						
III and IV	46	8	38	3.39	0.0152*	1.11–10.74
I and II	36	15	21			
Lymph node involvement						
Yes	50	11	39	0.470	0.1275	0.15–1.40
No	32	12	20			
Estrogen receptor (ER)						
Negative	44	5	39	7.02	0.0003*	2.06–27.15
Positive	38	18	20			
Progesterone receptor (PR)						
Negative	47	8	39	3.65	0.0100*	1.19–11.60
Positive	35	15	20			
Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)						
Negative	57	15	42	0.758	0.5979	0.24–2.47
Positive	25	8	17			
Histological grade						

II and III	58	10	48	0.313	0.0575	0.07–1.34
I	15	6	9			
Ni	9	7	2			
Type of breast cancer						
Triple-negative	34	3	31	7.38	0.0011*	1.84–41.95
Non-triple-negative	48	20	28			
OR: Odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval; Ni: not informed; * $p \leq 0.05$.						

Table 2. Multivariate analysis between CD68+ expression (Group 1 x Group 2) and clinicopathologic characteristics

Clinicopathologic characteristic	No. patients	Group 1	Group 2	Binomial regression	
				Adjusted OR	<i>p</i>
Distant metastases					
Yes	32	4	28	3.22	0.0012*
No	50	19	31		
Tumour grade					
III and IV	46	8	38	5.55	0.0490*
I and II	36	15	21		
Estrogen receptor (ER)					
Negative	44	5	39	4.98	0.9920
Positive	38	18	20		
Progesterone receptor (PR)					
Negative	47	8	39	1.05	0.9930
Positive	35	15	20		
Type of breast cancer					
Triple-negative	34	3	31	5.71	0.1950
Non-triple-negative	48	20	28		

OR: Odds ratio; * $p \leq 0.05$.

Table 3. Correlation between CD68+ expression (Group 1 x Group 2) and clinicopathologic characteristics

Clinicopathologic characteristic	No. patients	Group 1	Group 2	Spearman correlation test	
				Rho	<i>p</i>
Distant metastases					
Yes	32	4	28	0.2769	0.0118*
No	50	19	31		
Tumour grade					
III and IV	46	8	38	0.2682	0.0149*
I and II	36	15	21		
Estrogen receptor (ER)					
Negative	44	5	39	0.3997	0.0002*
Positive	38	18	20		
Progesterone receptor (PR)					
Negative	47	8	39	0.2845	0.0096*
Positive	35	15	20		
Type of breast cancer					
Triple-negative	34	3	31	0.3602	0.0009*
Non-triple-negative	48	20	28		

* $p \leq 0.05$.

Table 4. Univariate and multivariate analyses between the mean number of CD68+ cells (high and low infiltrate) and clinicopathologic characteristics

Clinicopathologic characteristic	No. patients	Classification according to the mean number of CD68+ cells		Univariate analysis		Multivariate analysis	
		High infiltrate	Low infiltrate	OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>
Age							
≤ 45	24	16	8	3.04	0.0260*	2.45	0.0450*
> 45	58	23	35				
Tumour size							
T3 ≥ 5 cm; T4 = chest wall	33	16	17	1.06	0.8910		
T1 ≤ 2 cm; 2 cm = T2 < 5cm	49	23	26				
Lymph node involvement							
Yes	50	25	25	1.29	0.5800		
No	32	14	18				
Distant metastases							
Yes	32	16	16	1.17	0.7230		
No	50	23	27				
Tumour grade							
III and IV	46	25	21	1.87	0.1640	1.58	0.5200
I and II	36	14	22				

Type of breast cancer							
Triple-negative	20	10	10	1.14	0.8020		
Non-triple-negative	62	29	33				
Estrogen receptor							
Positive	44	28	16	4.30	0.0020*	3.21	0.0130*
Negative	38	11	27				
Progesterone receptor							
Positive	47	28	19	3.22	0.0120*	1.41	0.0260*
Negative	35	11	24				
Human epidermal growth factor receptor 2							
Positive	58	29	29	1.40	0.4920		
Negative	24	10	14				
Histological grade							
II and III	58	33	25	3.96	0.0000*	0.976	0.9840
I	16	4	12				
Ni	8	2	6				
Mitotic index							
Moderate/high	26	15	11	3.64	0.0340*	2.28	0.0360*
Low	22	6	16				
Ni	34	18	16				

Cell pleomorphism							
Moderate/high	26	15	11	3.64	0.0340*	2.28	0.0360*
Low	22	6	16				
Ni	34	18	16				
Lymphovascular invasion							
Presence	16	9	7	1.80	0.3100		
Absence	48	20	28				
Ni	18	10	8				
5-year survival rate							
Dead	22	12	10	1.47	0.4430		
Alive	60	27	33				
OR: Odds ratio; Ni: not informed; * $p \leq 0.05$.							

Figure legends

Figure 1. Representative examples of breast cancer tumour marked with CD68+: **A.** Positive control; **B.** Group 2 (number of cells with strong tagging in $\geq 30\%$ of tumour surface); **C.** Group 1 (number of cells with strong tagging in $< 30\%$ of tumour surface).

Figure 2. Kaplan-Meier analysis of overall survival rate based on the CD68+ cells expression of patients with breast cancer (log-rank test, $p = 0.03$).

Figure 3. Kaplan-Meier analysis of overall survival rate based on the mean number of CD68+ cells of patients with breast cancer (log-rank test, $p = 0.04$).

Figures

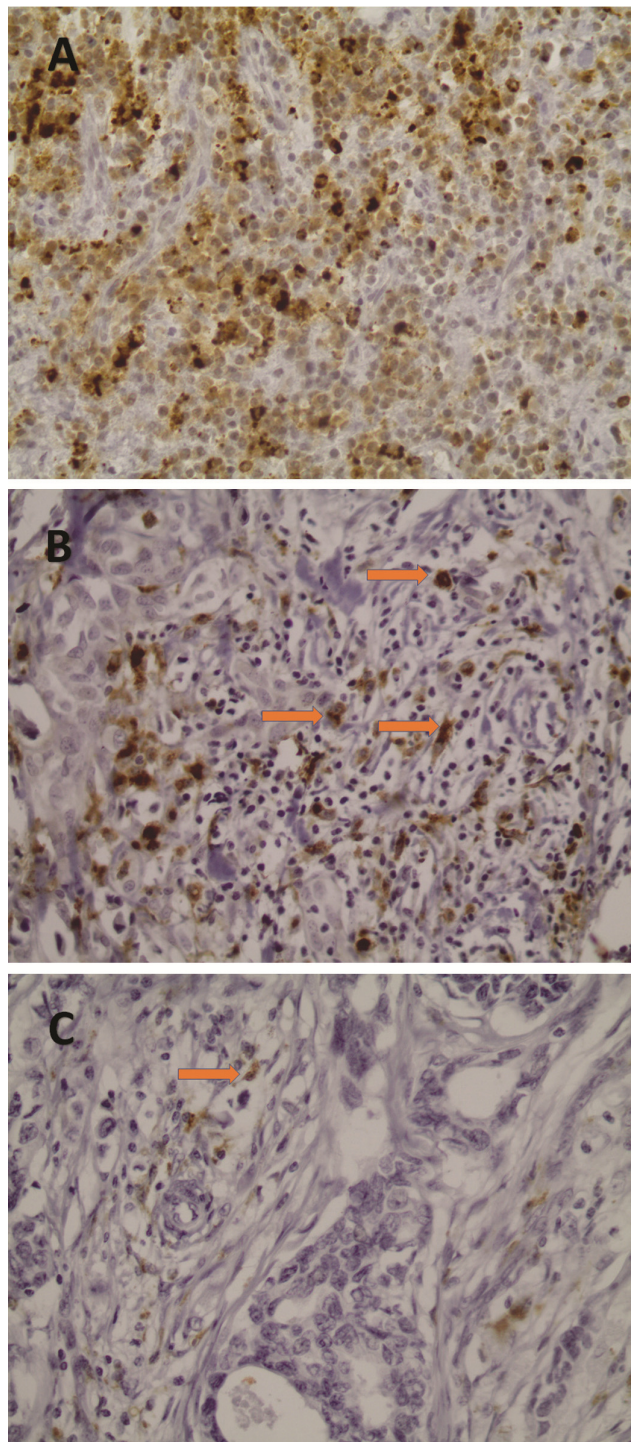


Figure 1

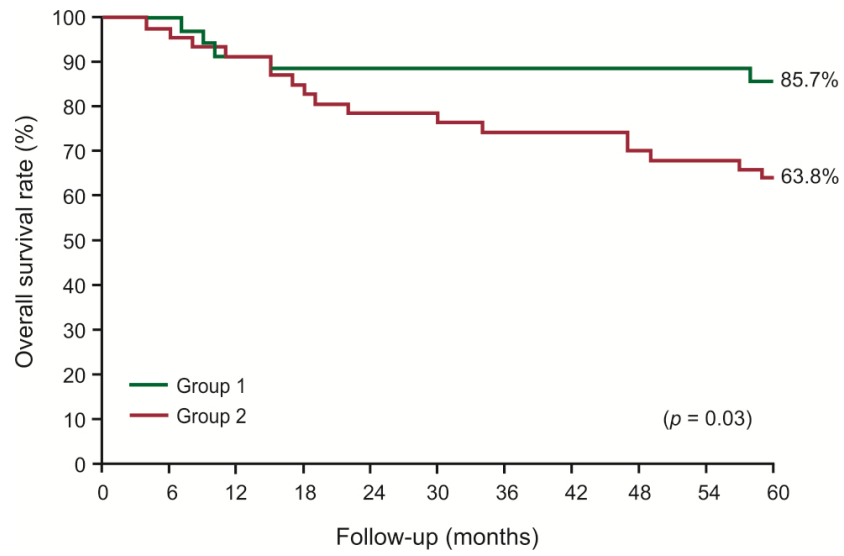


Figure 2

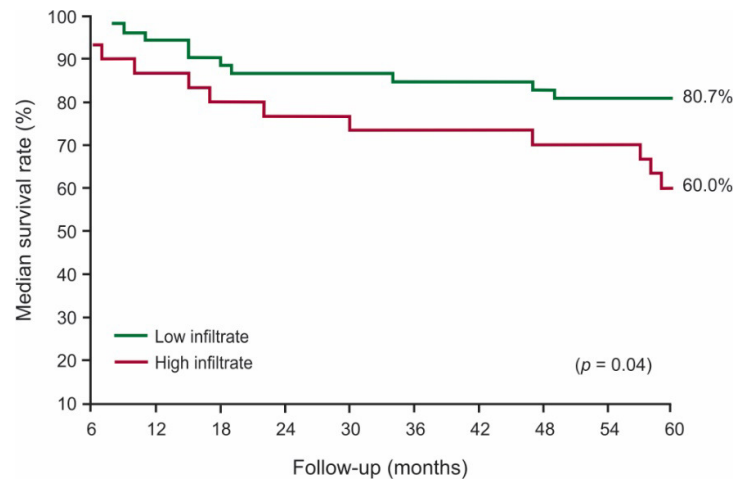


Figure 3

M2-type macrophages in tumour microenvironment as prognostic markers in women with breast cancer

short running title: M2-type macrophages: markers for breast cancer

Luciana V Q Labre¹, Vera A Saddi^{2,3,4}, Megmar A S Carneiro¹, Aline C Batista⁵, Diego A C Arantes⁵, Jessica E P Ramos^{2,3,4}, Cesar A S T Vilanova-Costa⁶, Erika C Aquino¹ & Silvia H Rabelo-Santos^{1,7}

¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil, ²Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil, ³Laboratório de Diversidade Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil, ⁴Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia, Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia, GO, Brasil, ⁵Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil, ⁶Laboratório de Biologia Tumoral e Transplante de Medula Óssea, Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Goiânia, GO, Brasil, ⁷Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

Address for correspondence: Dr. Silvia H Rabelo-Santos, Faculdade de Farmácia, Rua 240, esquina com 5ª Avenida, s/n, Setor Leste Universitário, 74605-170, Goiânia, GO, Brazil.
e-mail: shrabelo@ufg.br

Conflicts of Interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Word count: 1,825.

Aims: To assess the prognostic value of tumour-associated macrophages (TAMs) with a possible M2-type macrophage phenotype (CD163+) in women with breast cancer.

Methods and results: Cases selected among the records of anatomopathological examinations carried out at a reference center for cancer treatment. Inclusion of confirmed cases of invasive ductal carcinoma with clinical follow-up for 5 years. For the statistical analyses, the cases were classified according to the mean value of cell tagging as low infiltration or high infiltration. High levels of TAMs (CD163+) were significantly correlated with distant metastases, absence of estrogen (ER) or progesterone receptors (PR) and triple-negative breast cancer (TNBC). A high number of CD163+ cells was a strong independent prognostic factor.

Conclusions: High infiltration of CD163+ emerged as a strong independent prognostic factor. Additional markers able to identify patients with more aggressive types of breast cancer may help predict a poorer prognosis.

