

Infiltração por linfócitos TCD8+ e sua relação com a graduação tumoral em neoplasias primárias do sistema nervoso central.

Alessandra Laitart^{a,b}, Aline Costa^c, Bruno Matheus de Campos Facchin^c, Jean Costa Nunes, M.D., Ph.D.^{a,b,c,d}.

^aUniversidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Avenida Pedra Branca, Cidade Universitária Pedra Branca, Palhoça, Santa Catarina (SC), Brasil.

^bDivisão de Neuropatologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rua Professora Maria Flora Pausewang, Trindade, Florianópolis, SC, Brasil.

^cServiço de Anatomia Patológica, Hospital Universitário (HU), UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

^dNeurodiagnostic Brasil – Diagnósticos em Neuropatologia, Rua Santos Saraiva, Estreito, Florianópolis, SC, Brasil.

Informações de contato do autor:

Alessandra Laitart, ou Prof. Dr. Jean Costa Nunes, M.D., Ph.D., Divisão de Neuropatologia, Serviço de Anatomia Patológica, 1º andar, Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rua Professora Maria Flora Pausewang, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina (SC), Brasil, CEP: 88040-000; Telefone: 048991641334; Fax: 04837218045; E-mail: jeanmedic@hotmail.com.

Palavras-chave:

Glioma (glioma)

Imunoterapia (immunotherapy)

Leucócitos (leukocytes)

Linfócitos infiltrantes de tumor (tumor-infiltrating-lymphocytes)

Microambiente do tumor cerebral (brain tumor microenvironment)

Neoplasias do sistema nervoso central (central nervous system neoplasms)

Tumores cerebrais primários (primary brain tumors)

Título curto: Infiltração por linfócitos TCD8+ e sua relação com a graduação tumoral em neoplasias primárias do SNC.

Palavras no texto do artigo: 3184

Figuras: 1

Tabelas: 2

RESUMO

Objetivos

O conhecimento sobre o microambiente tumoral e a interação neoplásica com as células inflamatórias permanece pouco elucidado, apesar dos recentes estudos sobre imunoterapias no tratamento de neoplasias primárias. Neste estudo, investigamos a existência da associação entre a resposta linfocitária e a atividade proliferativa em neoplasias primárias do SNC. Também foi investigada a relação entre a concentração linfocitária tecidual entre as diferentes categorias da classificação da OMS.

Métodos

Foram avaliados 80 casos classificados como neoplasias primárias do SNC, oriundos de centro de referência e diagnosticados entre 2011 e 2015. Foram obtidas as concentrações teciduais de TILs CD45⁺, CD8⁺ e CD20⁺ e os marcadores de atividade proliferativa foram estimados pelo marcador Mib-1 (Ki67) e pela atividade mitótica. A densidade vascular e graduação tumoral também foram analisadas.

Resultados

Não foi encontrada associação entre os marcadores de proliferação e a concentração de TILs CD45⁺, CD20⁺ e CD8⁺. Foram observadas distintas concentrações de TILs CD8⁺ entre os tumores dos graus I e III, sendo menor nos tumores de alto grau. Houve uma maior concentração vascular em graus tumorais elevados. Não foram observadas diferenças entre TILs CD45⁺ e CD20⁺ nas diferentes categorias da classificação da OMS.

Conclusão

Neste estudo foi encontrada uma diferença significativa entre a concentração de TCD8⁺ nas categorias da classificação da OMS. Embora a relevância clínica deste achado permaneça obscura, evidências científicas atuais sugerem estreitas relações entre o sistema imune e tumores primários do SNC; entretanto, novos estudos serão necessários para elucidação dos mecanismos subjacentes e inferências sobre implicações prognósticas e terapêuticas.

Abreviações:

CGA: campos de grande aumento

H&E: hematoxilina e eosina

SAP/HU-UFSC: Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Polydoro

Ernani de São Thiago

OMS: organização mundial da saúde

SNC: sistema nervoso central

TAM: macrófagos associados a tumores

TILs: linfócitos infiltrantes de tumor

TPSNC: tumores primários do sistema nervoso central

INTRODUÇÃO

Os tumores primários do sistema nervoso central (TPSNC) são neoplasias pouco incidentes [1], no entanto possuem elevados índices de morbidade e mortalidade [2]. Sua sobrevida em 5 anos é uma das menores entre os diversos tipos de câncer [3] e, nas crianças, as neoplasias cerebrais malignas são a causa mais comum de morte por tumores sólidos [4]. Frequentemente causam sequelas neurológicas, sobrecarregando tanto as famílias quanto os sistemas de saúde [5].

