

Cátia Sofia Maltez Neto

Avaliação da expressão de PD-L1 e de subpopulações linfocitárias em Cancro da Mama



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2018

Cátia Sofia Maltez Neto

Avaliação da expressão do PD-L1 e de subpopulações linfocitárias em Cancro da Mama

Mestrado de Oncobiologia- Mecanismos Moleculares do Cancro

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Dr^a Sofia Azambuja Braga

Dr^a Paula Borrallho



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2018

Declaração de autoria de Trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2018

Cátia Sofia Maltez Neto

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Dr^a Sofia Loureiro dos Santos e ao Hospital de Vila Franca de Xira por terem aceite a realização deste trabalho e todo o apoio prestado ao longo do mesmo.

Quero também agradecer ao Dr Luis Ramos, diretor do serviço de cirurgia ceral do Hospital de Vila Franca de Xira, e à Dr^a Zita Seabra pela colaboração e disponibilidade demonstrada ao longo de todo o projeto.

Quero ainda agradecer à minha orientada, Dr^a Sofia Braga e à minha co-orientadora Dr^a Paula Borralho por toda a ajuda e empenho na realização deste projeto.

Por último, quero agradecer também ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Cuf Descobertas pela calorosa receção e toda ajuda prestada.

Resumo

O cancro da mama é atualmente o cancro mais comum entre as mulheres, com uma incidência anual de 14,9 milhões de novos casos no mundo e estima-se que esse valor continue a aumentar. Com o avanço da tecnologia têm existido melhorias significativas na taxa de sobrevivência dos doentes, provavelmente devido aos avanços nos tratamentos e à deteção precoce dos tumores com a melhoria dos programas de rastreio. Os subtipos de cancro da mama e a presença de *tumour infiltrating lymphocytes* (TILs), têm sido fatores importantes para o prognóstico e tratamento dos doentes. O ligando da proteína celular de morte programada 1 (PD-L1) tem sido também indicado como biomarcador preditivo de resposta ao tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de PD-L1 e das subpopulações linfocitárias CD3, CD4, CD8 e CD20 em doentes diagnosticadas com carcinoma da mama e relacionar com os respetivos dados clínico-patológicos. Foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para a escolha das doentes que possuíam TILs e recorremos à técnica de imunohistoquímica para uma avaliação da marcação linfocitária intratumoral e peritumoral das diferentes subpopulações linfocitárias. Foi possível concluir com este estudo que existem mais TILs na zona adjacente ao tumor do que no seu interior e que o PD-L1 está associado a tumores com graus mais agressivos. Conseguimos comprovar ainda que existiu uma maior marcação linfocitária nos subtipos RE positivo, Her2 negativo, ou seja nos subtipos de cancro da mama menos agressivos, e podemos assim concluir que uma maior marcação de TILs está correlacionada com um melhor prognóstico para a doente.

Palavras-chave: Cancro da mama, Imunohistoquímica, PD-L1, TILs

Abstract

Breast cancer is currently the most common cancer between women, with an annual incidence of 14.9 million of new cases in the world and with the tendency to keep increasing. With the advance of technology, significant improvements have been noticed in the survival rate of patients, probably due to the advanced treatments and the precocious detection of tumors with the improvement of screening programs. The subtypes of breast cancer and the presence of tumor infiltrating lymphocytes (TILs), have been important factors to the prognosis and patient treatment. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) has been also indicated as predictive biomarker of treatment response. This study objective was to evaluate the expression of PD-L1 and of the lymphocytes subpopulations CD3, CD4, CD8, and CD20 in patients diagnosed with breast carcinoma and relate it with the respective clinical-pathological data. The Flow Cytometry technique was used in patients that had TILs and we recurred to the immunohistochemistry technique to for an evaluation of the lymphocytic intratumoral and peritumoral marks of different lymphocytic subpopulations. It was possible to conclude with this study that exist more TILs in the adjacent area of the tumor than inside and that PD-L1 is associated to tumors with more aggressive grades. We were also able to prove that existed a larger lymphocytic mark in the subtypes RE positive, Her2 negative, which means in the less aggressive breast cancer subtypes. So we can conclude that a larger TILs marks is correlated with a better patient prognosis.

Keywords: Breast Cancer, Immunohistochemistry, PD-L1, TILs

Índice

Declaração de autoria de Trabalho	iii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas	xv
1- Fundamento Teórico	1
1.1- <i>Hallmarks of cancer</i>	1
1.2- O Cancro da Mama	3
1.2.1- Anatomia da Mama.....	3
1.2.2- O que é ?	4
1.2.3- Biomarcadores utilizados para diagnóstico	10
1.2.4- Tratamentos.....	12
1.2.5- Epidemiologia do Cancro da Mama	13
1.3- Sistema Imunitário e o Cancro	16
2-Objetivos	21
2.1- Objetivo Geral	21
2.2- Objetivos específicos	21
3-Metodologia	22
3.1- Comissão de Ética	22
3.2- Escolha das Amostras	22

3.3- Recolha das amostras- Laboratório de Macroscopia do Serviço de Anatomia Patológica.....	23
3.4- Tratamento das amostras- Laboratório de Histologia do Serviço de Anatomia Patológica.....	24
3.5- Tratamento das amostras- Laboratório de Imunohistoquímica do Serviço de Anatomia Patológica.....	26
3.6- Determinação do número de linfócitos nas amostras por Citometria de Fluxo	27
3.7- Determinação do nível de expressão dos linfócitos CD3, CD4, CD8 e CD20 e de PD-L1 nas amostras por Imunohistoquímica	28
4-Resultados	30
4.1- Características clinico-patológicas das doentes	30
4.2- Resultados Obtidos por citometria de fluxo.....	37
4.3- Resultados Obtidos pela técnica de imunohistoquímica para a marcação dos linfócitos CD3, CD4, CD8 e CD20	45
4.4- Resultados Obtidos pela técnica de imunohistoquímica para a marcação de PD-L1	53
4.5- Corelação entre os resultados obtidos por imunohistoquímica e citometria de fluxo.....	56
4.6- Corelação entre os resultados obtidos por imunohistoquímica e dados clínico-patológicos	58
4.6.1- Linfócitos/PD-L1 e o Grau histológico.....	58
4.6.2- Linfócitos/PD-L1 e o subtipo de cancro da mama.....	62
4.6.3- Linfócitos/PD-L1 e os gânglios linfáticos	67
4.6.4- Linfócitos/PD-L1 e o nível de expressão de Ki67	70
4.6.5- Linfócitos/PD-L1 e o Índice de massa corporal (IMC)	72
5-Discussão dos Resultados.....	76
6-Conclusão	79

7- Referências Bibliográficas	81
8- Anexos	86
8.1- Anexo I: <i>OptiView DAB Immunohistochemistry Detection Kit(60)</i>	86
8.2- Anexo II: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD3	87
8.3- Anexo III: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD4.....	87
8.4- Anexo IV: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD8.....	88
8.5- Anexo V: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD20.....	88

Índice de Figuras

Figura 1.1.1: <i>Hallmarks of cancer</i> no ano de 2000.....	1
Figura 1.1.2: Novos <i>Hallmarks of cancer</i> , no ano de 2011.....	2
Figura 1.2.1.1: Constituição da mama.....	3
Figura 1.2.1.2: Sistema linfático da mama.....	3
Figura 1.2.2.1: Fibroadenoma da mama.....	4
Figura 1.2.2.2: Metastização das células neoplásicas.....	5
Figura 1.2.2.3: Graus histológicos do tumor.....	6
Figura 1.2.2.4: Estadio 1 do Cancro da Mama.....	8
Figura 1.2.2.5: Estadio 2 do Cancro da Mama.....	9
Figura 1.2.2.6: Estadio 3 do Cancro da Mama.....	10
Figura 1.2.3.1: Recetores de Her2.....	11
Figura 1.2.5.1: Previsão da evolução da incidência de cancro em Portugal.....	13
Figura 1.2.5.2: Taxa de incidência do cancro da mama a nível mundial em 2012.....	14
Figura 1.2.5.3: Taxa de mortalidade por cancro da mama a nível mundial.....	15
Figura 1.3.1: Constituintes celulares dos diferentes tipos de imunidade.....	16
Figura 3.3.1: Forma de corte macroscópico das peças mamárias.....	23
Figura 3.4.1: Etapas do processo de inclusão.....	24
Figura 3.4.2: Processo de corte e de colocação dos cortes nas lâminas.....	25
Figura 4.2.1: <i>FlowJo</i> - seleção da gate para as células com tamanho superior a 50k para a amostra do componente unstained da doente 2.....	37
Figura 4.2.2: <i>FlowJo</i> - seleção da gate das Single Cells.....	38
Figura 4.2.3: : <i>Flow Jo</i> - Comparação das fluorescências da amostra do componente unstained e da amostra com o anticorpo para o CD3.....	39