Keywords: breast cancer, macrophages, biomarkers, CD163

Introduction

Malignant tumours are composed of cancer cells and tumour microenvironment, which in turn consists of extracellular matrix, endothelial cells, fibroblasts and leukocytes, all of them influencing cancer cell survival and, therefore, the clinical outcome.¹ Inflammation can be considered a characteristic of cancer and may play an important role in tumour biological aspects, including initiation, promotion, angiogenesis and metastasis.²

During the development of breast cancer, tumour cells interact with the surrounding tissues in order to create a specific environment, similarly to the processes observed in inflammation, angiogenesis, wound healing and tissue repair.³ The presence of inflammatory infiltrate in breast cancer may be related to prognostic factors such as high histological grade, estrogen (ER) or progesterone receptors (PR) negativity and vascular invasion.⁴ In breast cancer, a higher infiltration of macrophages may be correlated with increased angiogenesis as well as with a poorer overall survival rate.⁵⁻⁷

Macrophages are heterogeneous cells that have different activation states, namely classically activated (M1) and alternatively activated (M2). Phenotype M2 is activated by cytokines such as IL-4, IL-13, glucocorticoids and immunoglobulin complexes that promote tumour growth and angiogenesis, repair tissues and exhibit low tumouricidal capacity.^{1,8,9} Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent promoter of monocyte recruitment in primary tumours and metastatic nest.^{2,9} However, the molecular mechanisms involved in the overall rearrangement of the transcriptional profile that takes place during macrophage alternative activation are still unknown.^{2,10}

Tumour-associated macrophages (TAMs) are major components of the leukocyte infiltrate in most tumours. After activation, these macrophages can destroy tumour cells or trigger reactions that lead to tissue damage, mainly in the vascular endothelium.² Studies indicate that TAMs can play several roles at different steps of tumour progression such as in angiogenesis, proliferation, suppression of antitumour immunity, metastasis and resistance to treatments.^{11,12} TAMs are known for changing their phenotype according to the signals expressed in the tumour microenvironment, directing recruitment, maturation and differentiation of macrophage infiltrate and playing a central role in the activation of specific transcriptional signals, mediating pro-tumour or antitumour functions.^{3,7}

Clinical studies indicate that CD163 is a monocyte/macrophage marker highly specific for M2-type macrophages.^{1,2} CD163+ macrophage infiltration in the stromal region of breast

tumours has been significantly correlated with important clinicopathologic characteristics, indicating poor overall survival.^{1,7,13,14} Therefore, this study aimed to assess the prognostic value of TAMs with a possible M2-type macrophage phenotype (CD163+) in women with breast cancer.

Materials and methods

PATIENTS AND TISSUE SAMPLES

This cross-sectional retrospective study included 85 cases of breast cancer confirmed by histopathologic diagnosis from January 2006 to December 2007. The samples were selected in an active search from anatomopathological exams carried out in the Immunohistochemistry Laboratory, in the Anatomic Pathology Sector of the Araújo Jorge Hospital, in Goiânia, GO, Brazil. This study was approved by the Ethics Committee of the Araújo Jorge Hospital (no. 1.537.899).

The inclusion criteria were: histopathological diagnosis of invasive ductal carcinoma, immunohistochemical profile (ER, PR and human epidermal growth factor receptor 2 – HER2), clinicopathologic data available in the records, clinical follow-up for 5 years and enough tumour tissue embedded in paraffin blocks to perform immunohistochemical analyses.

The patients' follow-up started on the day of the diagnosis and finished on the day of the last appointment or death, over a period of 5 years.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Sections were cut from tissues embedded in paraffin blocks, mounted onto silanised slides, deparaffinized with xylene and rehydrated through graded concentrations of ethanol in water (100%, 80% and 50%) for immunohistochemical analyses using the immunoperoxidase method associated with polymers (EnVision FLEX Mini Kit, Dako, Glostrup, Denmark) and CD163 monoclonal antibody (human anti-CD163 IGG1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, United States, 1:100), an M2-type macrophage marker. The slides underwent endogenous peroxidase block using the same Mini Kit. For antigen retrieval, the slides were placed in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) under humid heat, for 7 min, kept at room

temperature for cooling and incubated overnight at 4°C in a solution containing antibody diluted in 1% bovine serum albumin. After incubation, the slides were washed in tap water and phosphate buffered saline (PBS) and incubated for 30 min with polymer containing dextran core. After washing in tap water and PBS once more, the reaction was developed with 3-3'diaminobenzidine tetrahydrochlorate for 5 min, the slides were slightly stained with Harris hematoxylin, dehydrated in ethanol and xylene and mounted with Entellan Novo (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). A xanthogranuloma, previously proven to be CD163+, was included as a positive control in each reaction. All the analyses were performed under the same environmental conditions.

CELL COUNT

CD163+ macrophages were counted considering the mean number of those stained by the marker in the peritumoural region, in five hot-spot microscopic fields (400x), using a semiquantitative evaluation.⁷ The following criteria were employed: Group 1, cases with low CD163+ cell infiltration; Group 2, cases with high CD163+ cell infiltration.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were performed using the software Stata 13.0 (Stata Corp., College Station, TX, USA) with a confidence level of 95% ($p < 0.05$). Data were grouped as dichotomous variables. Only variables with $p < 0.2$ were included in the logistic regression. Bivariate and multivariate analyses were carried out to verify the association between clinicopathologic characteristics and CD163+ macrophage groups classified as low infiltrate (Group 1) or high infiltrate (Group 2). The mean number of CD163+ cells per slide was 6.45, with a standard deviation of 10.09. Of the 85 cases of breast cancer included in the study, 65 (76.47%) were classified as low infiltrate (Group 1), below the mean number, and 20 (23.52%) were classified as high infiltrate (Group 2), above the mean number of CD163+ cells per slide. Both parameters were used in the statistical analysis.

Results

In this study, 85 cases of women diagnosed with breast cancer from January 2006 to December 2007 were investigated. The mean age at diagnosis was 54.15 years (26–83 years), with 23 (25.84%) aged 45 years or younger and 62 (69.66%) older than 45 years. Of the 85 cases, 61.80% did not have distant metastases, 58.43% had tumours less than 5 cm in diameter, 42.70% did not have lymph node involvement and 49.44% had more advanced tumour grades. Over 48% of the cases showed absence of ER, PR and HER2, 34 (38.20%) had triple-negative breast cancer (TNBC) and 51 (57.30%) had non-TNBC (Table 1).

The associations between TAMs (CD163+) (high infiltration and low infiltration) and clinicopathologic characteristics are presented in Table 2. In the bivariate analysis the variables that had significant association with a higher number of CD163+ cells were distant metastases (Odds Ratio, OR = 0.18; $p < 0.030$), ER-negative (OR = 2.90; $p < 0.047$) and TNBC (OR = 2.93; $p < 0.037$). No significant associations were found between TAMs (CD163+) and age, tumour size, number of involved lymph nodes, tumour grade, PR-negative tumours or HER2-negative tumours. In the logistic regression, distant metastases, absence of ER and TNBC continued associated with a higher number of CD163+ cells, even after adjustments for the remaining variables.

The follow-up period of the women included in this study was 5 years. The 5-year survival rate of the group with high infiltration of CD163+ cells was 73.17%, whereas in the group with low infiltration it was 75.00%, showing absence of association of these factors ($p = 0.8227$) (Figure 2).

Discussion

In this study, a strong association was found between high CD163+ infiltration and distant metastases, absence of both ER and PR and TNBC. These findings can indicate that TAMs phenotype M2 mediate pro-tumour functions such as angiogenesis promotion and secretion of cytokines that reduce tumouricidal activity, and contribute to immunosuppression of tumour microenvironment, characterizing a worse prognosis.

Breast tumour microenvironment is rich in inflammatory infiltrate, and TAMs constitute a great part of this infiltrate.¹⁵ Breast tumour aggressiveness might be associated with accumulated TAMs in hypoxic areas (low production of reactive oxygen and nitrogen

species) and VEGF production.^{16,17} The presence of distant metastases is favoured by the formation of new vessels and the growth of tumour cells.² In a study of M2-type macrophage expression in breast tumour microenvironment, a higher number of CD163+ cells was correlated to lymph node involvement, more advanced tumour and histological grades.⁹ Some studies showed that factors derived from M2-type macrophages, such as VEGF, can enhance the invasion of breast cancer cells due to increased angiogenesis, leading to distant metastases.^{2,18} In fact, high infiltration of M2-type macrophage phenotype was an important factor in promoting distant metastases in patients with breast cancer in this study.

Identifying whether hormonal receptors are present in breast tumours is a routine tool in their categorization.⁵ The presence of hormonal receptors in breast tumours is associated with a good prognosis and indicates a good response to hormone therapy.¹⁹ In studies carried out to assess the relationship between TAMs and breast cancer, high infiltration of M2-type macrophages in breast tumour microenvironment was correlated to absence of ER and PR.^{1,13} In this study, the association between high CD163+ cell infiltrate and the group of ER-negative cases is in line with the aforementioned results, demonstrating that phenotype M2 can emerge as an important factor in the prognosis of patients who have tumours with absence of hormone receptors.

In the present study, high M2-type macrophage infiltrate was associated with TNBC. Similar results were reported in a study conducted in Kenya, comparing patients with and without breast cancer. TNBC was correlated to high phenotype M2 TAM infiltrate and a poorer prognosis.²⁰ In a study carried out in Norway to assess the presence of M2-type macrophages in breast cancer subtypes, strong association was found between TNBC and high expression of CD163+ cells.²¹ Some evidence indicates that neoplastic cells displaying TNBC characteristics promote the differentiation of monocytes into M2-type macrophages by enhancing the secretion of a chemokine with pro-tumour properties.²²

In a Brazilian population-based study to evaluate prognostic factors of women with breast cancer, overall survival rate was 72.1%.²³ Similarly, the overall survival rate in the present study was 74.1%. Nevertheless, analyzing the survival rate in relation to the presence of phenotype M2 TAM, no significant association was found between the breast cancer cases herein studied and macrophage infiltrate.

In a meta-analysis including studies that related breast cancer with the presence of TAMs, high density of TAMs was related to poor prognosis and subgroup analysis showed that CD68 was better than M2 specific marker CD163 alone in predicting overall survival. The results

revealed that high TAM infiltrates were significantly associated with absence of hormonal receptors, a more aggressive TNBC phenotype and poorer overall survival rates in women with breast cancer.²⁴

In fact, a study developed parallel to this one showed that a high CD68 + cell infiltrate was associated with worse survival (data not published).

In summary, high infiltration of macrophages CD163+ was correlated to worse prognostic factors such as distant metastases, absence of ER and TNBC. High infiltration of CD163+ emerged as a strong independent prognostic factor. Additional markers able to identify patients with more aggressive types of breast cancer may help predict a poorer prognosis.

References

1. Medrek C, Pontém F, Jiström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* **2012**; 12: 306.
2. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017; **14**: 399–416.
3. Tariq M, Zhang J, Liang G *et al.* Macrophage polarization: anti-cancer strategies to target tumor-associated macrophage in breast cancer. *J. Cell Biochem.* 2017; **118**: 2484–2501.
4. Mohammed ZM, Going JJ, Edwards J, Elsberger B, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* 2012; **107**: 864–873.
5. Baumgarten SC, Frasor J. Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Mol. Endocrinol.* 2012; **26**: 360–371.
6. Obeid E, Nanda R, Fu YX, Olopade OI. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int. J. Oncol.* 2013; **43**: 5–12.
7. Tiainen S, Tumelius R, Rilla K *et al.* High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology* **66**: 873–883, 2015.
8. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* 2014; **6**: 1670–1690.

9. Mou W, Xu Y, Ye Y *et al.* Expression of Sox2 in breast cancer cells promotes the recruitment of M2 macrophages to tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 2015; **358**: 115–123.
10. Pello OM, De Pizzol M, Mirolo M *et al.* Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood* 2012; **119**: 411–421.
11. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013; **13**: 595–601.
12. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* 2013; **23**: 277–286.
13. Lindsten T, Hedbrant A, Ramberg A *et al.* Effect of macrophages on breast cancer cell-proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int. J. Oncol.* 2017; **51**: 104–114.
14. Kaewkangsan V, Verma C, Eremin JM *et al.* The differential contribution of the innate immune system to a good pathological response in the breast and axillary lymph nodes induced by neoadjuvant chemotherapy in women with large and locally advanced breast cancers. *J. Immunol. Res.* 2017; **2017**: 1049023.
15. Zhang Y, Schnabel CA, Schroeder BE *et al.* Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2013; **19**: 4196–4205.
16. Lin L, Chen YS, Yao YD *et al.* CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget* 2015; **6**: 34758–34773.
17. Mohamed MM, El-Ghonaimy EA, Nouh MA, Schneider RJ, Sloane BF, El-Shinawi M. Cytokines secreted by macrophages isolated from tumor microenvironment of inflammatory breast cancer patients possess chemotactic properties. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014; **46**: 138–147.
18. Ward R, Sims AH, Lee A *et al.* Monocytes and macrophages, implications for breast cancer migration and stem cell-like activity and treatment. *Oncotarget* 2015; **6**: 14687–14699.
19. Donepudi MS, Kondapalli K, Amos SJ, Venkanteshan P. Breast cancer statistics and markers. *J. Cancer Res. Ther.* 2014; **10**: 506–511.

20. Sawe RT, Kerper M, Badve S *et al.* Aggressive breast cancer in western Kenya has early onset, high proliferation, and immune cell infiltration. *BMC Cancer* 2016; **16**: 204.
21. Klingen TA, Chen Y, Aas H, Wik E, Akslen LA. Tumor-associated macrophages are strongly related to vascular invasion, non-luminal subtypes, and interval breast cancer. *Hum. Pathol.* 2017; **69**: 72–80.
22. Hollmén M, Roudnicky F, Karaman S, Detmar M. Characterization of macrophage-cancer cell crosstalk in estrogen receptor positive and triple-negative breast cancer. *Sci. Rep.* 2015; **5**: 9188.
23. Freitas Jr. R, Nunes RD, Martins E *et al.* Prognostic factors and overall survival of breast cancer in the city of Goiania, Brazil: a population-based study. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2017; **44**: 435–443.
24. Zhao X, Qu J, Sun Y *et al.* Prognostic significance of tumour-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget* 2017; **8**: 30576–30586.