Desde 1979 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publica a Classificação dos Tumores Primários do sistema nervoso central (SNC), graduando-os histologicamente em quatro categorias (I, II, III e IV). As variáveis grau nuclear de atipia, diferenciação celular, número de mitoses, presença de necrose ou proliferação microvascular e características moleculares são critérios utilizados na tentativa de prever seu comportamento biológico e individualizar o tratamento desses pacientes [6,7]. O meningioma (grau I) é o tipo histológico mais frequente e geralmente possui bom prognóstico; no entanto, o glioblastoma (grau IV) é o subtipo histológico mais agressivo [8] e possui uma sobrevida média de 14 meses [9]. As terapias convencionais atualmente utilizadas no tratamento desses tumores são cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, isoladas ou associadas [9]. Apesar disso, mesmo os tumores que possuem comportamento benigno ou menos agressivo podem ser fatais, quando não passíveis de excisão ou irradiação [10].

Na tentativa de minimizar danos e aumentar a sobrevida livre de doença, terapias alternativas que visam superar a barreira hematoencefálica, suprimir células imunes inibitórias e inibir os mediadores imunossupressores têm ganhado grande destaque, pois representam um desafio às estratégias terapêuticas clássicas [11,12]. Isto inclui as terapias direcionadas, como drogas anti-angiogênicas e diversas formas de imunoterapia. Vacinas, transferência adotiva de células e inibidores do *checkpoint* evoluíram lentamente ao longo de décadas e, atualmente, são clinicamente aplicáveis em vários tipos de câncer, como melanoma metastático [13], câncer pulmonar não-pequenas células [14], carcinoma de células renais e câncer de próstata [15]. Dessa forma, sabe-se que o sistema imune pode ser utilizado como uma ferramenta promissora, tanto para a erradicação das células tumorais como para a prevenção de recorrências através da memória imunológica [16]. Entretanto, a elaboração de terapias imunológicas depende do conhecimento detalhado sobre a resposta imunológica tumoral, bem como os seus mecanismos de proliferação celular e escape imunológico [17,18].

Durante décadas o SNC foi considerado um órgão imunoprivilegiado, mas esse

conceito perdeu força quando foi descoberta a existência de uma vasculatura linfática funcional ao longo dos seios durais em camundongos [19]; além da evidência de que antígenos provenientes do SNC induziram uma resposta imune em linfonodos cervicais [20]. Ao contrário do sangue periférico, no SNC as células T e monócitos são predominantes em relação aos neutrófilos e estão presentes no parênquima cerebral mesmo na ausência de inflamação ou infecção [16]. Essas células possivelmente atingem o SNC através do líquido cefalorraquidiano proveniente do plexo coroide, pelo espaço de Virchow-Robin dos vasos sanguíneos meníngeos, ou até mesmo diretamente ao parênquima através de vênulas pós-capilares [21]. O microambiente cerebral normal é imunossupressor, bem como alguns tumores cerebrais em estágios iniciais [22]. No entanto, certos subtipos histológicos exibem intensa infiltração por diferentes células imunes da circulação periférica, pois promovem a quebra da barreira hematoencefálica [23].

A estimativa da concentração de leucócitos e certas linhagens de linfócitos no tecido tumoral pode ser realizada através de marcadores imuno-histoquímicos. Os leucócitos e micróglia são evidenciados através do antígeno leucocitário comum (CD45⁺), que consiste em um grupo de glicoproteínas de alto peso molecular, expressas unicamente na superfície dessas células. Já o marcador CD8⁺ (“*cluster of differentiation 8*”) identifica os linfócitos T citotóxicos e o CD20⁺ (“*cluster of differentiation 20*”) os linfócitos B [24]. Para avaliar o grau de proliferação celular o marcador mais utilizado é o Mib-1/Ki67, cuja marcação nuclear indica a presença de replicação celular [25].

Este estudo objetivou investigar a associação entre a concentração tecidual de linfócitos CD8⁺ e CD20⁺ e os marcadores de atividade proliferativa estimados pelo marcador Mib-1 (Ki67) e pela atividade mitótica em neoplasias do SNC. Também foi investigada a existência de associação entre a concentração linfocitária tecidual e concentração vascular por área entre as diferentes categorias da classificação da OMS [6].