Figura 4.2.4: <i>Flow Jo-</i> Comparação das fluorescências da amostra do componente unstained e da amostra com o anticorpo para o CD4.....	39
Figura 4.2.5: <i>Flow Jo-</i> Comparação das fluorescências da amostra do componente unstained e da amostra com o anticorpo para o CD8.....	40
Figura 4.3.1: Marcação imunohistoquímica de anti-CD3.....	49
Figura 4.3.2: Marcação peritumoral 3+ de anti-CD3.....	49
Figura 4.3.3: Marcação imunohistoquímica com anti-CD3 da doente 27.....	50
Figura 4.3.4: Padrão de marcação membranoso com o anticorpo anti-CD4 com uma classificação de marcação linfocitária intratumoral 2+.....	50
Figura 4.3.5: : Padrão de marcação membranoso com o anticorpo anti-CD4 com uma classificação de marcação linfocitária peritumoral 2+.....	51
Figura 4.3.6: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8.....	51
Figura 4.3.7: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD20.....	52
Figura 4.4.1: Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti- PD-L1 no teste de controlo positivo de placenta.....	55
Figura 4.4.2: Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-PD-L1.....	55
Figura 4.5.1: Comparação entre a percentagem de células CD3 obtida por citometria de fluxo com a marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD3.....	56
Figura 4.5.2: Comparação entre a percentagem de células CD4 obtida por citometria de fluxo com a marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD4.....	57
Figura 4.5.3: Comparação entre a percentagem de células CD8 obtida por citometria de fluxo com a marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8.....	57
Figura 4.6.1.1: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD3 em função do grau histológico do tumor.....	58
Figura 4.6.1.2: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD4 em função do grau histológico do tumor.....	59

Figura 4.6.1.3: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8 em função do grau histológico do tumor.....	60
Figura 4.6.1.4: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD20 em função do grau histológico do tumor.....	61
Figura 4.6.1.5: Marcação imunohistoquímica do anticorpo PD-L1 em função do grau histológico do tumor.....	61
Figura 4.6.2.1: Marcação com o anticorpo anti-CD3 por IHQ em função dos subtipos de cancro da mama: RE+, Her2+ e triplo negativo (TN).....	62
Figura 4.6.2.2: Marcação com o anticorpo anti-CD4 por IHQ em função dos subtipos de cancro da mama: RE+, Her2+ e triplo negativo (TN).....	63
Figura 4.6.2.3: Marcação com o anticorpo anti-CD8 por IHQ em função dos subtipos de cancro da mama: RE+, Her2+ e triplo negativo (TN).....	64
Figura 4.6.2.4: Marcação com o anticorpo anti-CD20 por IHQ em função dos subtipos de cancro da mama: RE+, Her2+ e triplo negativo (TN).....	65
Figura 4.6.2.5: Marcação com o anticorpo anti-PD-L1 por IHQ em função dos subtipos de cancro da mama: RE+, Her2+ e triplo negativo (TN).....	66
Figura 4.6.3.1: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD3 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos.....	67
Figura 4.6.3.2: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD4 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos.....	68
Figura 4.6.3.3: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos.....	68
Figura 4.6.3.4: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD20 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos.....	69
Figura 4.6.3.5: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-PD-L1 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos.....	69
Figura 4.6.4.1: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3.....	70

Figura 4.6.4.2: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD4-.....	70
Figura 4.6.4.3: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD8.....	71
Figura 4.6.4.4: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD20.....	71
Figura 4.6.4.5: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti-PD-L1.....	72
Figura 4.6.5.1: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ de CD3.....	73
Figura 4.6.5.2: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ de CD4.....	73
Figura 4.6.5.3: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ de CD8.....	74
Figura 4.6.5.4: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ de CD20.....	74
Figura 4.6.5.5: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ de PD-L1.....	75

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características clínico-patológicas das doentes utilizadas para o estudo. As doentes do HVFX com fundo azul, e do HCD com fundo laranja.....	30
Tabela 2: Percentagens dos linfócitos CD3, CD4 e CD8 apartir da citometria de fluxo das doentes utilizadas para o estudo.	40
Tabela 3: Marcação linfocitária obtida com a técnica de imunohistoquímica em 29 das doentes seleccionadas para o estudo.	45
Tabela 4: Marcação com o anticorpo anti-PD-L1 obtida com a técnica de imunohistoquímica em 27 das doentes seleccionadas para o estudo. As doentes 5, 6,9,19,21 e 22 foram excluídas da marcação com PD-L1.....	53

Lista de Abreviaturas

CC1 - Condicionador celular 1	LCIS - carcinoma lobular in situ
CC2 - Condicionador celular 2	LCS - Solução de cobertura
CD3 - <i>Cluster of Differentiation 3</i>	NACT - quimioterapia neoadjuvante
CDIS - carcinoma ductal in situ	PBS - Solução tampão de fosfato salino
Cedoc - Centro de Investigação de Doenças Crónicas	PD-1 - proteína celular de morte programada
CF - citometria de fluxo	pCR - resposta patológica completa
CTLA-4 - antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico	PD-L1 - ligando da proteína celular de morte programada
DAB - diaminobenzidina	RE - Recetor de estrogénio
EMT - transição epitélio mesênquima	ROS - espécies reativas de oxigénio
FISH - hibridização in situ por fluorescência	RP - Recetor de progesterona
FSC-A - forward scatter A	Ta - Linfócitos T auxiliares
Her2 - Recetor de fator de crescimento epidérmico humano 2	Tc - Linfócitos T Citotóxicos
HCD - Hospital Cuf Descobertas	Treg – Linfócitos T Reguladores
HTA - Hiper tensão arterial	THS - Terapia hormonal de substituição
HVFX - Hospital de Vila Franca de Xira	SSC-A - side scatter A
IMC - Índice de massa corporal	SSC - Tampão salino de citrato de sódio
IHQ - Imunohistoquímica	TILS - <i>tumour infiltrating lymphocytes</i>
	TN - triplo negativo

1- Fundamento Teórico

1.1- Hallmarks of cancer

Os mecanismos de reparação das células por vezes ficam comprometidos e não existem mecanismos de proteção contra as mutações, sendo estas transmitidas para a descendência (1) (2). As mutações que aparecem no organismo podem ocorrer a nível dos proto oncogenes e levam a um aumento da divisão celular, ou ao nível dos genes supressores de tumores e levam a uma diminuição dos mecanismos que impedem a divisão celular (3) (4).

Sendo o cancro uma doença muito heterogénea e que envolve várias mudanças a nível do genoma, no ano de 2000, *Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg* propuseram que quando as células atingem um estado neoplásico adquirem um conjunto de capacidades distintas. Criaram um conjunto de seis alterações moleculares, bioquímicas e celulares características das células neoplásicas, denominado *Hallmarks of cancer* (Figura 1.1.1) (5).

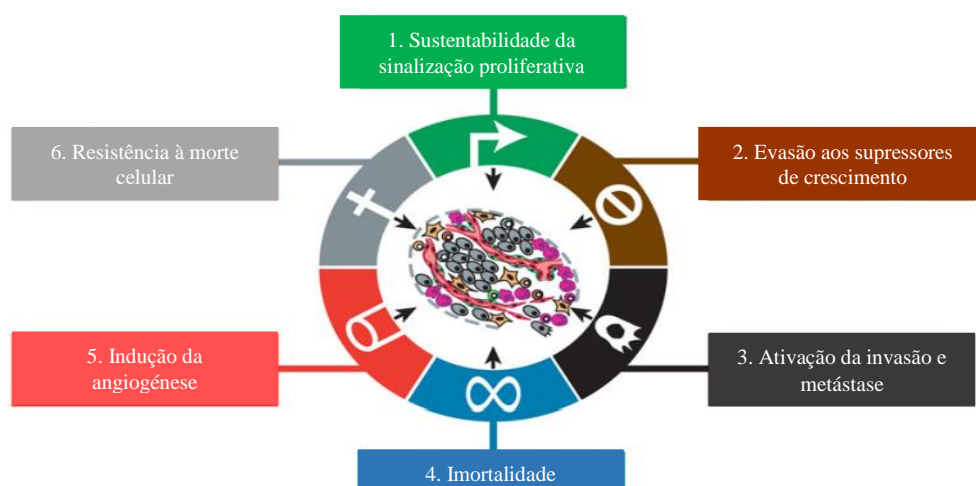


Figura 1.1.1: Hallmarks of cancer no ano de 2000. **1-Sustentabilidade da sinalização proliferativa:** as células neoplásicas têm a capacidade de desregular os sinais que mantêm a homeostase de uma célula normal levando à ativação dos oncogenes; **2- Evasão aos supressores de crescimento:** as células neoplásicas têm a capacidade de evadir os mecanismos que controlam a inibição da proliferação, levando à inativação dos genes supressores de tumor; **3- Ativação da invasão e metástase:** ocorrem alterações a nível das integrinas e ocorre a perda da Caderina-E, o que vai potencializar os fenótipos de invasão e metástase e permite a transição epitélio-mesénquima (EMT); **4- Imortalidade replicativa:** as células neoplásicas adquirem uma capacidade infinita de se dividirem devido à ativação da telomerase, DNA polimerase responsável por adicionar segmentos de repetição aos telómeros; **5- Indução da angiogénese:** para os tumores se desenvolverem estes requerem oxigénio e fatores angiogénicos, como por exemplo o VEGF, estão ativos nas células neoplásicas e induzem a proliferação celular e o crescimento de vasos sanguíneos; **6- Resistência à morte celular:** as células neoplásicas desenvolvem estratégias para limitar ou contornar os mecanismos de apoptose, sendo a principal a perda de função do supressor de tumor TP53, contribuindo para a capacidade das células se dividirem de uma forma descontrolada (2). (adaptado de <https://antisensescienceblog.wordpress.com/2014/07/17/hallmarks-of-cancer/>).

Mais tarde em 2011, com os avanços na ciência e na tecnologia, *Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg* atualizaram então os *Hallmarks of cancer* adicionando quatro características: instabilidade e mutação do genoma, inflamação promotora do tumor, reprogramação do metabolismo e evasão à destruição pelo sistema imunitário (Figura 1.1.2) (6).