Tables

Table 1. Clinicopathologic characteristics of breast cancer cases included in this study

Clinicopathologic characteristic	Breast cancer cases	
	n	%
Total	85	100
Age		
≤ 45	23	25.84
> 45	62	69.66
Tumour size		
T3 ≥ 5 cm; T4 = chest wall	33	37.08
T1 ≤ 2 cm; 2 cm = T2 < 5cm	52	58.43
Lymph node involvement		
Yes	47	52.81
No	38	42.70
Distant metastases		
Yes	30	33.71
No	55	61.80
Tumour grade		
III and IV	44	49.44
I and II	41	46.07
Type of tumour		
Triple-negative breast cancer	34	38.20
Non-triple-negative breast cancer	51	57.30
Estrogen receptor		
Negative	43	48.31
Positive	42	47.19
Progesterone receptor		
Negative	46	51.69
Positive	39	43.82
Human epidermal growth factor receptor 2		
Negative	60	67.42
Positive	25	28.09

5-year survival rate		
Dead	21	23.60
Alive	64	71.91
Ni: not informed.		

Table 2. Bivariate and multivariate analyses between CD163+ cell infiltration (high infiltration x low infiltration) e clinicopathologic characteristics

Clinicopathologic characteristic	No. patients	Classification according to the mean number of CD163+ cells		Bivariate analysis		Multivariate analysis	
		High infiltrate	Low infiltrate	OR	<i>p</i>	OR	<i>p</i>
Age							
≤ 45	25	8	17	1.88	0.235		
> 45	60	12	48				
Tumour size							
T3 ≥ 5 cm; T4 = chest wall	33	6	27	0.60	0.354		
T1 ≤ 2 cm; 2 cm = T2 < 5cm	52	14	38				
Lymph node involvement							
Yes	47	12	35	1.29	0.628		
No	38	8	30				
Distant metastases							
Yes	40	3	37	0.18	0.030*	1.22	0.030*
No	55	17	38				
Tumour grade							
III and IV	44	8	36	0.54	0.229		
I and II	41	12	29				

Estrogen receptor							
Positive	43	14	29	2.90	0.047*	1.45	0.028*
Negative	42	6	36				
Progesterone receptor							
Positive	46	14	32	2.41	0.103	1.82	0.016*
Negative	39	6	33				
Human epidermal growth factor receptor 2							
Positive	60	14	46	0.96	0.947		
Negative	25	6	19				
Type of tumour							
Triple-negative breast cancer	34	12	22	2.93	0.037*	2.35	0.034*
Non-triple-negative breast	51	8	43				
5-year survival rate							
Dead	21	3	18	0.46	0.250		
Alive	64	17	47				

OR: Odds ratio; Ni: not informed; * $p \leq 0.05$.

Figure legends

Figure 1. A. Positive control, xanthogranuloma. Slides showing breast cancer tumour marked with CD163+: **B.** Low infiltration. **C.** High infiltration.

Figure 2. Kaplan-Meier analysis of overall survival rate based on the mean number of CD163+ cells of patients with breast cancer (log-rank test, $p = 0.8227$).

Figures

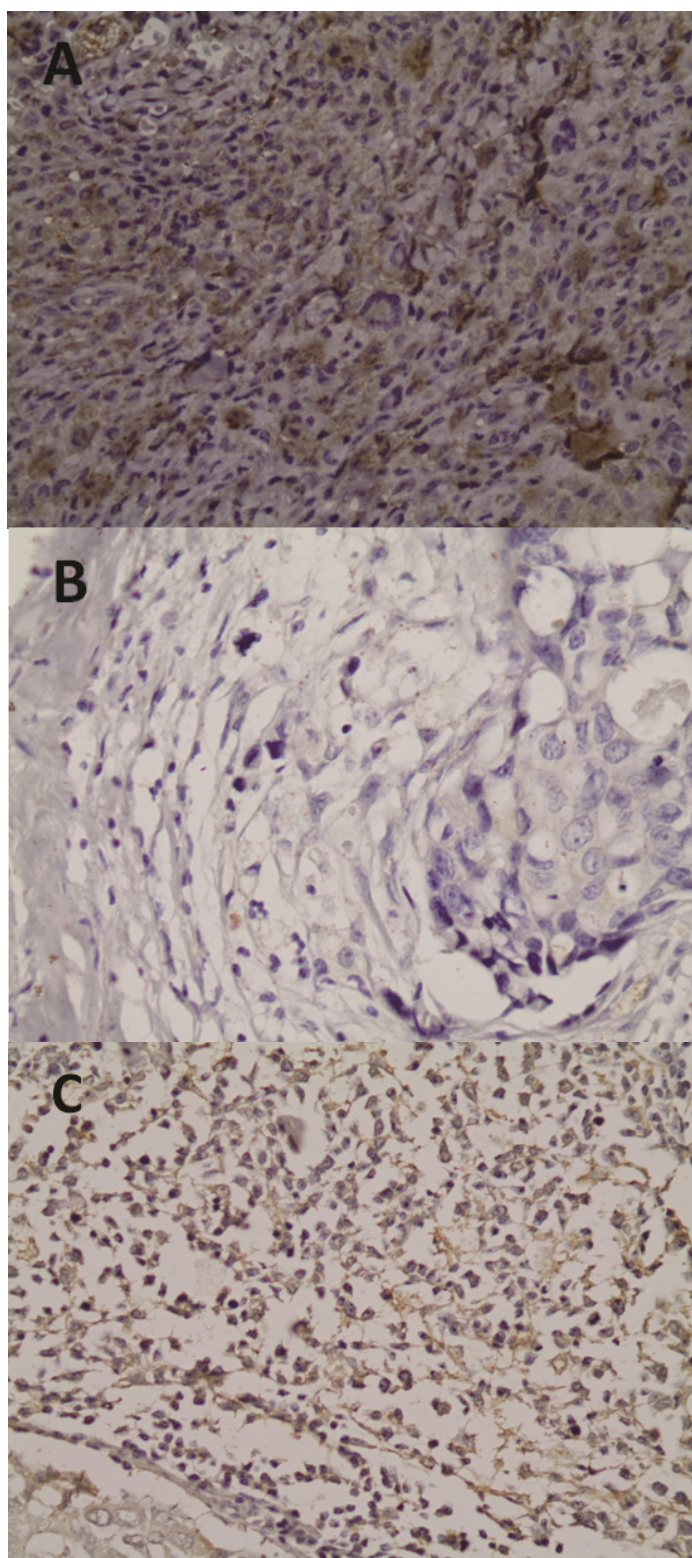


Figure 1

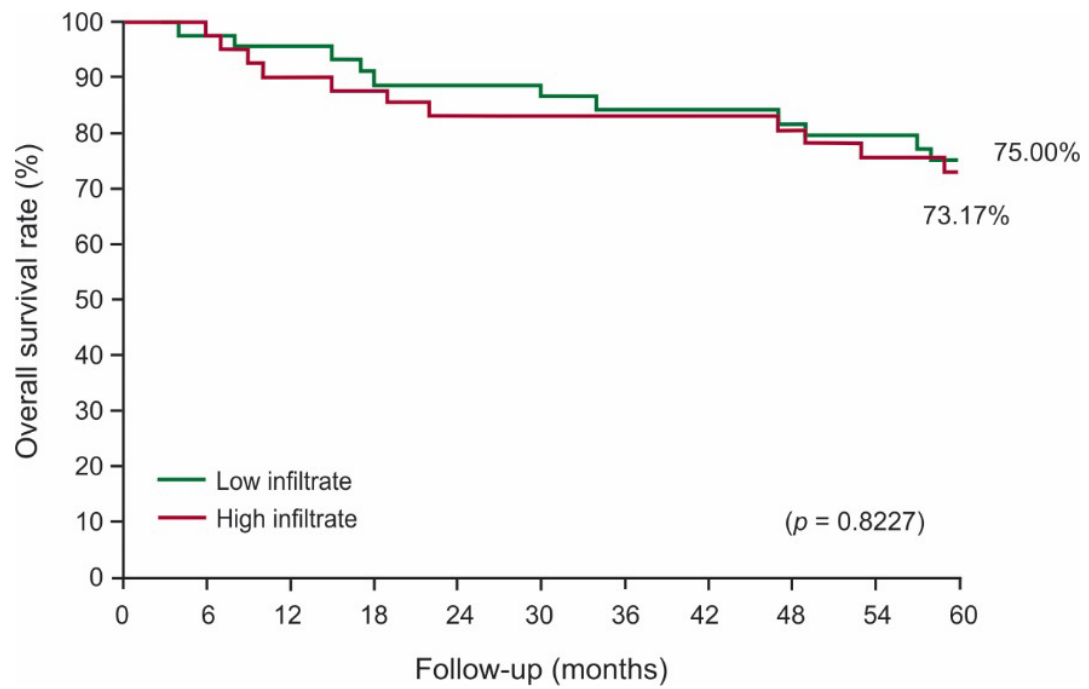


Figure 2

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea, que embora apresente características de desenvolvimento semelhantes, pode ter desfechos diferentes no que concerne à sua evolução e ao seu comportamento. Progressos consideráveis têm sido obtidos em relação ao conhecimento e ao acompanhamento do câncer de mama. Entretanto, sua heterogeneidade continua representando desafio tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico da doença. O conhecimento acerca de características clínicas das pacientes, critérios anatomopatológicos dos tumores, marcadores imuno-histoquímicos e critérios de imagem permite melhor caracterização da heterogeneidade do câncer de mama, propiciando o estabelecimento de um plano de acompanhamento e evolução individualizado. O entendimento do microambiente tumoral da neoplasia mamária e das células ali presentes traz informações relevantes quanto ao comportamento e ao desenvolvimento desta patologia. E os TAMs representam o principal componente do infiltrado imunológico do estroma de tumores sólidos, como o câncer de mama.

Neste estudo, a associação entre a análise de biomarcadores TAMs e a obtenção de informações clínicas e de prognóstico mostrou que a presença destes biomarcadores tem valor prognóstico significativo. Os resultados do presente estudo agregaram informações sobre a relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral de casos de mulheres com carcinoma de mama e as características clínico-patológicas do tumor, assim como de sua importância para o prognóstico das neoplasias de mama.

A alta infiltração de TAMs serviu como indicador de um pior prognóstico, uma vez que se correlacionou com a presença de metástases à distância, estadiamento tumoral avançado e ausência de receptores hormonais. A disseminação metastática é precedida e favorecida pela angiogênese tumoral, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir do endotélio vascular já existente. E os TAMs secretam fatores solúveis, como VEGF, que induzem a angiogênese em tumores de crescimento rápido, como o câncer de mama.

Ao se observar a correlação entre os TAMs e os receptores hormonais, verificou-se que a ausência destes estava associada a um maior infiltrado, o que sinalizou um

possível prognóstico ruim para estes casos. A presença de RE e RP em tumores de mama está associada a um bom prognóstico e a uma boa resposta à terapia endócrina, ao passo que a sua ausência pode estar associada a tumores com características mais agressivas e de difícil resposta aos possíveis tratamentos, como a hormonioterapia.

Outro achado relevante foi a associação significativa entre a alta infiltração de TAMs e os casos de câncer de mama TN, reconhecidamente de maior agressividade e com ausência de receptores hormonais. Um maior infiltrado de TAMs também foi associado com uma pior sobrevida. Considerando os achados deste estudo, a alta infiltração de TAMs serviu como indicador de pior prognóstico entre mulheres com fenótipo TN.

Entre os marcadores macrofágicos utilizados neste estudo, os achados apontaram que o biomarcador CD68, que é um pan-macrófago (M1/M2), pode ser um fator prognóstico relevante no acompanhamento de casos de câncer de mama. Os TAMs emergem como fatores prognósticos relevantes para o câncer de mama.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, a associação da análise de biomarcadores TAMs com a obtenção de informações clínicas e de prognóstico mostrou que a presença destes biomarcadores tem valor prognóstico significativo. Os resultados do presente estudo agregaram informações sobre a relação entre a presença de macrófagos no microambiente tumoral de casos de mulheres com carcinoma de mama e as características clínico-patológicas do tumor, assim como de sua importância para o prognóstico das neoplasias de mama.

O infiltrado de TAMs presente nos casos analisados neste estudo associou-se significativamente com fatores clínico-patológicos como idade inferior a 45 anos, presença de metástase à distância, estadiamento tumoral avançado, ausência de receptores hormonais, pleomorfismo celular, índice mitótico acentuado e redução na sobrevida global, e estiveram associados ao fenótipo TN, de pior prognóstico.

A compreensão acerca da presença de TAMs no microambiente tumoral contribuiu para o melhor entendimento do comportamento biológico da neoplasia mamária. Em adição a isso, os TAMs despontam como possíveis marcadores prognósticos para o câncer de mama.

REFERÊNCIAS

AJCC. American Joint Committee on Cancer. *Cancer staging system*. Chicago: AJCC, 2018. Disponível em: <<https://cancerstaging.org/references-tools/Pages/What-is-Cancer-Staging.aspx>>. Acesso em: 5 jun 2018.

BARROS, A. C. S. D.; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. *Revista Brasileira de Mastologia*, v. 25, n. 4, p. 146–155, 2015. doi: 10.5327/Z201500040006RBM

BAUMGARTEN, S. C.; FRASOR, J. Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Molecular Endocrinology*, Chevy Chase, v. 26, no. 3, p. 360–371, 2012. doi: 10.1210/me.2011-1302.

BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in Immunopathology*, Berlin, v. 35, no. 5, p. 585–600, 2013. doi: 10.1007/s00281-013-0367-7

BRADY, N. J.; CHUNTOVA, P.; SCHWERTFEGGER, K. L. Macrophages: regulators of the inflammatory microenvironment during mammary gland development and breast cancer. *Mediators of Inflammation*, Sylvania, v. 2016, Article ID 4549676, 2016. doi: 10.1155/2016/4549676.

BRENNER, D. R.; BROCKTON, N. T.; KOTSPOULOS, J.; COTTERCHIO, M.; BOUCHER, B. A.; COURNEYA, K. S.; KNIGHT, J. A.; OLIVOTTO, I. A.; QUAN, M. L.; FRIEDENREICH, C. M. Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors. *Cancer Causes and Control*, Dordrecht, v. 27, no. 4, p. 459–472, 2016. doi: 10.1007/s10552-016-0726-5

BULDAKOV, M.; ZAVYALOVA, M.; KRAKHMA, N.; KRAKHMAL, N.; TELEGINA, N.; VTORUSHIN, S.; MITROFANOVA, I.; RIABOV, V.; YIN, S.; SONG, B.; CHERDYNTSEVA, N.; KZHYSHKOWSKA, J. CD68+, but not stabilin-1+ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate

with the lymphatic metastasis in human breast cancer. *Immunobiology*, Amsterdam, v. 222, no. 1, p. 31–38, 2015. doi: 10.1016/j.imbio.2015.09.011

CHOI, J.; GYAMFI, J.; JANG, H.; KOO, J. S. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histology and Histopathology*, Murcia, v. 33, no. 2, p. 133–145, 2018. doi: 10.14670/HH-11-916

DAI, X.; XIANG, L.; LI, T.; BAI, Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of Cancer*, Sydney, v. 7, no. 10, p. 1281–1294, 2016. doi: 10.7150/jca.13141

DEHNE, N.; MORA, J.; NAMGALADZE, D.; WEIGERT, A.; BRÜNE, B. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Pharmacology*, Oxford, v. 35, p. 12–19, 2017. doi: 10.1016/j.coph.2017.04.007

DONEPUDI, M. S.; KONDAPALLI, K.; AMOS, S. J.; VENKANTESHAN, P. Breast cancer statistics and markers. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, Mumbai, v. 10, no. 3, 506–511, 2014. doi: 10.4103/0973-1482.137927

FERIOTTI, C.; LOURES, F. V.; ARAÚJO, E. F.; COSTA, T. A.; CALICH, V. L. G. Mannosyl-recognizing receptors induce an M1-like phenotype in macrophages of susceptible mice but an M2-like phenotype in mice resistant to a fungal infection. *PLoS One*, San Francisco, v. 8, no. 1, e54845, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0054845

GROSS, E.; van TINTEREN, H.; LI, Z.; RAAB, S.; MEUL, C.; AVRIL, S.; LADDACH, N.; AUBELE, M.; PROPPING, C.; GKAZEPIS, A.; SCHMITT, M.; MEINDL, A.; NEDERLOF, P. M.; KIECHLE, M.; LIPS, E. H. Identification of BRCA1-like triple-negative breast cancers by quantitative multiplex-ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis of BRCA1-associated chromosomal regions: a validation study. *BioMed Central Cancer*, London, v. 16, no. 1, p. 811, 2016. doi: 10.1186/s12885-016-2848-2

HOLLMÉN, M.; KARAMAN, S.; SCHWAGER, S.; LISIBACH, A.; CHRISTIANSEN, A. J.; MAKSIMOW, M.; VARGA, Z.; JALKANEN, S.; DETMAR, M. G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in

human triple-negative breast cancer. *Oncoimmunology*, Philadelphia, v. 5, no. 3, e1115177, 2015. doi: 10.1080/2162402X.2015.1115177

HORTELANO, S. Inflamación y macrófagos: amigos o enemigos. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Divulgación Acércate a Nuestros Científicos*, Madrid, enero, 2014. doi: 10.18567/sebbmdiv_ANC.2014.01.1. Disponível em: <http://www.sebbm.es/web/images/archivos/archivos_tinymce/sonsoleshortelano_enero2014.pdf>. Acesso em: 26 jan 2018.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. INCA: Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 5 fev 2018.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Mama: sintomas*. INCA: Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/sintomas>>. Acesso em: 16 jan 2018.

JOYCE, D. P.; KERIN, M. J.; DWYER, R. M. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer. *International Journal of Cancer*, New York, v. 139, no. 7, p. 1443–1448, 2016. doi: 10.1002/ijc.30179

LAKHANI, S. R.; ELLIS, I. O.; SCHNITT, S. J.; TAN, P. H.; van de VIJVER, M. J. *WHO classification of tumours of the breast*. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012. v. 4.

LEHMANN, B. D.; PIETENPOL, J. A. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *Journal of Pathology*, Chichester, v. 232, no. 2, p. 142–150, 2014. doi: 10.1002/path.4280

LI, N.; FENG, L.; LIU, H.; WANG, J.; KASEMBELI, M.; TRAN, M. K.; TWEARDY, D. J.; LIN, S. H.; CHEN, J. PARP inhibition suppresses growth of EGFR-mutant cancers by targeting nuclear PKM2. *Cell Reports*, Cambridge, v. 15, no. 4, p. 843–856, 2016. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.070

LINDSTEN, T.; HEDBRANT, A.; RAMBERG, A.; WIJKANDER, J.; SOLTERBECK, A.; ERIKSSON, M.; DELBRO, D.; ERLANDSSON, A. Effect of macrophages on

breast cancer cell-proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *International Journal of Oncology*, Athens, v. 51, no. 1, p. 104–114, 2017. doi: 10.3892/ijo.2017.3996

LOPES, C. M.; MONTEMOR NETTO, M. R.; MANSANI, F. P.; STIVAL, R. S. M.; CASSAPULA, M. R.; OLIVEIRA, T. F. B. Clinical, histomorphological, and therapeutic prognostic factors in patients with triple-negative invasive breast cancer. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 51, n. 6, p. 397–406, 2015. doi: 10.5935/1676-2444.20150062

LUO, Y.; ZHOU, H.; KRUEGER, J.; KAPLAN, C.; LEE, S. H.; DOLMAN, C.; MARKOWITZ, D.; WU, W.; LIU, C.; REISFELD, R. A.; XIANG, R. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, Ann Arbor, v. 116, no. 8, p. 2132–2141, 2016. doi: 10.1172/JCI27648

MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology*, Thousand Oaks, v. 8, p. 23–31, 2015. doi: 10.4137/CPath.S31563

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *Journal of Pathology*, Chichester, v. 229, no. 2, p. 176–185, 2013. doi: 10.1002/path.4133

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; MALESCI, A.; LAGHI, L.; ALLAVENA, P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nature Reviews: Clinical Oncology*, London, v. 14, no. 7, p. 399–416, 2017. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217

MATSUDA, N.; LIM, B.; WANG, X.; UENO, N. T. Early clinical development of epidermal growth factor receptor targeted therapy in breast cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Abingdon, v. 26, no. 4, p. 463–479, 2017. doi: 10.1080/13543784.2017.1299707

MEDREK, C.; PONTÉN, F.; JIRSTRÖM, K.; LEANDERSSON, K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer

patients. *BioMed Central Cancer*, London, v. 12, p. 306, 2012. doi: 10.1186/1471-2407-12-306

MOHAMMED, Z. M.; GOING, J. J.; EDWARDS, J.; ELSBERGER, B.; DOUGHTY, J. C.; McMILLAN, D. C. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer. *British Journal of Cancer*, London, v. 107, no. 5, p. 864–873, 2012a. doi: 10.1038/bjc.2012.347

MOHAMMED, Z. M.; McMILLAN, D. C.; ELSBERGER, B.; GOING, J. J.; ORANGE, C.; MALLON, E.; DOUGHTY, J. C.; EDWARDS, J. Comparison of visual and automated assessment of Ki-67 proliferative activity and their impact on outcome in primary operable invasive ductal breast cancer. *British Journal of Cancer*, London, v. 106, no. 2, p. 383–388, 2012b. doi: 10.1038/bjc.2011.569

MOUH, F. Z.; MZIBRI, M. E.; SLAOUI, M.; AMRANI, M. Recent progress in triple-negative breast cancer research. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Bangkok, v. 17, no. 4, p. 1595–1608, 2016. doi : 10.7314/APJCP.2016.17.4.1595

NIU, A. Q.; XIE, L. J.; WANG, H.; ZHU, B.; WANG, S. Q. Prediction of selective estrogen receptor beta agonist using open data and machine learning approach. *Drug Design, Development and Therapy*, Auckland, v. 10, p. 2323–2331, 2016. doi: 10.2147/DDDT.S110603

PATANI, N.; MARTIN, L. A.; DOWSETT, M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: international perspective. *International Journal of Cancer*, New York, v. 133, no. 1, p. 1–13, 2013. doi: 10.1002/ijc.27997

PELLO, O. M.; DE PIZZOL, M.; MIROLO, M.; SOUCEK, L.; ZAMMATARO, L.; AMABILE, A.; DONI, A.; NEBULONI, M.; SWIGART, L. B.; EVAN, G. I.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. *Blood*, New York, v. 119, no. 2, p. 411–421, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-02-339911

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; van de RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.;

PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, London, v. 406, no. 6797, p. 747–752, 2000.

POURTEIMOOR, V.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; PARYAN, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect: the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour Biology*, Tokyo, v. 37, no. 11, p. 14479–14499, 2016. doi: 10.1007/s13277-016-5349-7

PRAT, A.; PINEDA, E.; ADAMO, B.; GALVÁN, P.; FERNÁNDEZ, A.; GABA, L.; DÍEZ, M.; VILADOT, M.; ARANCE, A.; MUÑOZ, M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, Amsterdam, v. 24, suppl. 2, p. S26–S35, 2015. doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, New York, v. 19, no. 11, p. 1423–1437, 2013. doi: 10.1038/nm.3394

ROCK, C. L.; FLATT, S. W.; BYERS, T. E.; COLDITZ, G. A.; DEMARK-WAHNEFRIED, W.; GANZ, P. A.; WOLIN, K. Y.; ELIAS, A.; Krontiras, H.; LIU, J.; NAUGHTON, M.; PAKIZ, B.; PARKER, B. A.; SEDJO, R. L.; WYATT, H. Results of the Exercise and Nutrition to Enhance Recovery and Good Health for You (ENERGY) Trial: a behavioral weight loss intervention in overweight or obese breast cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology*, New York, v. 33, no. 28, p. 3169–3176, 2015. doi: 10.1200/JCO.2015.61.1095

ROSNER, B.; ELIASSEN, A. H.; TORIOLA, A. T.; HANKINSON, S. E.; WILLETT, W. C.; NATARAJAN, L.; COLDITZ, G. A. Short-term weight gain and breast cancer risk by hormone receptor classification among pre- and postmenopausal women. *Breast Cancer Research and Treatment*, Dordrecht, v. 150, no. 3, p. 643–653, 2015. doi: 10.1007/s10549-015-3344-0

SAWE, R. T.; KERPER, M.; BADVE, S.; LI, J.; SANDOVAL-COOPER, M.; XIE, J.; SHI, Z.; PATEL, K.; CHUMBA, D.; OFULLA, A.; PROSPERI, J.; TAYLOR, K.; STACK, M. S.; MINING, S.; LITTLEPAGE, L. E. Aggressive breast cancer in western

Kenya has early onset, high proliferation, and immune cell infiltration. *BioMed Central Cancer*, London, v. 16, p. 204, 2016. doi: 10.1186/s12885-016-2204-6

SCHMADEKA, R.; HARMON, B. E.; SINGH, M. Triple-negative breast carcinoma: current and emerging concepts. *American Journal of Clinical Pathology*, Oxford, v. 141, no. 4, p. 462–477, 2014. doi: doi.org/10.1186/s12885-016-2204-6

SERRA, K. P.; RAMALHO, S.; TORRESAN, R.; VASSALLO, J.; SARIAN, L. O. Z.; SILVA, G. R. P.; DERCHAIN, S. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 36, n. 12, p. 575–580, 2014. doi: 10.1590/SO100-720320140005158

SHIGDAR, S.; QIAN, C.; LV, L.; PU, C.; LI, Y.; LI, L.; MARAPPAN, M.; LIN, J.; WANG, L.; DUAN, W. The use of sensitive chemical antibodies for diagnosis: detection of low levels of EpCAM in breast cancer. *PLoS One*, San Francisco, v. 8, no. 2, e57613, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0057613

SINN, H.; KREIPE, H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. *Breast Care*, Basel, v. 8, no. 2, p. 149–154, 2013. doi: 10.1159/000350774

SONG, J.; CHEN, C.; YUAN, J. P.; SUN, S. R. Progress in the clinical detection of heterogeneity in breast cancer. *Cancer Medicine*, Malden, v. 5, no. 12, p. 3475–3488, 2016. doi: 10.1002/cam4.943

SONG, Q.; MERAJVER, S. D.; LI, J. Z. Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Human Genomics*, London, v. 9, p. 27, 2015. doi: 10.1186/s40246-015-0049-8

SOUSA, S.; BRION, R.; LINTUNEN, M.; KRONQVIST, P.; SANDHOLM, J.; MÖNKKÖNEN, J.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P. L.; LAUTTIA, S.; TYNNINEN, O.; JOENSUU, H.; HEYMANN, D.; MÄÄTTÄ, J. A. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Research*, London, v. 17, p. 101, 2015. doi: 10.1186/s13058-015-0621-0