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse foi um estudo observacional do tipo transversal, realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (SAP/HU-UFSC), localizado na cidade de Florianópolis-SC, centro de referência em neuropatologia para análise de tumores do SNC.

O tamanho amostral foi estimado pelo teste de correlação com o intuito de investigar a associação entre a resposta inflamatória linfocitária e a atividade

proliferativa, com variável dependente e independente contínuas. Para tal finalidade foram utilizados os parâmetros erro $\alpha < 0,05$ e um erro β de 0,2. Considerando-se a inexistência de estudos prévios que se propuseram a investigar um questionamento similar, estabeleceu-se como parâmetro de correlação um $R \geq 0,4$ por se tratar da mínima diferença clinicamente relevante. Sendo assim, foi mensurada uma amostra de 75 pacientes, a qual foi adicionado um excedente de 10%, buscando compensar eventuais perdas.

Foram incluídos pacientes na faixa etária entre 0 a 80 anos, de ambos os sexos, diagnosticados com neoplasia primária do SNC pelo Serviço de Neuropatologia do HU-UFSC entre os anos de 2011 e 2015. Visando-se excluir fatores que pudessem interferir na mensuração da concentração linfocitária tecidual, foram excluídos do estudo pacientes portadores de comorbidades associadas a imunossupressão secundária (portadores do vírus da imunodeficiência humana, diabetes mellitus tipos 1 e 2, doenças imunológicas auto-imunes) ou indivíduos em uso de terapias imunossupressoras (uso de corticoides por mais de 6 meses, imunomoduladores, quimioterapia, radioterapia e transplante de medula óssea).

O processo de preparação das lâminas, realizado anteriormente no HU-UFSC para definição do diagnóstico, seguiu as seguintes etapas: os materiais nativos (tecido tumoral) foram fixados em formaldeído 4% e após um período variável de 12 a 48 horas, submetido a análise macroscópica. Após a seleção do material, foi realizado processamento do tecido tumoral em formaldeído 4%, meio alcoólico em concentrações crescentes, xilol e parafina líquida. Os cortes do tecido foram realizados com micrótomo (Leica RM2235), em secções de 3-5 micrômetros e montados em lâminas (Starfrost). A análise morfológica foi realizada inicialmente pela coloração de hematoxilina e eosina (H&E), através dos protocolos padrões internacionais. O estudo imuno-histoquímico dos espécimes foi realizado utilizando-se os marcadores CD45⁺ (DAKOM0701 1:400), CD8⁺ (DAKOM7103 1:100), CD20⁺ (DAKOM0751 1:400) e Mib-1/Ki67 (DAKOM7240 1:100). Previamente à diluição dos anticorpos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio e a reativação antigênica com calor. A gradação tumoral foi realizada anteriormente por um neuropatologista experiente, embasado nos critérios definidos pela OMS na 4ª Edição Revisada da Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso Central [6].

Os cadastros dos pacientes e as lâminas com colorações especiais foram obtidos através de uma busca no sistema de cadastros de material biológico recebido pelo

Serviço de Neuropatologia do HU-UFSC. As lâminas foram submetidas à nova análise, para obtenção das variáveis desejadas. O pesquisador responsável pelo estudo foi inserido por seis meses na rotina do laboratório de neuropatologia e recebeu treinamento para avaliação histopatológica de tumores primários do SNC, incluindo avaliações direcionadas para contagem de mitoses e vasos em campos de alta magnificação, além de aquisição de imagens representativas para análise das lâminas submetidas ao estudo imuno-histoquímico.

A mensuração da atividade proliferativa foi baseada na contagem média do número de mitoses e de células imunomarcadas pelo Mib-1 (Ki-67), ambas realizadas em 15 campos de grande aumento (CGA). A resposta inflamatória linfocitária foi estimada através da contagem média de células imunomarcadas em 15 CGA pelos marcadores CD45⁺, CD20⁺ e CD8⁺.