Figura 1.1.2: Novos Hallmarks of cancer, no ano de 2011. 7- Reprogramação do metabolismo; 8- Evasão à destruição pelo sistema imune; 9- Inflamação promotora do tumor; 10- Instabilidade e mutação do genoma. (adaptado de Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation.).

As células tumorais conseguem reprogramar o seu metabolismo, uma vez que as células normais apenas realizam glicólise quando são sujeitas a condições anaeróbias enquanto que as células tumorais realizam sempre glicólise, mesmo na presença de oxigénio – Reprogamação do metabolismo (6).

Apesar do sistema imune ser responsável por reconhecer e eliminar as células tumorais, as células neoplásicas conseguem evitar a deteção pelo sistema imunológico e evitar assim a morte celular – Evasão à destruição pelo sistema imune. A maioria das células tumorais conseguem infiltrar-se com as células do sistema imune e libertam espécies reativas de oxigénio (ROS) que são ativamente mutagénicas e vão acelerar o processo tumoral – Inflamação promotora do tumor (6).

Esta progressão tumoral leva assim a alterações no genoma como por exemplo, ao aumento da sensibilidade a agentes mutagénicos e a erros nos mecanismos de reparação do DNA – Instabilidade e mutação do genoma (6).

1.2- O Cancro da Mama

1.2.1- Anatomia da Mama

A nível interno, a mama feminina adulta normal é constituída por uma mistura de elementos estromais e epiteliais. O estroma é composto principalmente por um conjunto de células adiposas denominado tecido adiposo, estendendo-se da clavícula até à axila e até a meio da caixa torácica, e por tecido conjuntivo fibroso, que vai rodear os ductos, os lóbulos, os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos (7)(2). Os elementos epiteliais estão organizados em lóbulos (glândulas produtoras de leite) e em ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos para o mamilo) (Figura 1.2.1.1) (7)(8).

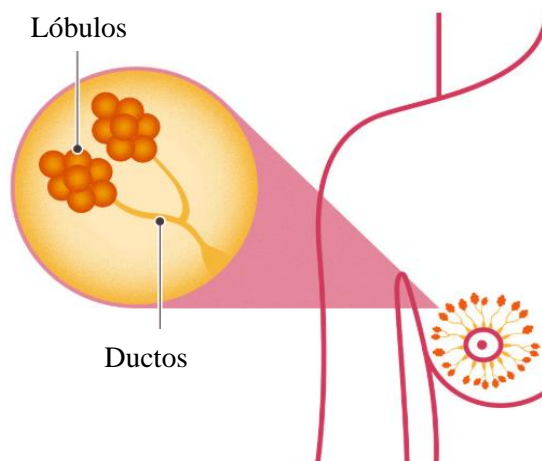


Figura 1.2.1.1: Constituição da mama: Constituição dos elementos epiteliais da mama. (retirado de <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>)

Na zona da mama, a irrigação é bastante rica de forma a garantir os nutrientes necessários para manter o órgão saudável. Nesta zona, a rede linfática é também muito rica e complexa.

O sistema linfático é umas das principais vias de metastização do cancro da mama e é constituído por uma rede de vasos linfáticos e gânglios linfáticos que percorre todo o corpo (Figura 1.2.1.2). Da mesma forma que o sistema circulatório do sangue distribui elementos por todo o corpo, o sistema linfático transporta células e fluidos importantes para o combate de doenças e infeções (8)(9). Os gânglios linfáticos estão fixados ao

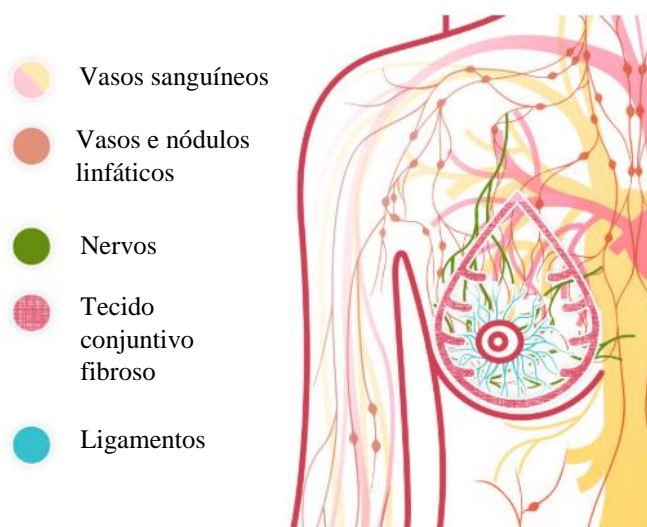


Figura 1.2.1.2: Sistema linfático da mama. (adaptado de <http://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>)

longo do sistema linfático e vão atuar como filtros, transportando células anormais para longe do tecido saudável.

As células do cancro da mama podem entrar nos vasos linfáticos e proliferar nos gânglios linfáticos. Se as células neoplásicas invadiram os gânglios linfáticos, há uma maior probabilidade de estas células entrarem na corrente sanguínea e se dessiminarem, através de metástases, para outros locais do corpo (8). No entanto, nem todas as mulheres com células neoplásicas nos gânglios linfáticos desenvolvem metástases e algumas mulheres podem não ter nenhuma célula cancerígena nos gânglios linfáticos e desenvolver mais tarde metástases (10) (11).

1.2.2- O que é ?

O cancro da mama é uma doença extremamente heterogênea e inicia-se quando existe um crescimento descontrolado de células no tecido mamário e formam um nódulo. Ocorre maioritariamente em mulheres devido à estrutura mamária mais complexa, ao maior volume e à alta sensibilidade às influências endócrinas, porém, em casos raros, também pode ocorrer nos homens (2) (4) (7) (8) (12) (13).

Grande parte dos tumores da mama são tumores benignos, ficando contidos dentro de uma área localizada, e apesar de não serem agressivos, podem continuar a crescer pressionando os outros órgãos e causar outros problemas. Um exemplo de um tumor benigno é o caso do fibroadenoma (Figura 1.2.2.1), onde ocorre um crescimento excessivo de tecido normal (estroma e epitélio ductal) com formação de um nódulo (2) (4) (7) (8) (12).

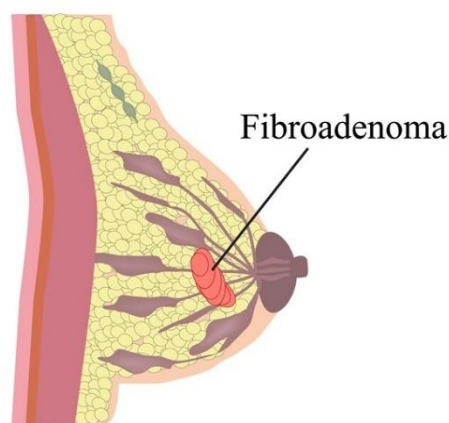


Figura 1.2.2.1: Fibroadenoma da mama- tumor contido numa área localizada Retirado de <https://www.news-medical.net/health/Fibroadenomas-of-the-Breast>

No entanto os tumores da mama também podem ser tumores malignos invadindo e danificando o tecido circundante. Alguns destes tumores podem torna-se tumores metastáticos quando as células neoplásicas se espalham para outras partes do corpo, geralmente através do sistema linfático, e formam um tumor secundário (Figura 1.2.2.2). Os principais locais de metastização do cancro da mama são inicialmente os gânglios linfáticos regionais e posteriormente para o osso, cérebro, fígado e pulmão (2) (4) (8) (12) (13).



Figura 1.2.2.2: Metastização das células neoplásicas e a formação de um tumor secundário. Retirado de (<https://www.nationalbreastcancer.org/breast-tumors>)

O tipo de cancro mais comum é denominado carcinoma e tem origem nas células de revestimento de um órgão ou sistema, ou seja, nas células epiteliais. Este tipo de cancro pode ser classificado em *in situ* ou invasivo. Os carcinomas podem ser divididos em categorias consoante a sua estrutura de origem: quando o carcinoma tem origem nos lóbulos denomina-se carcinoma lobular ou quando tem origem nos ductos mamários denomina-se carcinoma ductal (2) (4) (8) (12) (13) (14).

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é considerado não invasivo ou pré invasivo, onde células malignas vão substituir as células epiteliais que revestem os ductos, mas ainda não desenvolveram a capacidade de metastização e não invadem o tecido circundante, permanecendo dentro das paredes dos ductos. O CDIS pode ou não tornar-se num carcinoma invasivo. Atualmente, o carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de cancro da mama, onde as células neoplásicas têm a capacidade de invadir através da parede do ducto mamário e desenvolverem-se no estroma da mama, ficando assim com capacidade para invadir vasos e metastizar através do sistema linfático ou da corrente sanguínea (2) (15) (4) (12) (13) (14).

O carcinoma lobular *in situ* (LCIS) corresponde ao crescimento de células neoplásicas dentro dos lóbulos da mama. Em condições normais, histologicamente, os lóbulos parecem estruturas vazias e quando aparece um aglomerado de células confinado

ao interior dos lóbulos, estamos perante um carcinoma lobular *in situ* (LCIS) (4) (12) (13) (14).

Os cancros da mama são ainda classificados com base no seu grau de diferenciação, de acordo com o aspeto microscópico e com o quanto se assemelham às células normais da mama, ou seja, o seu grau histológico. A classificação do tumor é realizada com base numa escala indicando o nível de agressividade das células neoplásicas (Figura 1.2.2.3):

- Grau 1 (baixo grau): as células neoplásicas assemelham-se mais com as células normais do tecido mamário classificando-se como bem diferenciadas e com um crescimento mais lento.