STIVAL, R. A. S.; MARTINS, L. R. A.; PAGANINI, J.; CAIXETA, G. N.; MANOEL, W. J.; PAULA, E. C.; AYRES, F. M.; SILVA, A. M. T. C.; MUHLBEIER, D. F. M.;

- SADDI, V. A. Impacto do fenótipo triplo-negativo no prognóstico de pacientes com câncer de mama de uma unidade de referência no Brasil. *Revista Brasileira de Mastologia*, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 6–12, 2012.
- SZEBENI, G. J.; VIZLER, C.; KITAJKA, K.; PUSKAS, L. G. Inflammation and cancer: extra- and intracellular determinants of tumor-associated macrophages as tumor promoters. *Mediators of Inflammation*, Sylvania, v. 2017, 9294018, 2017. doi: 10.1155/2017/9294018
- TIAINEN, S.; TUMELIUS, R.; RILLA, K.; HÄMÄLÄINEN, K.; TAMMI, M.; TAMMI, R.; KOSMA, V. M.; OIKARI, S.; AUVINEN, P. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology*, Oxford, v. 66, no. 6, p. 873–883, 2015. doi: 10.1111/his.12607
- WANG, N.; LIANG, H.; ZEN, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 5, p. 614, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00614
- WEBER, M.; SCHLITTENBAUER, T.; MOEBIUS, P.; BÜTTNER-HEROLD, M.; RIES, J.; PREIDL, R.; GEPPERT, C. I.; NEUKAM, F. W.; WEHRHAN, F. Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. *Clinical Oral Investigations*, Berlin, v. 22, no. 1, p. 385–394, 2018. doi: 10.1007/s00784-017-2123-1
- WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. *Breast cancer estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. Globocan 2012. Geneve, 2012. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>>. Acesso em: 16 jan. 2018.
- YERSAL, O.; BARUTCA, S. Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, Hong Kong, v. 5, no. 3, p. 412–424, 2014. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412

YUAN, Z. Y.; LUO, R. Z.; PENG, R. J.; WANG, S. S.; XUE, C. High infiltration of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer is associated with a higher risk of distant metastasis. *Onco Targets and Therapy*, Auckland, v. 7, p. 1475–1480, 2014. doi: 10.2147/OTT.S61838

ZHANG, Y.; SCHNABEL, C. A.; SCHROEDER, B. E.; JEREVALL, P. L.; JANKOWITZ, R. C.; FORNANDER, T.; STÅL, O.; BRUFISKY, A. M.; SGROI, D.; ERLANDER, M. G. Breast cancer index identifies early-stage estrogen receptor-positive breast cancer patients at risk for early- and late-distant recurrence. *Clinical Cancer Research*, Denville, v. 19, no. 15, p. 4196–4205, 2013. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0804

ZHENG, L.; CHEN, J.; MA, Z.; LIU, W.; YANG, F.; YANG, Z.; WANG, K.; WANG, X.; HE, D.; LI, L.; ZENG, J. Capsaicin enhances anti-proliferation efficacy of pirarubicin via activating TRPV1 and inhibiting PCNA nuclear translocation in 5637 cells. *Molecular Medicine Reports*, Athens, v. 13, n. 1, p. 881–887, 2016. doi: 10.3892/mmr.2015.4623

[illegible]

1. OBJETIVO

Este procedimento destina-se a coloração de cortes histológicos utilizando o método da imunoperoxidase associada a polímeros.

2. DEFINIÇÕES

IHQ – Imuno-histoquímica: processo usado para identificar antígenos nos tecidos com anticorpos por intermédio de secção corada.

EPI – Equipamento de proteção individual.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos e materiais permanentes

- Balcão com pia para bateria de coloração e demais procedimentos técnicos
- Armário para armazenamento de reagentes químicos
- Armário-arquivo para as lâminas
- Capela para exaustão de vapores/gases
- Estufa para secagem/esterilização (50°C-200°C)
- Microscópio óptico comum binocular
- Balança analítica eletrônica
- pHmetro
- refrigerador comum
- freezer comum
- panela de pressão elétrica (capacidade 5 L ou mais)
- pipetas automáticas (de volumes ajustáveis)
- bandejas de coloração/incubação
- cubas de vidro/racks para lâminas
- tubos de ensaio 10 mL
- estante para tubos de ensaio
- proveta 1.000 mL
- Becker 1.000 mL

3.2. Materiais de consumo

- Lamínulas 24 mm × 50 mm
- Ponteiras
- Pissetas 500 mL (2 unidades)

- Papel absorvente

3.3. Reagentes para IHQ

- Água MilliQ
- Álcool absoluto
- Xilol
- Hidróxido de sódio p.a.
- Cloreto de sódio p.a.
- Fosfato de sódio dibásico e di-hidratado
- Fosfato de sódio monobásico e mono-hidratado
- Ácido cítrico mono-hidratado
- Albumina bovina fração V
- Hematoxilina de Harris
- Entellan
- Água oxigenada 10 vol
- Proteinase K
- Azida sódica
- Hidróxido de amônia
- Kit de revelação (escolher a opção que contenha bloqueador de proteínas, pós-primário ou complemento, polímero, cromógeno DAB e o substrato para DAB)

3.4. Soluções para IHQ

Solução mãe PBS

Em 1 L de água diluir:

Fosfato de sódio dibásico di-hidratado	30,77 g
Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado	4,86 g
Cloreto de sódio P.A.-ACS	160 g

- Solução 20 vezes concentrada (diluir em 1 L)

Solução Alumina 1%

Soroalbumina bovina (BSA) fração V	0,5 g
Azida sódica p.a. (NaN_3)	0,05 g
Tampão PBS q.s.p.	50 mL

- A azida sódica, aqui empregada como preservativo, deve ser manuseada com precaução, pois é muito tóxica se ingerida e forma um composto altamente explosivo quando em contato com alguns metais.
- Não utilizar soluções contendo azida sódica para diluir reagentes conjugados com peroxidase, pois esta é inativada na presença desta substância.

Solução DAB

Conforme bula de kit comercial (Leica): 50 µL de substrato por mL

- Pingar 100 µL do DAB pronto em cada lâmina
- Outros kits: gotas de DAB por mL de substrato
- A cor ideal do DAB é marrom forte (se estiver claro não funciona bem)
- A diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico. Ao manipulá-lo, usar luvas de borracha; estocar dentro de dessecador em freezer.

Solução tampão citrato 10 mM (pH 6,0)

Ácido cítrico mono-hidratado p.a. 2,1g

Água destilada q.s.p. 1.000 mL

- Dissolver e acertar o pH com solução NaOH 2N.

3.5. Desinfecção de bancadas e acessórios

- As lâminas são armazenadas no armário-arquivo, os reagentes no armário de reagentes, os anticorpos no freezer e o tampão PBS na geladeira.
- A bancada deve estar limpa antes de iniciar o procedimento e após finalizar. A ordem das cubas não deve ser alterada e não devem ser realizados outros procedimentos na mesma bancada. Todos os materiais utilizados devem ser guardados nos devidos lugares. As ponteiros devem ser novas a cada procedimento.
- Ligar o sistema de exaustão da sala de coloração antes de iniciar o procedimento.
- Verificar periodicamente a validade das substâncias químicas utilizadas.
- Quebra de lâminas durante o processamento deverá ser notificada no caderno de registro de incidentes técnicos.

3.6. EPI

- **Luvas, máscara, jaleco e procedimentos simples como lavar as mãos:** São obrigatórios e de fundamental importância antes e após a manipulação de

reagentes biológicos. Alguns reagentes necessitam de cuidados especiais por serem possíveis agentes carcinogênicos. Utilizar durante todo o procedimento.

4. PROCEDIMENTO

4.1 Preparação dos cortes histológicos

DESPARAFINIZAÇÃO

1. Xilol (a temperatura ambiente) 3× (5 a 10 min)

REIDRATAÇÃO

2. ETOH 100% 3× (2 min)
3. ETOH 80% (2 min)
4. ETOH 50% (2 min)
5. Lavar em água corrente

4.2 Bloqueio da peroxidase endógena

Procede-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% em metanol (ou solução comercial a 3% = 10 vol), em um banho de 5 min ou mais; seguem-se lavagens em água corrente. Colocar na solução que já deve estar aquecendo na panela de pressão.

6. H_2O_2 (10 vol) 3% (5 min)

4.3 Recuperação antigênica

7. Enzima (proteinase K) (10 a 15 min)
8. Ácido cítrico (10 mM) (4,2 g)
Água destilada 2 L
9. NaOH (2 N) corrigir o pH (6,0)

INCUBAÇÃO EM CALOR ÚMIDO – as lâminas são incubadas em tampão citrato 10 mM (pH 6,0) em panela de pressão, por 7 min. Após resfriamento por 20 min, seguem-se lavagens em água corrente.

10. Panela de pressão (7 min)
11. Resfriamento (20 min)

4.4 Diluição do anticorpo primário

12. Albumina 0,5% diluída em PBS
13. Titulação

4.5 Reação utilizando o complexo de polímeros sintéticos

14. Lavar em água corrente
15. Colocar em bandeja com fundo de água
16. Molhar lâminas com PBS
17. Secar lâminas
18. Pingar bloqueador de proteína (5 a 10 min)
19. Pingar anticorpo primário (200µL)
20. Tampar bandejas e colocar na geladeira **(overnight)**
21. Lavar em água corrente e escorrer
22. Molhar com tampão PBS
23. Secar lâminas
24. Pingar pós-primário (tampar bandeja) (30 min)
25. Lavar em água corrente e escorrer
26. Molhar com tampão PBS
27. Secar lâminas
28. Pingar Polímero (tampar bandeja) (30 min)
29. Lavar em água corrente e escorrer
30. Molhar com tampão PBS

4.6 Revelação

PREPARAR O DAB (diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico; ao manipulá-lo, usar luvas)

31. Pingar o DAB pronto em cada lâmina (100 µL) (5 a 10 min)
32. Lavar em água corrente e escorrer
33. Colocar em cesta e lavar bem
34. Colocar em cuba de hematoxilina para contracorar
35. Lavar em água corrente (até limpar o contracorante)
36. Imergir 3 a 4× (rapidamente) a cesta na água amoniacal
37. Lavar em água corrente

4.7 Desidratação

38. ETOH 100% 4× (2 a 3 min)
39. Xilol 2× (enquanto estiver montando)

4.8 Montagem

40. Pingar 1 gota de Entellan em cada lamínula
41. Pingar uma gota de xilol da lâmina a ser montada no Entellan e colar (virada para baixo)

42. Pressionar uma contra a outra e secar a lâmina
43. Se houver bolhas, retirar
44. Mergulhar no xilol e deixar secar apoiada na cuba
45. Colocar na bandeja de madeira
46. Confeccionar etiquetas e colar

- Importante: lavar bandejas com água e sabão (esfregar com bucha, para não ficar restos de DAB)

Observação: esse protocolo é baseado na utilização do kit de revelação da Leica, Novo Link.

5. RESULTADOS

As lâminas coradas serão avaliadas quanto à expressão dos marcadores empregados, utilizando microscópio óptico comum, por um patologista.

6. REGISTRO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Os blocos de parafina são selecionados através do Setor de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Araújo Jorge, levando em consideração a disponibilidade de material. Após a seleção, é realizado o processamento técnico, sendo feitos cortes histológicos, os quais são fixados em lâminas. A relação das lâminas recebidas para coloração por imuno-histoquímica é registrada em planilha no ato do recebimento. Os resultados gerados são registrados em livro ATA pelo próprio colaborador e as conclusões finais, na planilha de recebimento.

Após a imuno-histoquímica, caso não ocorra coloração, avaliar a estocagem e o manuseio dos anticorpos, e a quantidade de líquidos nas lâminas no *overnight* deverão ser revisadas.

[illegible]

1. OBJETIVO

Este procedimento destina-se a coloração de cortes histológicos utilizando o método da imunoperoxidase associada a polímeros.

2. DEFINIÇÕES

IHQ – Imuno-histoquímica: processo de identificar antígenos nos tecidos com anticorpos, através de secção corada.

EPI – Equipamento de proteção individual.

AD – Água destilada

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos/materiais permanentes

- Balcão com pia para bateria de coloração e demais procedimentos técnicos
- Armário para armazenamento de reagentes químicos
- Armário-arquivo para as lâminas
- Capela para exaustão de vapores/gases
- Estufa para secagem/esterilização (50°C-200°C)
- Microscópio óptico comum binocular
- Balança analítica eletrônica
- pHmetro
- refrigerador comum
- freezer comum
- panela de pressão elétrica (capacidade 5 L ou mais)
- pipetas automáticas (de volumes ajustáveis)
- bandejas de coloração/incubação
- cubas de vidro/racks para lâminas
- tubos de ensaio 10 mL
- estante pra tubos de ensaio
- proveta 1.000 mL
- Becker 1.000 mL

3.2. Materiais consumo

- Lamínulas 24 mm × 50 mm
- Ponteiras
- Pissetas 500 mL (2 unidades)

- Papel absorvente

3.3. Reagentes para IHQ

- Água MiliQ
- Álcool absoluto
- Xilol
- Hidróxido de sódio p.a.
- Cloreto de sódio p.a.
- Fosfato de sódio dibásico e di-hidratado
- Fosfato de sódio monobásico e mono-hidratado
- Ácido cítrico mono-hidratado
- Albumina bovina fração V
- Hematoxilina de Harris
- Entellan
- Proteinase K
- Azida sódica
- Hidróxido de amônia
- Kit de revelação (escolher a opção que contenha bloqueador de proteínas, pós-primário ou complemento, polímero, cromógeno DAB e o substrato para DAB)

3.4. Soluções para IHQ

Solução mãe PBS

Em 1 L de água diluir:

Fosfato de sódio dibásico di-hidratado 30,77 g

Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado 4,86 g

Cloreto de sódio P.A.-ACS 160 g

- Solução 20 vezes concentrada (diluir em 1 L: 50 mL de PBS solução mãe + 950 mL de H₂O)

Solução Albumina 1%

Soroalbumina bovina (BSA) fração V 0,5 g

Azida sódica p.a. (NaN₃) 0,05 g

Tampão PBS q.s.p. 50 mL

- A azida sódica, aqui empregada como preservativo, deve ser manuseada com precaução, pois é muito tóxica se ingerida e forma um composto altamente explosivo quando em contato com alguns metais.
- Não utilizar soluções contendo azida sódica para diluir reagentes conjugados com peroxidase, pois esta é inativada na presença desta substância.