As imagens obtidas para realização das contagens do número de mitoses e vasos foi feita através da análise da lâmina corada pelo H&E, utilizando-se o microscópio óptico (Nikon ECLIPSE Ni Y-THM com uma câmera de DS-Fi1c, 400X). Nesses casos, foi realizada a contagem não-automatizada. O mesmo microscópio com magnificação de 400x foi utilizado para obter imagens das lâminas imunomarcadas com Mib-1 (Ki-67), CD45⁺, CD8⁺ e CD20⁺. Entretanto, imagens contendo contagens superiores a 20 células marcadas por CGA, foram exportadas para o *Software Image Pro Plus (versão 6)* para a realização dessas estimativas com maior exatidão. Todos os dados obtidos foram expressos em forma de média e desvio padrão. As variáveis independentes utilizadas foram as demográficas (sexo e idade) e as características tumorais (grau histológico; densidade vascular; imunorreatividade ao CD45⁺, CD8⁺ e CD20⁺).

A tabulação e análise dos dados foi realizada no programa SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences SPSS Version 20.0 [Computer Program]* Armonk, NY: IBM Corp;2011), através do qual as variáveis contínuas foram descritas sob a forma de média e desvio padrão e as variáveis categóricas sob forma de frequência relativa e absoluta. Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram utilizados para testar antecipadamente as variáveis contínuas; as paramétricas foram analisadas através do teste T de Student e as não-paramétricas pelo teste U de Mann-Whitney. A diferença entre as variáveis contínuas que possuíam mais que duas categorias, foi determinada através do teste ANOVA. Precedendo esse teste, com o intuito de verificar a homogeneidade da variância, foi realizado o teste de Levene, e nas situações em que esse teste resultou em níveis de significância menores que 0.05, os valores utilizados foram obtidos pelo teste

de Welch. A correlação entre as variáveis contínuas foi estimada através do R obtido pelos testes de correlação de Pearson, Spearman ou Tau-de-Kendall, de acordo com as características da distribuição da variável contínua. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0.05$, com os respectivos intervalos de confiança (95%).

RESULTADOS

Através da busca realizada no sistema de cadastros de material biológico do SAP/HU-UFSC, foram obtidos 90 casos de tumores primários do SNC datados entre os anos de 2011 e 2015, dos quais dez foram excluídos devido à ausência de estudo imunohistoquímico completo para avaliação ou insuficiência de material residual para realização dos testes propostos. Sendo assim, houve aproximadamente 6% de perdas em relação à amostra estimada de 85 pacientes.

As características gerais da amostra estão presentes na tabela 1. Entre os 80 participantes, predominou o sexo feminino (51.2%), a idade média foi de 43.6 anos (± 21), sendo que 50% apresentou idade superior a 50 anos. Os tumores grau I consistiram em 46.3% dos casos, seguidos pelo grau IV, com uma representatividade de 20%.

O meningioma (32.5%) e o glioblastoma (17.5%) prevaleceram como subtipos histológicos mais frequentes, representando 50% da amostra. Os astrocitomas graus I, II e III, juntos, foram responsáveis por 26.3% dos tumores; restando apenas 23.9% para os seis subtipos histológicos menos frequentes (Figura 1).

A tabela 2 apresenta a distribuição dos graus tumorais de acordo com as faixas etárias, dentre as quais houve predomínio dos tumores de baixo grau; os tumores do grau I afetaram 50% dos pacientes com idade inferior à 20 anos, 46.4% entre 20 e 50 anos e 45% daqueles com mais de 50 anos.

Através do teste ANOVA verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os graus tumorais e a contagem média de $CD45^+$ ($p=0.42$) e $CD20^+$ ($p=0.24$). No entanto, foi observada diferença entre a graduação tumoral e a contagem de $CD8^+$ ($p=0.04$), cuja significância foi atribuída à diferença existente entre os graus I e III ($p=0.03$), quando realizado o teste U de Mann-Whitney. Neste estudo, os tumores de alto grau apresentaram níveis de linfócitos $CD8^+$ menores, havendo diferença significativa entre os graus I e III. Também foi observada diferença entre a quantidade de vasos nos diferentes graus tumorais através do teste de Welch ($p < 0.01$), sendo que o aumento do grau esteve relacionado a um incremento na quantidade média de vasos por área.

Não foi encontrada correlação entre a contagem de células marcadas pelo Mib-1/Ki67 e a contagem de CD45⁺, CD20⁺ e CD8⁺. A idade também não teve correlação com esses marcadores. No entanto, foi evidenciada forte correlação entre o número de mitoses e a contagem de Mib-1/Ki-67 ($r = 0.8$) e observou-se uma correlação fraca entre a contagem de Mib-1/Ki-67 e o número de vasos ($r = 0.31$). Utilizando-se o teste U de Mann-Whitney, foi observada uma quantidade maior de vasos no sexo masculino ($p=0.03$).