- Grau 2 (grau intermédio): as células neoplásicas são moderadamente diferenciadas.

- Grau 3 (alto grau): as células neoplásicas sofreram mais alterações e possuem um aspeto muito diferente das células normais da mama, classificando-se como pouco diferenciadas e com um crescimento mais rápido (2) (12) (13).

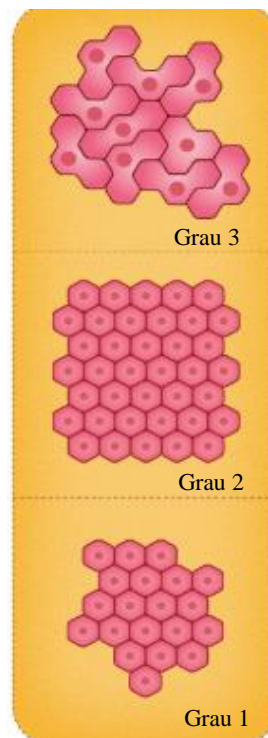


Figura 1.2.2.3: Graus histológicos do tumor: Grau 1- bem diferenciado; Grau 2- moderadamente diferenciado; Grau 3- pouco diferenciado. (retirado de <https://www.nationalbreastcancer.org/bresst-tumors>)

Geralmente, tumores com menor grau têm uma maior taxa de remissão completa, no entanto, há tumores com graus elevados e mais agressivos que têm remissão completa após o tratamento com quimioterapia (2).

Sabe-se que o cancro se origina quando o DNA de uma célula sofre uma mutação e fica danificado, no entanto, o porquê e o como esse DNA fica danificado são ainda desconhecidos. Foram então estabelecidos alguns fatores de risco para o cancro da mama que podem ser divididos em fatores genéticos, fatores ambientais ou fatores de estilo de vida:

○ Género: ser mulher é o maior fator de risco de cancro da mama visto que o cancro da mama ocorre 100 vezes mais em mulheres do que em homens (2) (16) (12).

- Idade: o cancro da mama é frequentemente diagnosticado em mulheres em torno da idade da menopausa (mais de 55 anos). A taxa de incidência é significativamente menos frequente em mulheres com menos de 45 anos (2) (16) (17).
- Raça: o cancro da mama é diagnosticado com mais frequência em mulheres caucasianas do que em mulheres de outras raças (2) (16) (17).
- História familiar: o risco de uma mulher ser diagnosticada com cancro da mama no futuro é maior se houver cancro da mama na história familiar, ou seja, se a mãe, a tia ou irmã tiverem cancro da mama, especialmente em idades antes dos 40 anos (2) (16) (12).
- Antecedentes pessoais: se foi diagnosticado cancro da mama numa das mamas, há uma maior probabilidade de aparecer cancro da mama homolateral ou contralateral no futuro (2).
- História menstrual e reprodutiva: (1) uma menarca precoce (antes dos 12 anos), (2) uma menopausa tardia (após os 55 anos), (3) uma primeira gravidez com uma idade mais avançada, (4) ter estado grávida poucas vezes ou nunca ter estado grávida, (5) nunca ter amamentado e (6) ter tomado durante muitos anos anticoncepcionais orais, pode aumentar o risco de sofrer cancro da mama (2) (16).
- Alterações genéticas hereditárias: cerca de 10% dos casos diagnosticados de cancro da mama têm uma origem hereditária, em genes mutados que foram transmitidos à descendência. Mutações em determinados genes, como BRCA1 e BRCA2, podem ter uma origem hereditária e aumentam a probabilidade de se diagnosticar cancro da mama no futuro (2) (16) (12) (17).
- Densidade do tecido mamário: o tecido mamário denso pode aumentar a probabilidade de sofrer cancro da mama e aumenta a dificuldade da sua deteção (2) (16).
- Terapia hormonal de substituição (THS): mulheres que fizeram THS para a menopausa apresentam maior possibilidade de desenvolver cancro da mama (2) (16).
- Falta de atividade física: mulheres que têm uma vida mais sedentária possuem um risco maior para desenvolver cancro da mama. Ao estar fisicamente ativa leva à diminuição desse risco através da prevenção do aumento de peso e obesidade (16).
- Dieta: uma alimentação pouco equilibrada e rica em gorduras saturadas pode aumentar o risco de desenvolver cancro da mama (2).

- **Obesidade:** mulheres que sofrem de obesidade apresentam um risco mais elevado de desenvolver cancro da mama. Após a menopausa, o risco de cancro da mama também aumenta com o aumento de peso (2) (16) (17).
- **Bebidas alcoólicas:** o consumo frequente de bebidas alcoólicas pode aumentar o risco de sofrer cancro da mama (2) (16) (17).
- **Radioterapia:** mulheres que foram sujeitas a radioterapia na região torácica antes dos 30 anos apresentam um risco maior para cancro da mama (16) (17).

O cancro da mama pode ainda ser classificado consoante o seu estadio, ou seja, o seu tamanho e a sua extensão (se já atingiu os gânglios linfáticos e se já se espalhou para outros lugares do organismo):

- **Estadio 1:** corresponde ao cancro da mama numa fase inicial. Pode ser dividido em duas subcategorias: Estadio 1A- o tumor tem cerca de 2cm ou menos e não se espalhou nem para os gânglios linfáticos nem para outras partes do organismo (Figura 1.2.2.4-A); Estadio 1B- o tumor tem cerca de 2cm ou menos mas encontram-se pequenas áreas de células neoplásicas nos gânglios próximos da mama (Figura 1.2.2.4-B) (12) (18) (19).

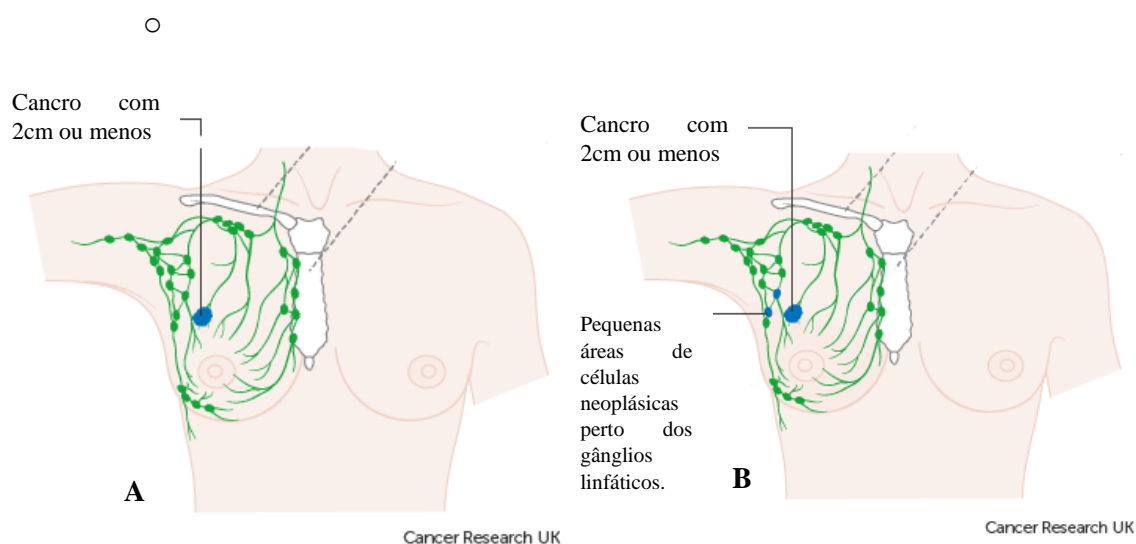


Figura 1.2.2.4: Estadio 1 do Cancro da Mama- A: Estadio 1A, tumor com menos de 2cm e não se espalhou para os gânglios linfáticos; B: Estadio 1B, tumor com cerca de 2cm ou menos e encontram-se pequenas áreas de células neoplásicas nos gânglios próximos da mama. (adaptado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer>)

○ Estadio 2: o tumor possui entre 2-5cm e pode ou não ter atingido os gânglios linfáticos. Pode ser também dividido em 2 subcategorias: Estadio 2A- o tumor é maior que 2 cm mas menos do que 5 cm e não há cancro nos gânglios linfáticos (Figura 1.2.2.5-A); Estadio 2B- o tumor é maior que 2cm mas menos do que 5 cm e existem pequenas áreas de células neoplásicas perto dos gânglios linfáticos ou invasão entre 1-3 gânglios linfáticos (Figura 1.2.2.5-B) (12) (18) (19).