Solução DAB

Conforme bula de kit comercial (DAKO) 1 gota de DAB por mL de substrato

- Pingar 200 µL do DAB pronto em cada lâmina
- A cor ideal do DAB é marrom forte (se estiver claro não funciona bem)
- A diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico. Ao manipulá-lo, usar luvas de borracha; estocar dentro de dessecador em freezer.

Solução tampão citrato 10 mM (pH 6,0, 6,2, 7,4)

Ácido cítrico mono-hidratado p.a. 5,25 g

Água destilada q.s.p. 2,5 L

- Dissolver e acertar o pH com solução NaOH 2N (25 mL e depois gotejar).

Solução NaOH 2N

32 g de NaOH, completando o volume para 400 mL de AD

3.5. Desinfecção de bancadas e acessórios

- As lâminas são armazenadas no armário-arquivo, os reagentes no armário de reagentes, os anticorpos no freezer e o tampão PBS na geladeira.
- A bancada deve estar limpa antes de iniciar o procedimento e após finalizar. A ordem das cubas não deve ser alterada e não devem ser realizados outros procedimentos na mesma bancada. Todos os materiais utilizados devem ser guardados nos devidos lugares. As ponteiros devem ser novas a cada procedimento.
- Ligar o sistema de exaustão da sala de coloração antes de iniciar o procedimento.
- Verificar periodicamente a validade das substâncias químicas utilizadas.
- Quebra de lâminas durante o processamento deverá ser notificada no caderno de registro de incidentes técnicos.

3.6. EPI

- **Luvas, máscara, jaleco e procedimentos simples como lavar as mãos:**
São obrigatórios e de fundamental importância antes e após a manipulação de reagentes biológicos. Alguns reagentes necessitam de cuidados especiais por serem possíveis agentes carcinogênicos. Utilizar durante todo o procedimento.

4. PROCEDIMENTO

1ª Etapa

4.1 Preparação dos cortes histológicos

DESPARAFINIZAÇÃO

- Colocar em estufa 60-80°C (10 min)
47. Xilol (a temperatura ambiente) 3× (10 min)

REIDRATAÇÃO

48. ETOH 100% 3× (2 min)
49. ETOH 80% (2 min)
50. ETOH 50% (2 min)
51. Lavar em água destilada (colocar cesta com as lâminas dentro da cuba com AD)

Obs.: Ao passar a cesta de uma cuba para outra, tirar o excesso de líquido pressionando a cesta sobre papel absorvente.

4.2 Bloqueio da peroxidase endógena

1. Acolchoar fundo de bandeja com papel absorvente embebido em AD
2. Solução Peroxidase Block (200 µL em cada lâmina) (7 min)
3. Lavar em Wash Buffer (na bandeja (2 min)

4.3 Recuperação antigênica

4. Ácido cítrico (10 mM) (**5,25 g**) (Não pode ajustar pH mais de uma vez; caso aconteça, desprezar)

2,5 L de AD

5. NaOH (2N) corrigir o pH (6,2)

Colocar **25 mL** direto, após gotejar até alcançar pH 6,2

INCUBAÇÃO EM CALOR ÚMIDO – as lâminas serão incubadas em tampão citrato 10 mM (pH 6,2) em panela de pressão, por 5 min. Após resfriamento por 10 min, segue-se lavagem em Water Buffer.

6. Panela de pressão (5 min)
7. Resfriar (Colocar suporte da panela sobre papel toalha na bancada (10 min)
Obs.: Diluir o anticorpo neste intervalo
8. Lavar em Wash Buffer (na bandeja) (2 min)
9. Bater as lâminas sobre papel absorvente e secar as lâminas

4.4 Diluição do anticorpo primário

Ao diluir, não aproveitar a mesma ponteira para pipetar diferentes concentrações

Antes de aplicar a solução do anticorpo **SECAR AS LÂMINAS**

10. CD163 (1:25 ou 1:50) (50 µL de anticorpo diluído por lâmina: nº de lâminas × 50 µL = volume total da solução de anticorpo)

4.5 Reação utilizando o complexo de polímeros sintéticos

11. Lavar com Wash Buffer (2 min)
12. Secar as lâminas com papel toalha e colocá-las na bandeja
13. Pingar sobre a lâmina 50 µL de anticorpo primário (diluído) por lâmina
14. Espalhar o anticorpo com ponteira sobre todo o tecido
15. Tampar a bandeja e incubar em geladeira **overnight** (não mais que 36 h)

2ª Etapa

16. Bater as lâminas sobre papel absorvente e colocá-las em cesta
17. Lavar em Wash Buffer 1 **lavagem** (2 min)
18. Secar as lâminas com papel absorvente e colocá-las na bandeja novamente
19. Aplicar 100 µL de polímero (solução AMARELA), espalhar a solução com ponteira
20. Incubar em bandeja com tampa; virar a bandeja na metade do tempo . (30 min)
21. Lavar em Wash Buffer (2 min)
22. Secar em papel absorvente e colocá-las na bandeja

4.6 Revelação

PREPARAR O DAB (diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico)

23. Pipetar 200 µL de DAB em cada lâmina (17 min)
1 mL de substrato

1 gota de DAB (50 µL) (Obs.: dá para 20 lâminas)

24. Inativar o DAB em água corrente (cesta dentro da cuba) (10 min)
25. Contracorar em hematoxilina (20 s)
26. Lavar em água corrente até limpar (5 min)
27. Submergir em água amoniacal (10 submersões)
 ½ tampa de hidróxido de amônio PA (12 gotas) para 500 mL de AD (preparar no minuto)
28. Lavar em água corrente para tirar o excesso (5 min)

4.7 Desidratação

29. ETOH 100% 4× (1 min)
30. Xilol 2× (10 min)

Obs.: Ao passar a cesta de uma cuba para outra, tirar o excesso de líquido pressionando a cesta sobre papel absorvente.

4.8 Montagem

31. Pingar 1 gota de Entellan em cada lamínula e 2 gotas de xilol em cima da gota de Entellan
32. Colocar a lâmina rente à lamínula e debruçar delicadamente sobre a lamínula
33. Pressionar para retirar o excesso, limpar a lâmina e deixar secar
34. Confeccionar etiquetas e colar

- Importante: lavar bandejas com água e sabão (esfregar com bucha, para não ficar restos de DAB)

Observação: esse protocolo é baseado na utilização do kit de revelação DAKO ENVISIO FLEX MINI.

5. RESULTADOS

As lâminas coradas serão avaliadas quanto à expressão dos marcadores empregados, utilizando microscópio óptico comum, por observadores.

6. REGISTRO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Os blocos de parafina são selecionados através do Setor de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Araújo Jorge, levando em consideração a disponibilidade de material. Após a seleção, é realizado o processamento técnico, sendo feitos cortes histológicos, os quais são fixados em lâminas. A relação das lâminas recebidas para

coloração por IHQ é registrada em planilha no ato do recebimento. Os resultados gerados são registrados em livro ATA pelo próprio colaborador e as conclusões finais, na planilha de recebimento.

Após a IHQ, caso não ocorra coloração, avaliar a estocagem e o manuseio dos anticorpos, e a quantidade de líquidos nas lâminas no *overnight* deverão ser revisadas.

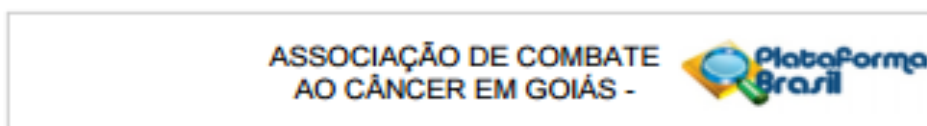
7. REFERÊNCIAS

JESUS, L. W. O. Imunocitoquímica. In: SIVIERO, F. (Org.). *Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa*. São Paulo: Roca, 2013. p. 137–170.

SANTOS, R. T. M.; WAKAMATSU, A.; KANAMURA, C. T.; NONOGAKI, S.; PINTO, G. A. Procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização ‘in situ’. In: ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALLO, J. (Org.). *Manual de imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p. 237–259.

ANEXOS

Anexo A Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer de Goiás (CEP/ACCG)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL EM SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: VERA APARECIDA SADDI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55344216.1.0000.0031

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.537.899

Apresentação do Projeto:

Estudo epidemiológico molecular, transversal e analítico, retrospectivo, tipo caso-controle. Utilizará dados clínicos e histopatológicos colhidos a partir de prontuários de pacientes com carcinomas de mama triplo-negativos e não triplo-negativos e determinação de macrófagos tumorais e infiltrados linfocitários em amostras de biópsia ou peça cirúrgica, fixadas em formol e incluídas em parafina, obtidas dos dois grupos de pacientes. Todos os blocos de parafina serão obtidos dos arquivos do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge.

Os resultados esperados visam a melhor compreensão de mecanismos moleculares associados ao comportamento mais agressivo dos carcinomas triplo-negativos, bem como a identificação de alvos moleculares específicos (macrófagos CD11c, CD68 e CD163 e os linfócitos CD4 e CD8), passíveis de serem usados em estudos clínicos posteriores.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar, detectar e avaliar a importância da presença de macrófagos e linfócitos no microambiente de carcinomas de mama triplos negativos e não triplos negativos.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua 239
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7050 E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 1.537.899

Avaliar o potencial valor prognóstico dos macrófagos tumorais e infiltrados linfocitários em câncer de mama triplo-negativos e não triplo- negativos;

Relacionar a população de macrófagos M1 E M2 a fatores clínico-patológicos, como localização e tamanho do tumor, índice de proliferação, metástase linfonodal, sobrevida em câncer de mama triplo negativo e não triplo negativo;

Relacionar a população de linfócitos CD4 e CD8, a fatores clínico-patológicos, como localização e tamanho do tumor, índice de proliferação, metástase linfonodal, sobrevida em câncer de mama triplo negativo e não triplo negativo;

Relacionar a presença dos marcadores de macrófagos CD11c, CD68 E CD163 e os marcadores de linfócitos CD4 e CD8 com a resposta imunológica do tumor triplo negativo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto aos riscos, os autores destacam o cuidado quanto ao sigilo da identidade das pacientes, cujos dados serão identificados apenas pelo número de registro no projeto. Não foram previstos quaisquer riscos ou transtornos às pacientes, pois toda a pesquisa será realizada em prontuários e materiais já armazenados no Setor de Anatomia Patológica. Destacam que todos os cuidados deverão ser tomados a fim de preservar e não esgotar os blocos de parafina contendo as amostras. Afirmam que as amostras de tecido mamário e os produtos de imuno- histoquímica serão armazenados na forma de biorepositório, obedecendo a Resolução CNS 441/2011, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa bem escrito, com referências atualizadas e metodologia bem delineada. Atende a todos os requisitos éticos previstos para o tipo de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os termos obrigatórios, incluindo as autorizações do Serviço de Ginecologia e Mama, Diretoria Técnica do Hospital Araújo Jorge, Serviço de Anatomia Patológica e Serviço de Arquivo Médico. Trazem também a solicitação de dispensa do TCLE, o que é condizente com o tipo de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Julgo que o projeto apresenta os requisitos necessários à sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer aprovado.

Endereço: Rua 238
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3243-7050 Fax: (62)3243-7060 E-mail: cepaccg@accg.org.br

**ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -**



Continuação do Parecer: 1.537.666

Ausência	dispensa_tde.pdf	10/03/2016 13:22:37	VERA APARECIDA SADDI	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	10/03/2016 13:15:59	VERA APARECIDA SADDI	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	10/03/2016 13:15:47	VERA APARECIDA SADDI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 10 de Maio de 2016

Assinado por:

Elismauro Francisco de Mendonça
(Coordenador)

Endereço: Rua 239
Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO CEP: 74.605-070
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3243-7000 Fax: (62)3243-7000 E-mail: cepaccg@accg.org.br

Página 24 de 24

Anexo B Normas de publicação no periódico *Histopathology*

Author Guidelines

Aims and scope

Histopathology is an international journal that publishes high quality research from a broad range of areas within the field of diagnostic human pathology. This includes papers in which the research is solely based on morphological/histopathological techniques and those in which these are complemented by other methods and technologies such as proteomics and genomics. There is a focus on papers in which there is a clear impact on clinical outcomes including improved diagnosis, better prognostic information and prediction of response to therapies (tissue based stratified medicine). The journal also publishes papers that describe technical innovations that lead to improved diagnostic and prognostic information.

Translational studies with direct relevance to the interpretation of tissue and cellular alterations in human disease are also welcome although the journal does not accept papers that are solely based on animal or tissue culture studies.