Analisando somente os casos correspondentes a meningiomas grau I ($n = 21$), o teste de Spearman mostrou uma correlação entre a contagem de células marcadas pelo Mib-1/Ki-67 e a contagem de células CD8⁺ ($r = 0.53$). Além disso, houve uma correlação negativa entre o número de vasos e a contagem de células CD8⁺ ($r = -0.5$). O mesmo não foi observado para a contagem de células CD45⁺, que não mostraram correlação com mitoses, células marcadas pelo Ki-67 ou número de vasos.

DISCUSSÃO

A distribuição da amostra entre os diferentes graus tumorais, de acordo com sexo e idade, bem como a frequência dos subtipos histológicos, foi compatível com os dados obtidos no Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos entre os anos de 2007 e 2011 [8].

A correlação positiva observada entre a densidade vascular e os graus tumorais corrobora com os dados da literatura, sendo um dos critérios utilizados para distinguir tumores de alto e baixo grau [6,26]. Nos tumores de alto grau, como os astrocitomas anaplásicos e glioblastomas, sugere-se que a angiogênese observada se deva à hipóxia e ativação crônica do fator induzido por hipóxia, que gera uma maior produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); sendo a chave para o crescimento e desenvolvimento desses tumores [26], bem como um indicador prognóstico [27]. No presente estudo, o sexo masculino esteve associado à maior quantidade de vasos, um resultado não encontrado em outros trabalhos [27], devendo, portanto, ser analisado com cautela devido à grande representatividade dos homens dentre os tumores de alto grau (56.7%).

Neste estudo, os tumores de alto grau apresentaram níveis de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) CD8⁺ menores, havendo diferença significativa entre os graus I e III. Já os TILs CD20⁺ se demonstraram escassos ou ausentes, independentemente do grau tumoral. Os estudos que se propuseram a investigar a presença de linhagens celulares

inflamatórias em gliomas, comprovam que a presença de TILs é comumente reportada com média a moderada densidade [28], enquanto os linfócitos B estão ausentes ou em pequena quantidade [29]. Os TILs CD8⁺ estão em maior número quando comparados com os TILs CD4⁺ [30,31] e, recentemente, Han *et al* concluíram que, no glioblastoma, altos níveis de TILs CD4⁺ em combinação com baixos níveis de TILs CD8⁺ estão associados à um prognóstico desfavorável [32].

Estudos anteriores que analisaram a sobrevida de pacientes com câncer de mama [33], ovário [34] e câncer colorretal [35], relataram que TILs CD8⁺ possuem efeitos favoráveis na sobrevivência desses pacientes. Metástases em SNC possuem grande quantidade de TILs, particularmente o melanoma, neoplasias pulmonares e neoplasias de células renais; nesses casos, a maior densidade de infiltrado linfocitário está relacionada a uma maior sobrevida livre de doença. Já nos gliomas e linfomas primários de SNC, ainda não foi possível verificar se existe um papel prognóstico da infiltração por células imunes devido a limitações nos trabalhos que buscaram essa correlação, como pequeno tamanho amostral e amostras com populações heterogêneas [24]. Além disso, o número total de TILs nos gliomas é mais baixo que nos tumores citados, provavelmente pela barreira hemato-encefálica limitar o fluxo de células imunológicas periféricas [32].

Nos meningiomas, a correlação positiva observada entre o número de células imunomarcadas pelo Mib-1/Ki67 e a quantidade de TILs CD8⁺ deve ser analisada com cautela devido a amostra restrita de casos analisados. Dados encontrados na literatura sugerem que o infiltrado linfocítico seja maior nos casos mais malignos e recorrentes [36,37], corroborando com o dado encontrado no presente estudo. Em contrapartida, outros trabalhos relataram uma diminuição da densidade de linfócitos com o aumento do grau tumoral [38,39]. Sendo assim, a carência de estudos que tenham investigado o papel prognóstico das células inflamatórias nesse tipo tumoral ainda não permite que correlacionemos o seu curso clínico com o infiltrado inflamatório [24].