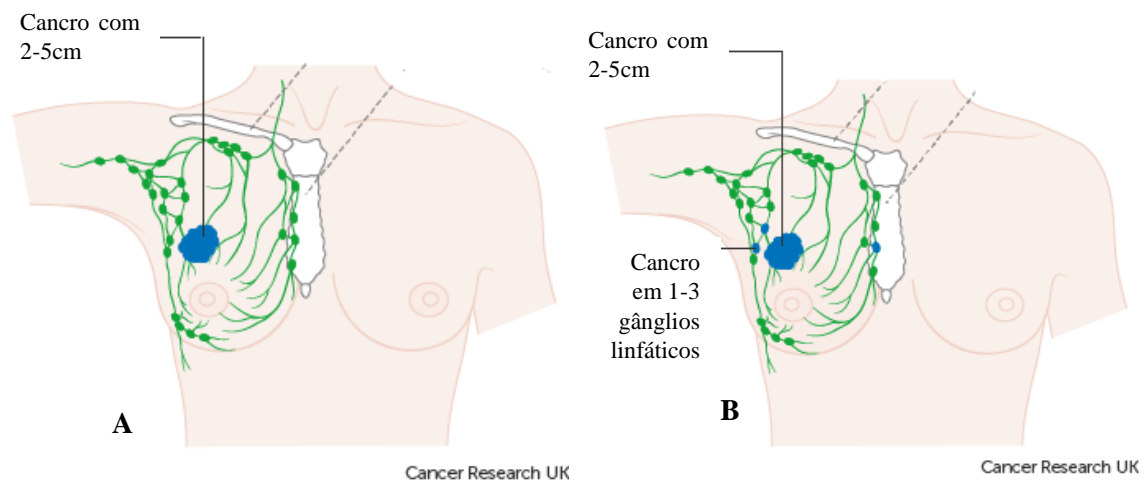


Figura 1.2.2.5: Estadio 2 do Cancro da Mama – A: Estadio 2A, tumor com 2 cm mas menos do que 5 cm e não há invasão dos gânglios linfáticos; B: Estadio 2B, tumor com 2cm mas menos do que 5 cm e existem pequenas áreas de células neoplásicas perto dos gânglios linfáticos ou invasão de 1-3 gânglios linfáticos. (adaptado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-2>)

○ Estadio 3: o tumor tem mais de 5 cm e pode já ter atingido os gânglios linfáticos, a parede torácica ou a pele que reveste a mama. É designado como cancro da mama localmente avançado e pode ser dividido em subcategorias: Estadio 3A- o tumor tem mais do que 5 cm e invadiu até 3 gânglios linfáticos; Estadio 3B- o tumor espalhou-se para a pele ou para a parede torácica e pode invadir até 9 gânglios linfáticos (Figura 1.2.2.6- A); Estadio 3C- tumor espalhou-se para a pele ou para a parede torácica e ainda para uma ou mais das seguintes estruturas: 10 gânglios linfáticos, gânglios acima ou abaixo da clavícula, gânglios perto do esterno (Figura 1.2.2.6- B) (12) (18) (19).

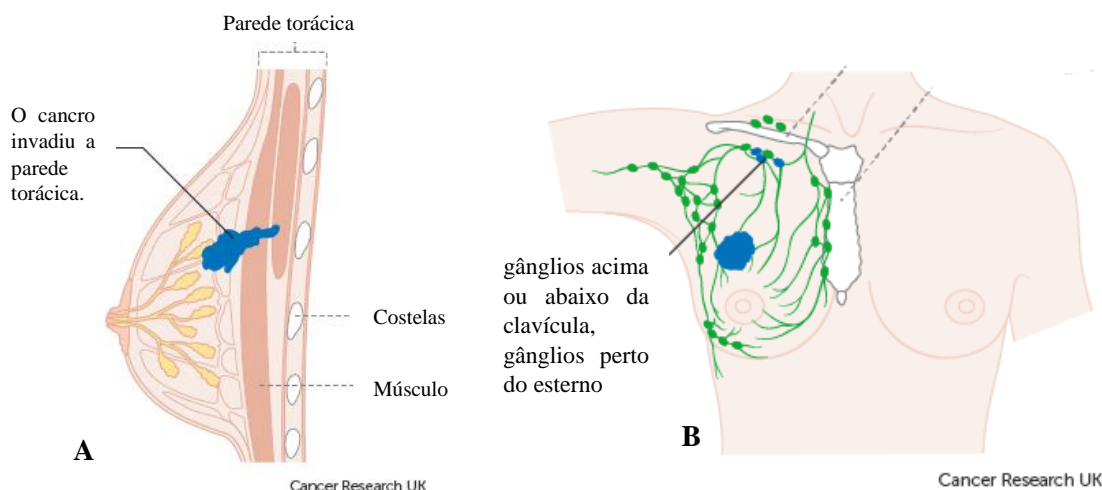


Figura 1.2.2.6: Estadio 3 do Cancro da Mama – A: Estadio 3B, o tumor espalhou-se para a pele ou para a parede torácica e pode invadir até 9 gânglios linfáticos; B- Estadio 3C, tumor espalhou-se para a pele ou para a parede torácica e ainda para uma ou mais das seguintes estruturas: 10 gânglios linfáticos, gânglios acima ou abaixo da clavícula, gânglios perto do esterno. (adaptado de <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-types-grades/number-stages/stage-3>)

○ Estadio 4: refere-se a um cancro de qualquer tamanho e que pode ter invadido várias partes do organismo. O tumor pode ter metastizado para outras partes do corpo como cérebro, fígado, ossos e pulmões (12) (18) (19).

Para se obter a classificação completa de um tumor é utilizado o sistema TNM. O T corresponde tamanho do tumor primário e se este disseminou para outras partes do corpo, ou seja, o seu estadio. O N corresponde à disseminação das células neoplásicas para os gânglios linfáticos. Por fim o M indica se existe presença de metástases noutras partes do corpo (20).

1.2.3- Biomarcadores utilizados para diagnóstico

Atualmente, escolha dos tratamentos a aplicar a doentes que sofram de cancro da mama são baseados nos biomarcadores. Biomarcadores são frequentemente marcadores proteicos que podem ser pesquisados no tecido neoplásico por técnica de imunohistoquímica; no diagnóstico e terapêutica do cancro da mama são utilizados: Recetor de estrogénio (RE), Recetor de progesterona (RP), Recetor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her2) e o índice de proliferação Ki-67 (21) (22) (23) (24).

No caso desta neoplasia, pode existir uma sobre expressão do recetor Her2 tornando o crescimento e divisão das células mais intensa e descontrolada (Figura 1.2.3.1). Esta alteração corresponde a um subtipo específico de cancro da mama, denominado cancro da mama Her2+, associado a uma maior agressividade da doença (22) (23) (24) (25) (26).

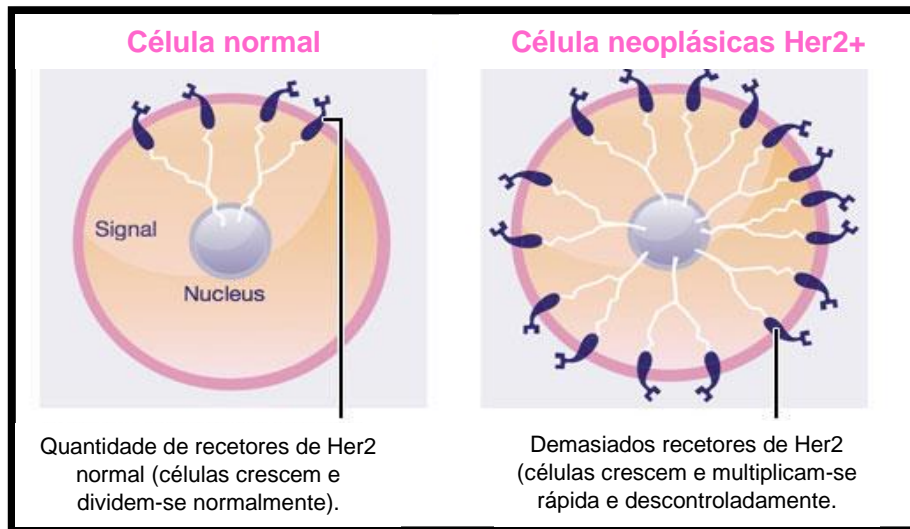


Figura 1.2.3.1: Recetores de Her2 – comparação da quantidade de recetores de Her2 numa célula normal e numa célula cancerígena. (adaptado de <http://www.Kadcyla.com>)

A determinação imunohistoquímica do status do recetor Her2 é um dado fundamental para o diagnóstico, prognóstico e orientação para o tratamento do carcinoma da mama. O Her2 é um recetor que está localizado na membrana da célula, sendo um dos fatores que dão vantagem proliferativa à célula para se dividir e multiplicar. Quando há um excesso desse recetor nas células do tecido mamário neoplásico o tumor é mais agressivo e tem maior capacidade de metastização, mas, responde a terapêuticas que bloqueiam estes recetores – terapêuticas anti Her2. É por isso feita por rotina esta avaliação e os resultados classificados como 0, 1+ (negativo), 3+(positivo) e 2+ (indeterminado). Nos casos 2+ é necessária a confirmação pelo teste de hibridização in situ por fluorescência (FISH). Foi provado em estudos anteriores que a avaliação por imunohistoquímica revelava alguns falsos positivos (27) (28), o que complica a decisão terapêutica e pode comprometer o prognóstico da doente. Foi assim decidido que todos os resultados de imunohistoquímica com 2+ iriam sofrer uma segunda avaliação por FISH. Um teste FISH verifica se as células do cancro possuem ou não um número anormal de genes Her2.

Os recetores de estrogénio (RE) e os recetores de progesterona (RP) encontram-se nas células de vários órgãos, como é o caso da mama, onde funcionam como estimuladores de diversos processos biológicos quando ativados pelas referidas hormonas (21) (22) (29) (30).