As well as original research papers, the Journal seeks to provide rapid publication in a variety of other formats, including editorials, review articles (both contributed and solicited), short reports, lessons of the month and items of correspondence. Case reports are published only if they are of marked originality and have an exceptionally important clinical message; these will generally be accepted as items of correspondence. The journal will consider high quality systematic reviews and where appropriate meta-analyses of relevant data.

As the journal of the British Division of the International Academy of Pathology, it seeks to reflect the broad professional interests of the Society's membership but its ethos, authorship, content and purpose are those expected of a leading publication in the international scientific literature.

Submitting your manuscript: summary

Please make your submission online at <http://mc.manuscriptcentral.com/histop>.

Submissions can be uploaded as a Word document plus separate figure files (GIF, JPG, BMP, TIF, PIC).

Should you experience any difficulties in submitting your manuscript, please do not hesitate to contact the Editorial Assistant whose contact details are as follows:

Histopathology Editorial Office
Wiley-Blackwell
9600 Garsington Road
Oxford
OX4 2DQ
Tel: +44 (0)8458 340370
Fax: +44 (0)1865 714591
E-mail: HISedoffice@wiley.com

The following outlines the requirements for submission of a manuscript to *Histopathology*. Further details are given below. There are no submission charges, page charges or fees for inclusion of supporting information on the internet.

Every manuscript should have:

A concise cover letter

A Microsoft Word (or equivalent) file (NOT A PDF) that is presented in English, in a double spaced format using a standard font (e.g. Arial, Helvetica, Times Roman etc 12 point) and has page numbers

A title page (or pages) containing:

- A succinct and clear title that accurately describes the work contained within the manuscript.
- A short running title (up to 50 characters including spaces)
- List of authors (using given and family name, but not degrees)
- Full affiliations of all authors and contact details of the corresponding author(s)
- A conflict of interest statement
- A word count (from beginning of Introduction to end of Discussion)

The next page should have:

- An Abstract (structured and no more than 250 words)
- Keywords (3 to 8) preferably chosen from the medical subject headings (MeSH) in Index Medicus.

The manuscript should contain the following:

- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements which should include a statement defining funding sources
- List of abbreviations (optional)
- List of online Supporting Information (if any)
- Reference list in the correct format (see below)
- Table(s)
- Figure legends (concise and not repeating material in the Results section)

As separate files:

- Figures (at the appropriate size and resolution [<http://authorservices.wiley.com/electronicartworkguidelines.pdf>])
- Supporting Information files (if any)
- Additional Files for Review but NOT for publication
- Patient Consent Form (where relevant)

Submission Checklist

The manuscript must be submitted via the online submission system (and not by mail or email), which is located at: <http://mc.manuscriptcentral.com/histop>

- Your Histopathology Manuscript Central username and password (unless you are a new user)
- All manuscript, figure and Supporting Information files finalised and ready to upload
- Permission to reproduce any previously published material scanned and ready to upload
- Full correct names and E-mail addresses of all of your co-authors.
- The names and full contact details of up to three suggested referees
- Additional files for review but not for publication may be provided

Review Process

An initial assessment will be made by the Editor-in-Chief (or one of three Regional Editors) following submission of your manuscript. This process considers whether the submitted work falls within the scope of Histopathology (see above). At this point a proportion of manuscripts will be returned to the authors.

Manuscripts that enter the review process are assigned sequentially to a relevant Associate Editor who invites reviewers (normally two external reviews are sought). The reviewers' evaluations and Associate Editor's comments are submitted to the Editor-in-Chief (or the relevant Regional Editor) to inform a final decision. We aim to convey a decision within four weeks of the receipt of the manuscript.

The Editor-in-Chief or Regional Editor will advise authors whether a manuscript is accepted, requires revision, or is rejected. Revisions are expected to be returned within four weeks of decision. Manuscripts not revised within this time are subject to withdrawal from consideration for publication unless there are extenuating circumstances. Please note that some manuscripts will have to be rejected on the grounds of priority and available space. Invitation to submit a revised manuscript does not imply that acceptance will automatically follow.

Authors may provide the Editor-in-Chief /Regional Editors with the names, addresses and email addresses of up to three suitably qualified individuals of international standing who would be competent to referee the paper, although the Editorial team will not be bound by any such nomination. Likewise, authors may advise of any individual who for any reason, such as potential conflict of interest, might be inappropriate to act as a referee, again without binding the Editor-in-Chief.

The decision of the Editor-in-Chief is final. If, however, authors dispute a decision and can document good reasons why a manuscript should be reconsidered, a rebuttal process exists. In the first place, authors should write to the Editor-in-Chief outlining their case.

Detailed guidance on the preparation of manuscripts

Cover letter

Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time. This should be confirmed in the covering letter. The corresponding author must confirm that all authors have agreed with the submission in its present (and subsequent) forms. The authors should also indicate in their covering letter: the aim of the study; the significant and novel findings and where relevant how the findings could influence clinical practice.

General points

The manuscript should be prepared using a word processing package, in A4 page, using a standard font, double spaced with margins of at least 2 cm and have page numbers. Do not use line numbering. The manuscript should be in English using consistent and preferably UK spelling.

Manuscript title

The title of the paper should be short and must summarise the content of the article. It should be presented in a way that catches the attention of readers. It must however be accurate and unambiguous and should focus on the message of the paper.

Short running title

This should be concise (maximum of 50 characters including spaces) and reflect the main title and content of the manuscript.

List of contributors

All those designated as authors should qualify for authorship and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. One author (deemed to be the Corresponding Author) should take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article. Joint first authorship is permitted but this is normally restricted to two contributors unless there are exceptional circumstance.

Authorship credit should be based only on 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published. Provision of funding, collection of data or general supervision of the research group alone does not justify authorship. All others who contributed to the work who are not authors should be named in an Acknowledgements section.

If you are submitting a revised article and the authors have changed from the original submission, for example: if additional authors are added [or removed] then agreement of all authors is mandatory with justification and explanation required within the covering letter, submitted via the ScholarOne system.

Full affiliations of all authors

This should include the name of the department(s) and institution(s) to which the work should be attributed, and contact details of the corresponding author i.e. the full postal address, phone number and email address.

Conflict of interest statement

Authors are responsible for disclosing all financial and personal relationships between themselves and others that might bias their work. To prevent ambiguity, authors must state explicitly whether potential conflicts do or do not exist. Authors should describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report and in the decision to submit the report for publication.

A conflict of interest statement must be included in the manuscript (on the title page) that details any conflicts that exist for each author, or declares the absence of conflict for each author; this will be incorporated into the text of any accepted article.

We provide here details of some example situations or arrangements that the Editors of Histopathology would deem to result in a conflict of interest:

- Private or corporate funding of any part of the study, or donation or loan of supplies or equipment. In such cases role of the study sponsor or donor(s), if any, in the study design; data collection, analysis or interpretation; or writing of the report must be made clear.
- For each author (or their immediate family members):
 - Employment by a company that produces a material or equipment used in the study.
 - The receipt of financial or other compensation (such as cash, travel/accommodation costs, royalties, fees, stock or stock options) for work; advising or consulting; expert testimony or advocacy/public speaking from companies, organizations, institutions, and individuals.
 - The ownership of financial holdings or considerations, such as stocks or bonds in a company that could be construed as gaining from the conclusions of the study.
 - The holding of a patent on a method or equipment used in the study, or that employs a principle validated by the study.
 - The presence of personal, professional, political, institutional, religious, or other associations that could have a bearing upon the stance taken in the submitted work.

Full details of the conflicts of interest of our Editor-in-Chief, Regional Editors and Associate Editors are held on record at the journal offices.

We ask our Editors to identify any manuscripts for which there is a real or perceived conflict of interest; they would not participate in the review process in such a situation. Similarly we ask reviewers to similarly declare any conflict of interest and decline invitations to review if this exists.

With regard to conflict of interest we are guided by the principles laid down by the Committee on Publication Ethics (<http://www.publicationethics.org.uk>), the International Committee of Medical Journal Editors (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication Updated October 2008 <http://www.icmje.org/#conflicts>) and the World Association of Medical Editors (WAME Editorial Policy and Publication Ethics Committees Conflict of Interest in Peer-Reviewed Medical Journals Posted March 27, 2009. <http://www.wame.org/conflict-of-interest-in-peer-reviewed-medical-journals>).

Word count (from beginning of Introduction to end of Discussion)

The length of the manuscript should normally be no more than 2500 words. The use of online Supporting Information as a route for presenting additional material is available. When using the device of Supporting Information for additional text or data, authors should remember that the main manuscript must contain sufficient information to make the work intelligible without resort to the Supporting Information. For example, it is not acceptable to shorten a manuscript by placing all of the Materials and Methods in Supporting Information. However it is acceptable to place some aspects of experimental detail in Supporting Information.

Abstract (Structured and no more than 250 words)

After the title page(s) the next page should carry an abstract of no more than 250 words which includes subsections: Aims; Methods and results; Conclusions. The abstract should be concise and clear. It should emphasise new and important aspects of the study. It should be understandable without reference to the rest of the paper and should contain no citation to references in the reference list. Non-standard abbreviations should be avoided. Advice on how to optimise your abstract for search engines can be found here.

Keywords

Below the abstract, authors should provide and identify as such 3 to 8 keywords or short phrases to assist indexing the article and that may be published with the abstract. MESH headings are a useful guide for authors in considering keywords.

Manuscript structure: general aspects

As noted above full articles should usually be no more than 2500 words from the beginning of the Introduction to the end of the Discussion, which is approximately nine journal pages, when tables, figures and references are also included.

Review articles may exceed these limits by arrangement with the Editor-in-Chief. Please remember that succinct articles are likely to make a greater impact on readers than long ones and are likely to proceed more rapidly through the editorial process post-acceptance..

The text of research articles should be divided into sections with the headings: Abstract, Introduction, Methods, Results and Discussion. Some articles may need subheadings within sections (especially the Results and Discussion sections) to clarify their content. Such sections however should not be numbered.

Other types of articles, such as reviews and short reports, still need a title and abstract and should adhere as closely as possible to these guidelines. This is not required in items of correspondence.

Review articles and commentaries/editorials have greater flexibility than standard original articles although a concise clear style is essential. Such articles are usually by invitation although the editorial team is happy to receive suggestions and outlines of possible material of this kind. All such material, whether invited or not, will normally undergo peer review.

Editorials usually take the form of a brief (typically 2 to 3 journal pages) review that places a paper (or group of papers) published in the issue into a broader context. They should be focussed and pithy. They should be accessible to a broader audience than the primary papers might be. Diagrams are often useful to illustrate concepts and ideas.

The nature of a review article is self-explanatory. These might be of variable length from short items (mini-review) through to very detailed, fully referenced contributions.

Items of correspondence: Comments on previously published papers, items of topical interest, and brief original communications will be considered under this heading. The letter should not be divided into sections. No abstract is required. The length, including references, should be between 600 and 800 words. You should include no more than six references. Submit no more than two black and white or coloured illustrations; each should not exceed one column width.

Short reports: The Journal will consider brief original reports; the length should not exceed 1500 words. It should still include a structured abstract of 250 words. It should not contain more than two figures or tables, or one of each.

Lesson of the Month: Articles submitted for "Lesson of the Month" should be succinct with a punchy title and provide novel information to the reader. Such articles might include a description of a case (or cases) that raises interesting diagnostic issues from which an important lesson is learnt. This may include cases where errors have been made. Examples could include cases where there is a differential diagnosis and a particular immunostain is misleading or the description of a previously unreported iatrogenic artefact. No abstract is required. The length, including references, should be between 600 and 800 words. You should include no more than six references. Submit no more than two black and white or coloured illustrations; each should not exceed one column width.

Manuscript structure: specific guidance

Introduction

Authors should state the purpose of the article and summarise the rationale for the study or observation, providing relevant background. The length of the Introduction is not specified but it should be in proportion to the rest of the manuscript and sufficiently comprehensive to allow a non specialist to understand the setting of the work. Give only strictly pertinent references and avoid the inclusion of data or conclusions from the work being reported. The aims of the study and hypothesis being tested should be stated clearly and objectively.

Materials and methods

• Ethical issues:

• A statement describing explicitly the ethical background to the studies being reported should be included in all manuscripts in the Materials and Methods section. Ethics committee or institutional review board approval should be clearly stated and the relevant reference numbers and dates must be given. Do not use patients' names, initials or hospital numbers, especially in illustrative material.

• The Journal recognises that the requirements and legislation pertaining to all aspects of ethical review may vary between different jurisdictions. If there are any legitimate concerns raised by reviewers or editors about any aspect of the ethical issues of the study that cannot be satisfactorily resolved, the Editor-in-Chief reserves the right to decline to publish the manuscript. The current ethical policies of Histopathology can be found at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-)

2559/homepage/ethical_policy_of_histopathology.htm.

- As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE), adherence to these submission criteria is considered essential for publication in Histopathology. If, at any stage in the submission and review process or even after publication, a manuscript or authors are found to have disregarded these criteria, it is the duty of the Editor-in-Chief to report this to COPE. COPE may recommend that action may be taken, including but not exclusive to, informing the authors' professional regulatory body and/or institution of such a dereliction. The website for COPE may be accessed at: <http://www.publicationethics.org.uk>
- If concerns are raised regarding potential misconduct, such as plagiarism, redundant publication, or fabrication or manipulation of data, authors should be aware that the Journal will follow the COPE guidelines in dealing with the case, which, if the Journal is not satisfied with the authors' explanation, can lead to the withdrawal of a manuscript from peer-review, or the publication of a retraction, and also to the Journal informing the authors' professional regulatory body and/or institution of the details of the case.