Embora a contagem de células CD45⁺ não tenha mostrado correlação com a graduação tumoral, número de vasos, marcação pelo Mib-1/Ki67 e quantidade de mitoses nesse estudo, em 1999, Nishie *et al* demonstraram correlação existente entre a densidade vascular e a infiltração pela micróglia/macrófagos nos gliomas; algo que ocorre devido à expressão de fatores pró-angiogênicos por estas linhagens celulares [40]. Recentemente, favorecendo esse achado, Brandenburg *et al* concluíram que a depleção das células da micróglia/macrófagos reduz a vascularização e, conseqüentemente, o volume tumoral [41]. Em outros tumores como o câncer de mama [42], melanoma maligno uveal [43],

carcinoma de células escamosas esofágico [44], carcinoma vesical [45] e de próstata [46], o aumento na quantidade de macrófagos associados a tumores (TAM) também é correlacionado com uma maior proliferação vascular [47]. Sabe-se então, que a densidade da infiltração por micróglia/macrófagos nos gliomas tende a aumentar quanto maior o grau tumoral [48].

Para uma melhor interpretação dos resultados apresentados, é importante ressaltar que esse estudo foi realizado em um hospital de referência para a análise de tumores do SNC, podendo assim ter selecionado casos de maior gravidade. Além disso, algumas amostras de tecido tumoral foram obtidas através de biópsia estereotáxica, não sendo possível avaliar todas as partes da neoplasia nesses casos. Outras limitações foram a preparação das lâminas em dias diferentes e a análise retrospectiva de grande parte dessas. Devido ao desenho do estudo, não foi possível avaliar o prognóstico dos pacientes, impossibilitando inferências entre o infiltrado inflamatório e a sobrevida.

Portanto, conclui-se que os tumores primários do SNC possuem uma proporção substancial e variada de células inflamatórias. Neste estudo, não foi encontrada associação entre os marcadores de atividade proliferativa e a concentração tecidual de TILs CD45⁺, CD20⁺ e CD8⁺. Embora a relevância clínica desses achados não esteja clara, neste estudo foram observadas distintas concentrações de TILs CD8⁺ entre os tumores dos graus I e III, sendo menor nos tumores de alto grau. Em acordo com a literatura vigente, foi visualizada uma maior concentração vascular em graus tumorais mais elevados. Neste estudo não foram observadas diferenças significativas entre a quantidade de TILs CD45⁺ e CD20⁺ nas diferentes categorias da classificação da OMS. As evidências científicas atuais sugerem estreitas relações entre o sistema imune e os tumores primários do SNC; entretanto, novos estudos serão necessários para elucidação dos mecanismos subjacentes e inferências sobre implicações prognósticas e terapêuticas.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

AL foi responsável pelo desenho do estudo, coleta, tabulação e análise dos dados e redação do primeiro rascunho e revisões. AC realizou a montagem e coloração das lâminas. BMCF realizou os cortes histológicos tumorais e montou as lâminas. JCN desenhou o estudo, analisou os dados e participou das revisões do manuscrito. Todos os autores leram minuciosamente o artigo.

APROVAÇÃO ÉTICA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HU-UFSC e Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), conforme parecer nº 1.901.928 CAAE: 63690817.5.0000.5369, e foi conduzido de acordo com os princípios do Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinque, 1964) e suas alterações posteriores. Todos os pacientes foram incluídos no estudo após terem dado seu consentimento informado. Aos pacientes menores de 18 anos foi aplicado um termo de assentimento, além de um termo de consentimento, assinado pelos pais ou responsável legal do menor.

DECLARAÇÃO DE INTERESSES E FINANCIAMENTOS

Os autores declaram ausência de conflito de interesses e financiamentos externos. Os custos envolvidos com a realização deste trabalho foram de inteira responsabilidade dos autores.

TABELAS, FIGURAS E LEGENDAS

TABELA 1. Variáveis sociodemográficas dos pacientes diagnosticados com tumores primários do SNC através do serviço de Neuropatologia do SAP/HU-UFSC.