O RE é um recetor de hormonas esteroides que se encontra em cerca de 70% dos cancros da mama primários. O cancro da mama é considerado positivo para RE com uma marcação $\geq 1\%$ dos núcleos das células tumorais por imunohistoquímica. A expressão de RP está fortemente correlacionada com a expressão de RE visto que menos de 1% dos cancros da mama são positivos para RP mas negativos para RE. A expressão de RE é um fator crítico para a sensibilidade às terapias hormonais: doentes com expressão de RE e RP positiva são submetidas a hormonoterapia como tratamento adjuvante, a durante um período de, pelo menos, 5 anos; este tipo de terapêutica não está indicada para doentes com tumores RE e RP negativos. Este tipo de tratamento vai diminuir a taxa de mortalidade em cerca de 30%, no entanto, em tratamento neoadjuvante os tumores com RE positivo têm menos possibilidade de alcançar uma resposta patológica completa (pCR) do que tumores com RE negativos ou do que tumores Her2 positivos (21) (22) (29) (30).

O ki-67 é uma proteína que existe no núcleo das células quando estas se encontram em divisão, indicando assim o índice de proliferação do tumor. Este antigénio torna-se assim num excelente indicador de células em fase ativa e proliferativa, contribuindo para o estabelecimento do prognóstico de diversas neoplasias (30) (31).

1.2.4- Tratamentos

O tratamento para o cancro da mama pode-se dividir em duas categorias:

- Tratamento local: engloba cirurgia e radioterapia e vão atuar sobre as células neoplásicas de um determinado local.

- Tratamento sistémico: quimioterapia, terapêutica hormonal e terapêuticas dirigidas são tratamentos que englobam a corrente sanguínea e vão atacar as células neoplásicas de todo o corpo. Os tratamentos sistémicos podem ser utilizados após a cirurgia ou radioterapia para prevenir uma reincidência (16) (7) (12).

Alguns tipos de tumor são sujeitos a quimioterapia neoadjuvante (NACT) de forma a diminuir o tamanho do tumor antes da cirurgia ou da radioterapia. A NACT é frequentemente usada em tumores com grandes dimensões para que estes possam ser removidos por cirurgia de uma forma menos extensa. Os medicamentos mais utilizados para a realização quer da NACT quer da quimioterapia adjuvante podem ser antraciclinas, taxanos, 5-fluorouracilo e ciclofosfamida (19) (32) (33).

Atualmente existem muitas tentativas de incorporar terapêuticas neoadjuvantes no tratamento das doentes.

1.2.5- Epidemiologia do Cancro da Mama

O cancro é uma das doenças mais importantes no mundo. Em 2012, foram diagnosticados cerca de 14,9 milhões de novos casos no mundo e estima-se que este número tenda a aumentar ao longo das décadas (Figura 1.2.5.1) (34).

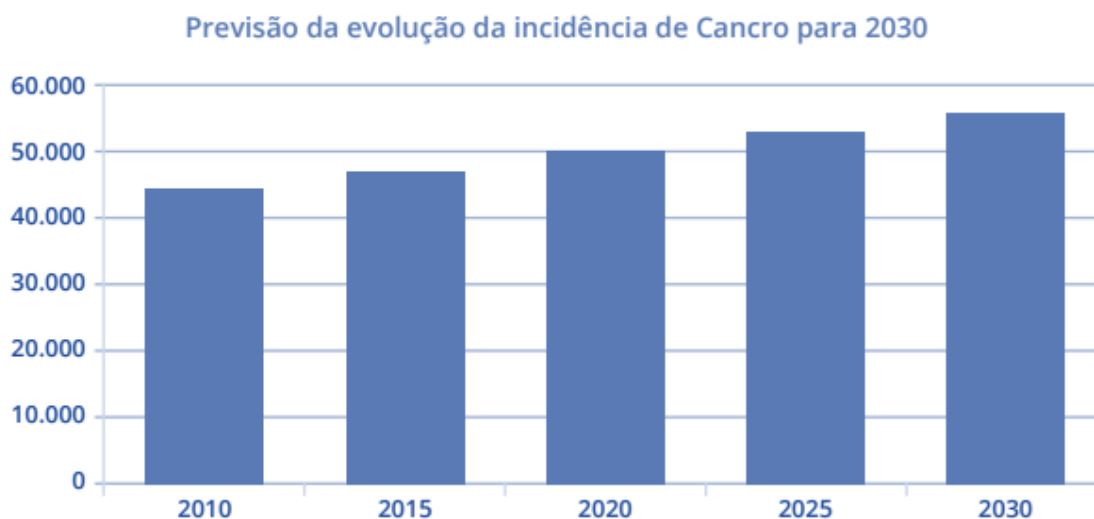


Figura 1.2.5.1: Previsão da evolução da incidência de cancro em Portugal (2010-2030). (retirado de <https://www.iarc.fr/index.php>)

O cancro da mama é o tipo de neoplasia maligna mais comum nas mulheres a nível mundial com cerca de 1,67 milhões de casos diagnosticados em 2012, correspondendo a 25% do total de casos diagnosticados com cancro (34)(35).

No estudo realizado pela *Globocan* em 2012, o cancro da mama tem uma alta taxa de incidência (Figura 1.2.5.2) e taxa de mortalidade (Figura 1.2.5.3) a nível mundial (35).

Relativamente à taxa de incidência de cancro da mama, esta pode variar entre 24,1/100.000 habitantes na África Central e 64,8/100.000 na América do Norte (Figura 1.2.5.2). Existe ainda uma maior taxa de incidência do cancro da mama em países mais desenvolvidos do que menos desenvolvidos. Esta diferença deve-se principalmente à facilidade de realização de rastreios para diagnóstico nos países mais desenvolvidos (34)(35).

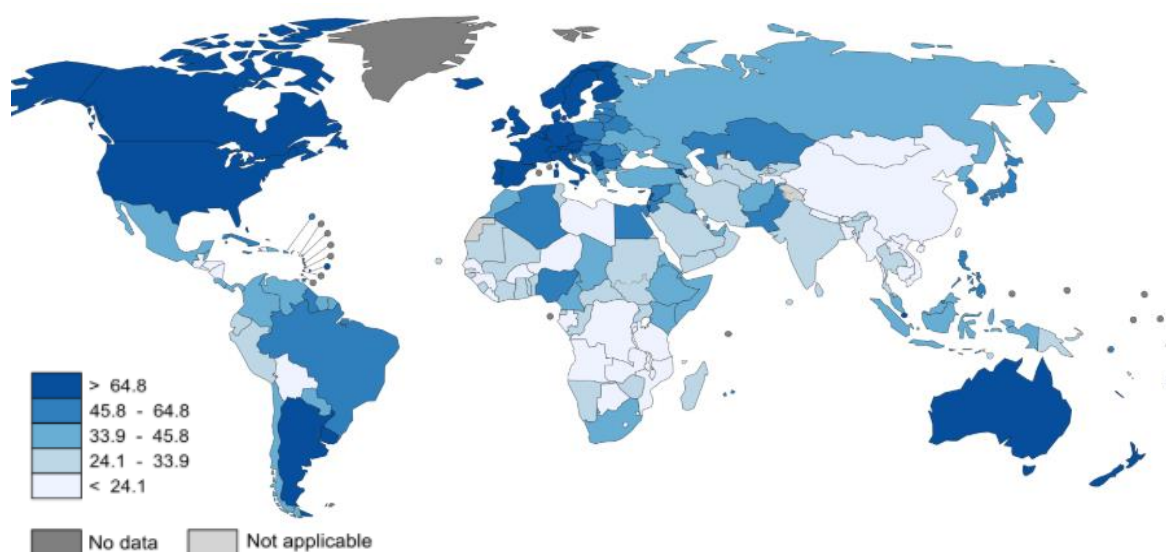


Figura 1.2.5.2: Taxa de incidência do cancro da mama a nível mundial em 2012. Estimativa de taxas padronizadas por 100.000 habitantes. (retirado de <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>).

Em relação à taxa de mortalidade do cancro da mama a nível mundial, possui os valores mais elevados nas regiões menos desenvolvidas e os valores menos elevados nas regiões mais desenvolvidas (Figura 1.2.5.3). Esta diferença está relacionada com a deteção precoce do cancro, e países menos desenvolvidos estão associados a uma diminuição da taxa de sobrevivência dos doentes devido a tratamentos inexistentes ou inadequados. Contudo mesmo nos países desenvolvidos, tratamentos adequados possuem um custo elevado associado o que pode levar a um mau prognóstico para a sobrevivência do doente (34)(35).

A taxa de mortalidade por cancro da mama tem vindo a diminuir ao longo dos anos, em parte devido à facilidade de realizar rastreios o que leva a uma deteção precoce, ao aumento da consciencialização e à melhoria das opções de tratamento.

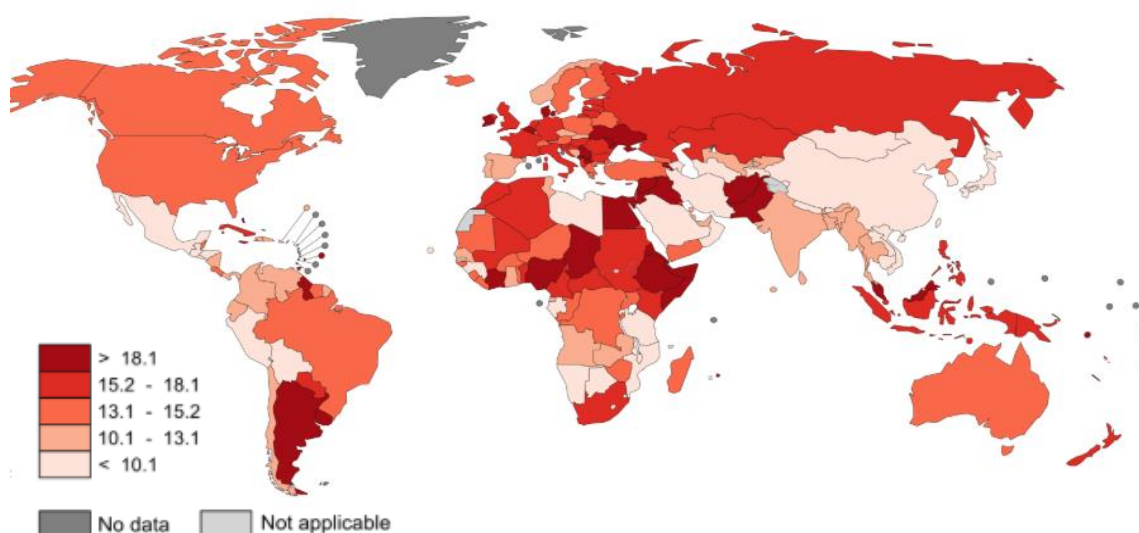


Figura 1.2.5.3: Taxa de mortalidade por cancro da mama a nível mundial. Estimativa de taxas padronizadas por 100.000 habitantes. (retirado de <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>).