Patient consent: Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed consent/release form in all instances.

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is deceased, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the image against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

• **General aspects of Materials and Methods:**

- Describe the methods, reagents and equipment (give the manufacturer's name and address in parentheses) and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods (see below); provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well known; describe new or substantially modified methods.
- Studies on biomarkers and/or prognostic and predictive factors must describe the patient selection criteria and provide a detailed breakdown of the cohort(s) included in the study.
- Important information that is not essential for the understanding of the manuscript may appear as Supporting Information online. Examples of this might include PCR primer sequences and extraneous experimental detail. As a guide, information required to understand what was done and how, should be in the manuscript.
- Reliable studies of clinical samples require high quality samples and we anticipate that authors will document BRISQ Tier one variables See: Simeon-Dubach D, Burt AD, Hall PA. Quality really matters: the need to improve specimen quality in biomedical research. *Histopathology*. 2012;61(6):1003-5

Histopathology is interested in personalized medicine research describing biomarkers of therapeutic outcome or response. Predictive biomarker studies that estimate response or survival in advance of therapy or pharmacodynamic biomarker studies that are associated with target modulation are of particular interest. Highest priority will be given to those articles that are likely to have direct clinical applications and are definitive based on size of cohort, methodological approach, statistical analysis, multivariate analysis, reproducibility, and patient follow-up.

Personalized medicine biomarker studies should have the following characteristics:

- They are definitive in size and statistical power. Prospective studies or prospective-retrospective studies will receive priority. Retrospective studies will be considered, but they should include verification using an independent cohort.
- They describe a unique cohort with results that directly impact clinical practice. (For rare cancer types, it is recognized that small cohorts will be analyzed.)
- They adhere to the REMARK criteria as listed in their guidelines (<http://inci.oxfordjournals.org/content/97/16/1180/T1.expansion.html>).
- They contain thorough specimen collection data, assay validation, and statistical rigor.
- They are based on (or include) mechanistic data.

• **Statistics and bioinformatics**

- You must describe statistical and bioinformatic approaches for both data processing and analysis with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of error or uncertainty (such as standard error or confidence intervals). Sample size should always be indicated. References for the design of the study and statistical methods should usually be to standard works (with pages stated) but citation to the papers in which the designs or methods were originally reported may sometimes be appropriate.
- Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Where possible use graphs as an alternative to tables.
- The checklist for statisticians published by the BMJ is a valuable resource (see: <http://resources.bmj.com/bmj/authors/checklists-forms/statisticians-checklist>).

A systematic review is a comprehensive high- level summary of primary research on a specific research question

that attempts to identify, select, synthesise and appraise all (high quality) evidence relevant to that question. A meta-analysis uses statistical methods to quantitatively evaluate pooled data from single studies. Many pathological reviews are likely not to have sufficient data on clinical outcomes to warrant a meta-analysis. While the content of a systematic review will be partly determined by the topic and evidence, as a minimum the review should:

- Clearly state the purpose of the review
- Determine inclusion and exclusion criteria to generate a PRISMA flowchart that includes identification of studies, screening, eligibility and inclusion data (See Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J et al, The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ* 2009; 339: b2700)
- Determine the primary end point of the review ie. acceptance or rejection of the null hypothesis
- Clearly describe the search methodology (databases, search terms)
- Describe the process of data extraction
- Undertake statistical assimilation if appropriate
- Evaluate the quality and/or risk of bias of the studies included preferably using a standard assessment tool (See Guyatt, GH, Oxman AD, Vist GE et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008; 336: 924-926)

Results

Present your results in logical sequence in the text, tables and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasise or summarise only important observations. Figures and tables should be clearly referred to in the manuscript. It is generally the case that interpretation should be reserved for the discussion.

Discussion

Emphasise the novel and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or the Results section. Include in the Discussion section the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. Relate the observations to other relevant studies including those that may conflict with the data you present. Highlight the clinical importance of your findings.

Avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by the data. Authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes economic data and analyses. Avoid alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such. Recommendations, when appropriate, may be included. References to unpublished data should not be included.

Acknowledgements

List all contributors who do not meet the criteria for authorship, such as a person who provided purely technical help, writing assistance or a department chairperson who provided only general support. Financial and material support should also be acknowledged.

Groups of people who have contributed materially to the paper but whose contributions do not justify authorship may be listed under a heading such as 'clinical investigators' or 'participating investigators' and their function or contribution should be described.

All authors must indicate their specific contributions to the work described in the manuscript. Some examples include

- X performed the research
- Y designed the research study
- Z contributed essential reagents or tools
- A analysed the data
- B wrote the paper.

The acknowledgements should also contain a statement defining funding sources. This should include source(s) of support in the form of grants, equipment, or reagents, all of these should be clearly and fully defined, including sources of materials, reagents or other resources as gifts.

Gene names

Human gene names should be upper case and italic and mouse gene names lower case and italic; protein names should be in plain type. Please follow HUGO gene nomenclature for human genes, at:

<http://www.genenames.org/>. For mouse and rat gene nomenclature please follow the guidelines at: <http://www.informatics.jax.org/nomen/>

List of online Supporting Information (optional)

A concise title and brief legend (no more than 20 words, with no special characters) as appropriate must be provided for each piece of Supporting Information.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals in superscript. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of

the particular table or figure. All references should be complete and accurate. References cited in Supporting information must appear in the main list of references even if they are not employed in the main text, and not in a separate list seen only online.

Avoid using abstracts as references. References to papers accepted but not yet published should be designated as 'in press'; authors should obtain written permission to cite such papers as well as verification that they have been accepted for publication. Copies of any papers cited as 'in press' should normally be included in the submission. Avoid using unpublished observations and information from manuscripts submitted but not accepted.

The Journal's reference style is modified Vancouver used by the NLM in Index Medicus. Up to six authors are allowed in the reference list. For articles with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by *et al.* The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Title abbreviations can be checked using the PubMed Journals database:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals&term=>. Articles published online but not yet assigned to an issue may be cited using the DOI. Online citations should include the date of access. Examples of our reference style are:

Journal article from an issue

Fan H, Yuan Y, Wang J et al. CD117 expression in operable oesophageal squamous cell carcinomas predicts worse clinical outcome. *Histopathology* 2013; 62: 1028-1037.

Journal article in advance of inclusion in an issue

Watts K, Li J, Magi-Galluzzi C et al. Incidence and clinicopathological characteristics of intraductal carcinoma detected in prostate biopsies: a prospective cohort study. *Histopathology* 2013; DOI: 10.1111/his.12198

Chapter in an edited book

Dardick I. Histogenesis and morphogenesis of salivary gland neoplasms. In Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR eds. *Surgical pathology of the salivary glands*. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1991; 108-128.

Chapter in a book

Ellis GL, Auclair PL. Tumours of the salivary glands. In *Atlas of tumour pathology*, 3rd edn. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1996; 39-143.

Entry in a database

Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. Johns Hopkins University. Record No. 191170. Tumour Protein p53; TP53; [Accessed February 14, 2010]: Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=191170>

Tables

Each table should be on a separate page; use landscape orientation only if necessary. Tables should not be provided as photographic images or within graphics. Figures and illustrations must not be included or embedded into the document but uploaded as separate files.

Type each table on a separate page at the end of the main document. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Any explanatory matter should be included in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean. Make sure that each table is cited in the text. If you use data from another published source, obtain permission and acknowledge fully.

Legends

Legends for tables, figures and other illustrations should be provided in the main manuscript. These should be clear and concise and not repeat material shown elsewhere in the Results section. Tables, figures and other illustrations must be clearly referred to in the text of the manuscript.

Type legends for illustrations starting on a separate page with Arabic numerals corresponding to the illustrations. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend. The magnification for light micrographs is not required although internal scale markers can be incorporated. Indicate the type of stain used only if it is other than haematoxylin and eosin.

Figures

Figures must be at the appropriate size and resolution. Figures and illustrations must not be included or embedded into the document but uploaded as separate files. Figures should be numbered consecutively according to the order in which they have been first cited in the text.

If a figure has been published, acknowledge the original source and written permission from the copyright holder to reproduce the material must be supplied. Permission is required irrespective of authorship or publisher except for documents in the public domain. Permission should be requested using the official Permission Request Form. If photographs of people are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph (see above).

Figures should be professionally drawn, photographed and digitised; freehand or typewritten lettering is unacceptable. Letters, numbers and symbols should be clear and even throughout and of sufficient size that when reduced for publication each item will still be legible. Shading and hatches should be used with care and consideration of the final size of the image be made.

• Figure Format

- Figures should be prepared to fit either one or two column widths (83 mm and 170.5 mm respectively) with a maximum height of 251.5 mm at the correct resolution:

Black and white and colour images – 300 dpi

Graphs, drawings, etc – 800 dpi preferred; 600 dpi minimum

Combinations of photos and drawings (black and white and colour) – 500 dpi

- Images included in online submissions are for review purposes only, and should be suitable for online viewing. Please provide best quality figures with final accepted manuscripts. Digital files in accordance with our instructions at <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp> can be used by production. EPS (illustrations, graphs, annotated artwork; minimum resolution 800 dpi) and TIFF (micrographs, photographs; minimum resolutions 300 dpi) are recommended, although in some cases other formats can be used. Files should be at print size.

• Colour images

- Colour Figures are reproduced in print at the following rates:

1st and 2nd Figures: Free (includes 'Correspondence' papers)

All subsequent figures: £60 each

- All colour figures online are free

- If you would like more than two figures to appear in colour in print, Wiley-Blackwell require you to complete and return a [Colour Work Agreement form](#) before your paper can be published. An original hard copy form sent by post is required to process payment for colour in print. Hard copy forms can be sent by mail to Customer Services (OPI), John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre, New Era Estate, Oldlands Way, Bognor Regis, West Sussex, PO22 9NQ.

Graphs

In preparing graphs ensure that appropriate formats are used (histogram, points, box and whisker etc) with error bars wherever possible. Ensure that lines and axes are of a width that will be easily seen and the texts and data points are similarly of an appropriate size. Avoid patterned or gradient in-fills in histograms.

English Checking Service for Authors in Asia (from non-English speaking countries)

A list of recommended English editing services is available for authors who want to have their paper checked and improved before submission. This list and further information on the service is available at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp Please note that this is an optional service paid for by the author.

Submission of a revised version

Once authors have completed the revisions to their manuscript, they can only submit it by logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/histo> and entering their Author Centre, where they will find the manuscript listed under "Manuscripts with Decisions". Under "Actions" click on "Create a Revision". The manuscript number will then be appended with an 'R' to denote that it is a revised version

When submitting a revised manuscript, it is essential that authors include a 'point-by-point' response to the comments made by the reviewer(s) in the space provided, detailing the changes made. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in responses to the reviewer(s).

IMPORTANT: Authors must delete any original files from the manuscript submission that are being replaced by revised files, and ensure that the files are in the correct order.

Post-acceptance procedures

Accepted Articles

These are peer reviewed articles that have been accepted for publication in *Histopathology* and are currently being copy-edited and typeset. They will appear on the journal website on the "Accepted Articles" page as a PDF of the edited manuscript and will have a DOI (digital object identifier). Subsequently the full articles will appear on Early View in a matter of weeks, after proofing by the authors.

Early View

Early View is Wiley-Blackwell's exclusive service presenting individual articles online as soon as they are ready before the release of the compiled print issue. Early View articles are complete, citable and are published in an average time of eight weeks from acceptance.

Proofs

Proofs in PDF format will be made available for download by the corresponding author for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within three days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue.

A complimentary PDF offprint of the final paper will be provided to the author who checked the proofs, unless otherwise indicated. Hard copy reprints (minimum order 50, up to 300 copies) may be ordered online: <http://offprint.cosprinters.com/blackwell> and hard copies of a chosen issue can be ordered from Customer Services (cs-journals@wiley.com), please remember to provide full details of the journal name and which issue (i.e. volume and issue number) you require.

Should you have a query relating to manuscripts that have been accepted for publication, please contact the Production Editor whose contact details are as follows:

Arjane Amponin
E-mail: HIS@wiley.com

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Copyright Information

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services, where they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license

supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit:
<http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

Anexo C Recibo de submissão do Artigo 1 ao periódico Histopathology

Histopathology



Impact of tumour-associated macrophage (TAM) in tumour microenvironment as prognostic markers in breast cancer

Journal:	<i>Histopathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Labre, Luciana; Universidade Federal de Goias Instituto de Patologia Tropical e Saude Publica, Saddi, Vera Aparecida; Tumor Biology and Bone Marrow Transplant Laboratory, Araújo Jorge Hospital, Fight Cancer Association in Goiás, Goiânia, GO, Brazil Paes, Juliana; Program in Health Sciences, College of Medicine, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil Amaral, Nathália; Program in Health Sciences, College of Medicine, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil Enocência, Jéssica; Onco genetics and Radiobiology Laboratory, Araújo Jorge Hospital, Fight Cancer Association in Goiás, Goiânia, GO, Brazil Vilanova-Costa, César Augusto; Tumor Biology and Bone Marrow Transplant Laboratory, Araújo Jorge Hospital, Fight Cancer Association in Goiás, Goiânia, GO, Brazil Aquino, Érika; Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goias, Goiânia, GO, Brazil Batista, Aline; Federal University of Goiás, Department of Oral Medicine (Oral Pathology) Rabelo-Santos, Sílvia Helena; Federal University of Goiás, UFG, School of Pharmacy
Keywords:	breast cancer, macrophages, biomarkers, CD68

SCHOLARONE™
Manuscripts

Published on behalf of the British Division of the International Academy of Pathology