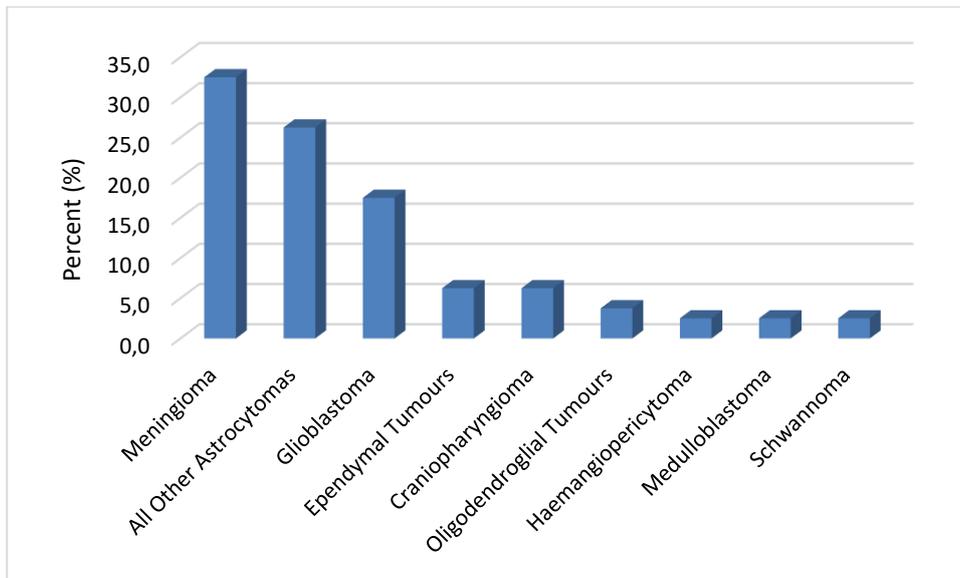
<i>Variáveis</i>	<i>Todos os pacientes n = 80 (%)</i>
<i>Sexo</i>	
<i>Feminino</i>	41 (51.2)
<i>Masculino</i>	39 (48.8)
<i>Idade (anos)</i>	
	43.6 ^a
<i>0 – 19</i>	12 (15)
<i>20 – 50</i>	28 (35)
<i>> 50</i>	40 (50)
<i>Grau tumoral (OMS)</i>	
<i>Grau I</i>	37 (46.3)
<i>Grau II</i>	13 (16.3)
<i>Grau III</i>	14 (17.5)
<i>Grau IV</i>	16 (20)

^aMédia de idade da amostra, em anos.

TABELA 2. Distribuição dos graus tumorais de acordo com as faixas etárias.

	<i>0 – 19 anos</i>	<i>20 – 50 anos</i>	<i>> 50 anos</i>	<i>Total</i>
	<i>n = 12 (%)</i>	<i>n = 28 (%)</i>	<i>n = 40 (%)</i>	<i>n = 80 (%)</i>
<i>Baixo Grau</i>	7 (58.3)	18 (64.3)	25 (62.5)	50 (62.5)
<i>Grau I</i>	6 (50)	13 (46.4)	18 (45)	37 (46.2)
<i>Grau II</i>	1 (8.3)	5 (17.9)	7 (17.5)	13 (16.2)
<i>Alto Grau</i>	5 (41.7)	10 (35.7)	15 (37.5)	30 (37.5)
<i>Grau III</i>	2 (16.7)	4 (14.3)	8 (20)	14 (17.5)
<i>Grau IV</i>	3 (25)	6 (21.4)	7 (17.5)	16 (20)

FIGURA 1. Distribuição dos tumores primários do SNC por grupos histológicos.



REFERÊNCIAS

1. de Robles P, Fiest KM, Frolkis AD, Pringsheim T, Atta C, St Germaine-Smith C, et al. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuro Oncol* 2015; 17(6): 776-83.
2. Darlix A, Zouaoui S, Rigau V, Bessaoud F, Figarella-Branger D, Mathieu-Daudé H, et al. Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study. *J Neurooncol* 2017; 131(3): 525-46.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(1): 5-29.
4. Sayour EJ, Mitchell DA. Immunotherapy for pediatric brain tumors. *Brain Sci* 2017; 7(10): 137.
5. Lacy J, Saadati H, Yu JB. Complications of brain tumors and their treatment. *Hemat Oncol Clin North Am* 2012; 26(4): 779-96.
6. Louis DN, Ohgaki H, Wietsler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4. ed rev. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
7. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 803-20.
8. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro Oncol* 2014; 16 Suppl 4: iv1-63.
9. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol* 2016; 18(11): 1062-71.
10. Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(10): 1271-86.
11. Mildenerger I, Bunse L, Ochs K, Platten M. The promises of immunotherapy in gliomas. *Curr Opin Neurol* 2017; 30(6): 650-8.
12. Wang Z, Sun H, Yakisich JS. Overcoming the blood-brain barrier for chemotherapy: limitations, challenges and rising problems. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14(8): 1085-93.
13. Kee D, McArthur G. Immunotherapy of melanoma. *Eur J Surg Oncol* 2017; 43(3): 594-603.
14. Naylor EC, Desani JK, Chung PK. Targeted therapy and immunotherapy for lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2016; 25(3): 601-9.