1.3- Sistema Imunitário e o Cancro

O sistema imunitário é constituído por um grupo de órgãos, células e moléculas especializados na defesa do organismo contra os agentes patogénicos, ou seja, qualquer substância que seja estranha ao organismo. Ao reconhecer este agente estranho ao corpo, o qual se reconhece como antigénio, o sistema imunitário desencadeia uma resposta imune para neutralizar ou destruir esse agente (36)(37).

Existem então dois tipos de respostas aos antigénios invasores: resposta inata (natural) ou resposta adaptativa (adquirida). A resposta inata corresponde a mecanismos de defesa celular e bioquímicos que já existiam antes de ocorrer a invasão. Estes mecanismos fazem parte da primeira linha de defesa do organismo contra infeções, mas são mecanismos inespecíficos pois não conseguem reconhecer diferenças subtis entre os diferentes invasores, e vão gerar as mesmas respostas para diferentes invasões (37)(38). Este tipo de respostas têm como componentes celulares as células fagocitárias e as células *natural killer* (Figura 1.3.1-A) (39).

Por outro lado, a resposta adaptativa desenvolve-se após a invasão ocorrer e vão adaptar-se de forma a reconhecer, eliminar e memorizar o agente patogénico invasor, o que torna este tipo de resposta muito específica, Este tipo de resposta tem ainda uma

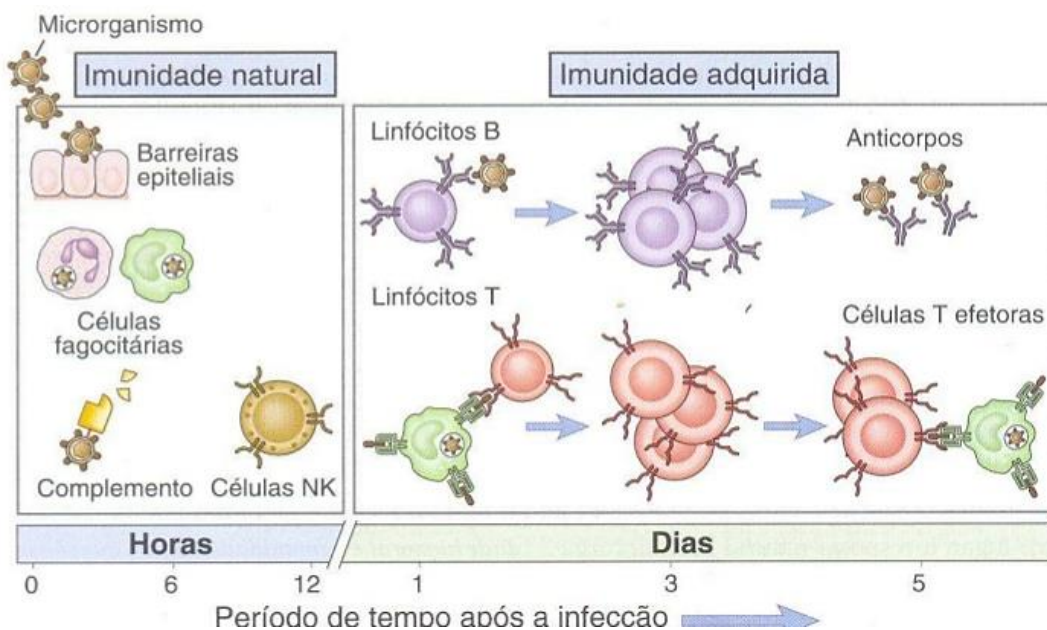


Figura 1.3.1: Constituintes celulares dos diferentes tipos de imunidade e os seus períodos de atuação após a infeção: Imunidade natural engloba células fagocitárias e *Células Natural Killer*; Imunidade adquirida constituída por Linfócitos B, Linfócitos T e Células efetoras. (adaptado de (16)).

capacidade de memória antigénica permitindo uma resposta rápida e efetiva ao mesmo agente patogénico em invasões posteriores (37)(38). Como componentes celulares pertencentes a este tipo de resposta encontram-se os linfócitos B e T, as células apresentadoras de antígenos e as células efectoras (Figura 1.3.1.B) (39).

A resposta imune adaptativa pode ainda ser dividida em dois tipos de respostas:

- Imunidade mediada por células: caracterizada pela ação conjunta de linfócitos e macrófagos para destruir ou neutralizar o agente externo;

- Imunidade humoral: caracterizada pela secreção de proteínas (anticorpos) por um tipo de linfócito. Os anticorpos neutralizam os agentes estranhos ligando-se especificamente ao antígeno. (36)(40)

Os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos e as células efectoras são as principais células do sistema imunitário.

Os linfócitos são um tipo de leucócito presente no sangue e desempenham um papel fundamental nos mecanismos de defesa do organismo. Como expressam recetores de antígeno, eles reconhecem os agentes infecciosos e combatem-nos através de uma resposta citotóxica mediada por células ou através de uma resposta humoral produzindo anticorpos. Apesar de possuírem uma morfologia semelhante, os linfócitos podem ser divididos em três categorias: Linfócitos B, Linfócitos T e *Natural Killer* (36)(37)(40).

Os linfócitos B desenvolvem-se na medula óssea e cada linfócito B expressa um só recetor de antígeno (anticorpo) na sua membrana. Eles reconhecem os antígenos extracelulares e diferenciam-se em células secretoras de anticorpos, funcionando assim como mediadores da imunidade humoral. Os linfócitos B são reconhecidos por contribuir para as respostas imunitárias antineoplásicas através da secreção de imunoglobulinas (anticorpos) específicas dos antígenos (39)(40).

Os linfócitos T têm origem na medula óssea, mas vão-se diferenciar no timo. Expressam um só recetor de antígeno da membrana e podem ser divididos em três tipos: Linfócitos T auxiliares (T_a), Citotóxicos (T_c) e Reguladores (T_{reg}). Os Linfócitos T_a vão secretar proteínas denominadas citocinas, cuja função é estimular a proliferação e a diferenciação das células T, assim como a ativação de outras células como macrófagos, células B e outros leucócitos. Os Linfócitos T_c desenvolvem a capacidade de eliminar

células que exibam um antígeno específico identificado como uma ameaça ao corpo. Os Linfócitos Treg agem de forma a suprimir a ativação do sistema imune mantendo-o em homeostase e tolerante a antígenos específicos (39)(40). As células T do sistema imune conseguem reconhecer e eliminar agentes patogénicos ou células neoplásicas, levando a uma resposta imunológica coordenada: incluindo respostas inatas e adaptativas (41)

Os linfócitos *Natural Killer* encontram-se envolvidos na imunidade natural do organismo contra agentes extracelulares e vírus (39)(40).

Os subtipos moleculares dos tumores da mama e a presença de *tumour infiltrating lymphocytes (TILs)* tem sido indicada como um fator preditivo do tratamento a realizar e associada a um prognóstico favorável para o doente (42) (43). Os *TILs* são um grupo de células imunes que adquirem fenótipos imunossupressores ou imunomoduladores e exercem um papel anti-tumoral ou pró-tumoral (44).

Neste estudo, fomos avaliar a expressão de marcadores de linfócitos T o CD3, CD4 e CD8 e do marcador de linfócitos B, o CD20. O *Cluster of Differentiation 3 (CD3)*, é um co-recetor de células T, encontrando-se na superfície celular e quando o antígeno se liga ao recetor, o complexo CD3 leva à ativação das células T. As células CD4 são as mais importantes no sistema imune pois ajudam a coordenar as respostas imunes estimulando outras células imunes como macrófagos, linfócitos B e linfócitos CD8. O *Cluster of Differentiation 8 (CD8)* é expresso maioritariamente na superfície de células T citotóxicas. CD20 é um tipo de linfócito B que é expresso na superfície de todas as células B (45) (46).

O *immune editing* é um processo dinâmico no qual o sistema imune tenta destruir o tumor. Este processo é composto por três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Na fase da eliminação, fatores imunes do hospedeiro vão atuar sobre o tumor e tentar destruí-lo antes de ocorrerem alterações clínicas. Na fase de equilíbrio, as células neoplásicas conseguiram ultrapassar as respostas imunes e encontram-se num estado quiescente. Na fase de escape imune, as células neoplásicas conseguem evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro e conseguem desenvolver-se no hospedeiro. Esta fase evasão imune foi reconhecida como um *Hallmark of cancer*.