15. Botta GP, Granowicz E, Constantini C. Advances on immunotherapy in genitourinary and renal cell carcinoma. *Transl Cancer Res* 2017; 6(1): 17-29.
16. Liebelt BD, Finocchiaro G, Heimberger AB. Principles of immunotherapy. *Handb Clin Neurol* 2016; 134: 163-81.
17. Albesiano E, Han JE, Lim M. Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg Clin N Am* 2010; 21(1): 17-29.
18. Rolle CE, Sengupta S, Lesniak MS. Mechanisms of immune evasion by gliomas. *Adv Exp Med Biol* 2012; 746: 53-76.
19. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015; 523(7560): 337-41.
20. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the mechanisms of CNS immune privilege. *Trends Immunol* 2015; 36(10): 569-77.
21. Ousman SS, Kubes P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci* 2012; 15(8): 1096-101.
22. Quail DF, Joyce JA. The microenvironmental landscape of brain tumors. *Cancer Cell* 2017; 31(3): 326-41.
23. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788(4): 842-57.
24. Bieńkowski M, Preusser M. Prognostic role of tumour-infiltrating inflammatory cells in brain tumors: literature review. *Curr Opin Neurol* 2015; 28(6): 647-58.
25. Sawhney N, Hall PA. Ki67--structure, function and new antibodies. *J Pathol* 1992; 168(2): 161-2.
26. Argyriou AA, Giannopoulou E, Kalofonos HP. Angiogenesis and anti-angiogenic molecularly targeted therapies in malignant gliomas. *Oncology* 2009; 77: 1-11.
27. Leon SP, Folkerth RD, Black PM. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* 1996; 77(2): 362-72.
28. Gieryng A, Pszczolkowska D, Walentynowicz KA, Rajan WD, Kaminska B. Immune microenvironment of gliomas. *Lab Invest* 2017; 97(5): 498-518.
29. Hewedi IH, Radwan NA, Shash LS, Elserry TH. Perspectives on the immunologic microenvironment of astrocytomas. *Cancer Manag Res* 2013; 5: 293-9.
30. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, Rajky O, Ricken G, Wöhrer A, et al. Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2015; 17(8): 1064-75.

31. Giometto B, Bozza F, Faresin F, Alessio L, Mingrino S, Tavolato B. Immune infiltrates and cytokines in gliomas. *Acta Neurochir* 1996; 138(1): 50-6.
32. Han S, Zhang C, Li Q, Dong J, Liu Y, Huang Y, et al. Tumour-infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma. *Br J Cancer* 2014; 110(10): 2560-8.
33. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8⁺ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(15): 1949-55.
34. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(51): 18538-43.
35. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(35): 5944-51.
36. Becker I, Roggendorf W. Immunohistological investigation of mononuclear cell infiltrates in meningiomas. *Acta Neuropathol* 1989; 79(2): 211-6.
37. Ding Y, Qiu L, Xu Q, Song L, Yang S, Yang T. Relationships between tumor microenvironment and clinicopathological parameters in meningioma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(10): 6973-9.
38. Roessler K, Dietrich W, Kitz K. Expression of BCL-2 oncoprotein on tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in meningiomas. *Neurosurg Rev* 1999; 22(4): 205-9.
39. Du Z, Abedalthagafi M, Aizer AA, McHenry AR, Sun HH, Bray MA, et al. Increased expression of the immune modulatory molecule PD-L1 (CD274) in anaplastic meningioma. *Oncotarget* 2015; 6(7): 4704-16.
40. Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5(5): 1107-13.
41. Brandenburg S, Müller A, Turkowski K, Radev YT, Rot S, Schmidt C, et al. Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors. *Acta Neuropathol* 2016; 131(3): 365-78.
42. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(20): 4625-9.

43. Mäkitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68(+) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(7): 1414-21.
44. Koide N, Nishio A, Sato T, Sugiyama A, Miyagawa S. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(9): 1667-74.
45. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N, Nomura Y. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *Int J Urol* 2000; 7(7): 263-9.
46. Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol* 2000; 17(3): 445-51.
47. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 2006; 66(2): 605-12.
48. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 2008; 216(1): 15-24.