De forma a manter a homeostase do organismo e de assegurar que o sistema imune não atua contra células saudáveis durante a resposta imune, existem vários *immune*

checkpoints que garantem que uma resposta imune apenas atua contra agentes patogénicos e células neoplásicas. No entanto as células neoplásicas adaptam-se a estes immune checkpoints e conseguem evitar que sejam detetadas e eliminadas (41).

Os immune checkpoints referem-se a um conjunto de vias inibitórias que estão ligadas ao sistema imune e são responsáveis por mediar a resposta imune, nomeadamente a duração e amplitude, de forma a minimizar os danos colaterais nos tecidos. As principais moléculas que estão envolvidas nestes processos são o antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), a proteína celular de morte programada (PD-1) e o seu ligando (PD-L1) (41) (47).

As células neoplásicas podem escapar ao ataque imune expressando a proteína PD-L1. O PD-L1 funciona como um sinal de stop para inativar as células T. O PD-L1 atua ligando-se aos recetores PD-1 das células T, levando à sua inativação.

Com o bloqueio dos *immune checkpoints* PD-1/PD-L1 e CTLA-4 com anticorpos monoclonais, o sistema imune pode superar a tentativa das células neoplásicas resistirem à resposta imune e acabar por defender o organismo contra o tumor (41).

O PD-L1 é das principais proteínas envolvidas nos immune checkpoints e atua como um fator co-inibidor, que pode limitar o desenvolvimento da resposta das células imunes (células T) (41) (47). Estudos anteriores em vários tipos de cancro mostram uma expressão de PD-1 nas TILs e o PD-L1 é expresso em células tumorais. Isto tem sugerido que via do PD-1/PD-L1 pode modular a resposta imune antitumoral (48).

Atualmente já se encontram aprovados dois anticorpos monoclonais, o *Nivolumab* e o *Pembrolizumab*, medicamentos anti-PD-1 para melanomas, carcinoma do pulmão de não pequenas células e carcinoma de células renais (41). Ensaios clínicos de fase I com anticorpos monoclonais contra PD-L1 tem mostrado resultados promissores em diferentes tipos de tumores (48) (49).

Apesar deste mecanismo não estar ainda muito estudado para tumores da mama, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a expressão de PD-L1, a nível das células imunes e das células tumorais, em amostras de tumores da mama. O estudo de expressão de PD-L1 em carcinomas da mama pode levar-nos à compreensão da razão por que os carcinomas da mama respondem mal aos immune checkpoints inibidores e, pode, por

outro lado, ajudar a encontrar alguns tumores ou subtipos biológicos que sejam mais sensíveis a este tipo de terapêuticas.

2-Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Avaliar a expressão de PD-L1 e das subpopulações linfocitárias CD3, CD4, CD8 e CD20 em doentes diagnosticadas com carcinoma da mama e correlacionar com os seus dados clinico-patológicos.

2.2- Objetivos específicos

- Analisar as subpopulações linfocitárias CD3, CD4 e CD8 por citometria de fluxo para seleção das doentes para o estudo;
- Analisar os dados clínico-patológicos das doentes selecionadas para o estudo;
- Avaliar a expressão intratumoral e peritumoral das subpopulações linfocitárias CD3, CD4, CD8 e CD20 por imunohistoquímica;
- Estabelecer uma relação entre os níveis de expressão de linfócitos e a resposta a NACT;
- Avaliar a expressão de PD-L1 nas células tumorais e nas células imunes por imunohistoquímica;
- Correlacionar os dados obtidos por imunohistoquímica com os dados clínico-patológicos recolhidos: Grau de diferenciação do tumor, subtipo de cancro da mama, estado de invasão dos gânglios linfáticos axilares (status ganglionar), índice de proliferação celular (Ki67) e índice de massa corporal (IMC).

3-Metodologia

3.1- Comissão de Ética

O consentimento informado e por escrito foi obtido de todos os doentes selecionados para o estudo, e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do HVFX e pela Comissão de Ética do HCD.

3.2- Escolha das Amostras

Para este estudo foram utilizadas no total 33 amostras de carcinoma da mama provenientes do serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Vila Franca de Xira (HVFX) e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Cuf Descobertas (HCD). Procedeu-se à colheita de amostras a fresco e colocaram-se em *ependorfs* com líquido *TransFix® (Cytomark)* (para análise por citometria de fluxo no Centro de Investigação de Doenças Crónicas (Cedoc)). O restante tecido neoplásico foi fixado em formol tamponado a 10%, processado e incluído em parafina. Para o estudo imunohistoquímico usaram-se as amostras incluídas em parafina e avaliaram-se as seguintes características clínico-patológicas: idade, peso, altura, antecedentes familiares, antecedentes pessoais, hábitos, histórico ginecológico, classificação do tumor (Organização Mundial da Saúde - OMS), nível de expressão dos marcadores RE, RP, Her2 e ki-67, dimensão do tumor e status ganglionar axilar (TNM), tratamentos e resposta à quimioterapia neoadjuvante (NACT), quando aplicável.

3.3- Recolha das amostras- Laboratório de Macroscopia do Serviço de Anatomia Patológica

Para a recolha das amostras para o estudo linfocitário por citometria de fluxo, as peças de carcinoma da mama provenientes de tumorectomias ou mastectomias foram recebidas a fresco no laboratório de Macroscopia do serviço de Anatomia Patológica.

Realizou-se uma análise macroscópica pelos técnicos do serviço, onde se tem em conta alguns parâmetros: medidas da peça operatória - comprimento, altura e espessura; medidas do detalhe cutâneo - comprimento e altura; se inclui ou não mamilo; medidas do tumor; distância do tumor à margem mais profunda e à margem mais próxima. As margens da peça foram pintadas com tinta da china de diferentes cores de forma a ser possível diferenciar as margens no diagnóstico. Retirou-se uma amostra do tumor com cerca de 1mm e colocou-se num *ependorf* com líquido *Transfix®* (*Cytomark*). Após a recolha da amostra a fresco, colocou-se a peça operatória em formol tamponado a 10% para fixar até ao dia seguinte. O formol tamponado tem como função manter o pH estável e por estabelecer pontes de metileno entre os aminoácidos das várias proteínas, contribuindo assim para a inativação funcional das enzimas

Depois da peça ter sido fixada, realizaram-se cortes macroscópicos de uma forma perpendicular, como exemplificado na Figura 3.3.1. Os cortes realizaram-se em várias secções do tecido mamário normal e do tecido tumoral de forma a ser abrangente e representativo o suficiente para o médico patologista realizar o diagnóstico. Colheram-se os fragmentos e colocaram-se em cassetes histológicas, colocadas por sua vez no equipamento onde vão ser processadas e sofrer desidratação, clarificação e impregnação com o objetivo conferir aos tecidos consistência que permita efectuar cortes histológicos a fim de ser realizado o estudo histológico e imunohistoquímico.

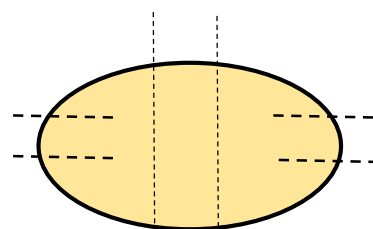


Figura 3.3.1: Forma de corte macroscópico das peças mamárias.

3.4- Tratamento das amostras- Laboratório de Histologia do Serviço de Anatomia Patológica

Após a colheita de amostras de tecido tumoral, estas foram processadas. Este processamento tem como objetivo impregnar de parafina os tecidos e engloba três etapas:

- 1^a- Desidratação (álcool): a solução aquosa dos tecidos é extraída, visto que as substâncias que serão utilizadas para a inclusão não se homogeneízam com água. Este processo é realizado com a utilização de álcool etílico, desidratando de forma gradual: 70%, 96%, 100% para garantir que a solução aquosa é extraída.

- 2^a- Clarificação (xilol): tem o objetivo de remover completamente o álcool do interior dos tecidos. A remoção do álcool é de elevada importância visto que a parafina não se mistura de forma homogénea com o álcool e como é fundamental que a parafina penetre dentro dos tecidos, a remoção do álcool tem que ser total. Nesta etapa foi utilizado o xilol para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina.

- 3^a- Impregnação (parafina): a impregnação dos elementos teciduais em parafina é importante visto que a parafina constitui um meio de inclusão tecidual. Para esta impregnação acontecer, a parafina deve encontrar-se entre os 56°C e os 60°C, onde se encontra no estado líquido.

Depois de processadas, as amostras seguiram para a inclusão e colocaram-se a aproximadamente 70°C para a parafina se tornar líquida.

Retiraram-se as amostras biológicas, posicionaram-se em moldes sobre uma superfície gelada e encheram-se com parafina de forma a solidificar os fragmentos e criar então os blocos de tecido. Por cima do molde, colocou-se a parte inferior da cassette para solidificar com os fragmentos de forma a não se perder a identificação do doente (Figura 3.4.1).



Figura 3.4.1: Etapas do processo de inclusão (retirado de <http://www.lamedpatologia.com.br>).

Depois de solidificados, os blocos sofreram um desbaste da parafina em excesso num micrótomo rotativo semiautomatizado (*Leica Biosystems*) até se alcançar todas as áreas do tecido e de seguida realizaram-se cortes uniformes com uma espessura de 2 μ m.

Para colocar os cortes na lâmina utilizou-se uma tina com água à temperatura ambiente de forma a orientar a posição dos cortes na lâmina e usou-se uma segunda tina com água a uma temperatura aproximadamente de 50°C para melhorar a adesão do corte à lâmina (Figura 3.4.2).

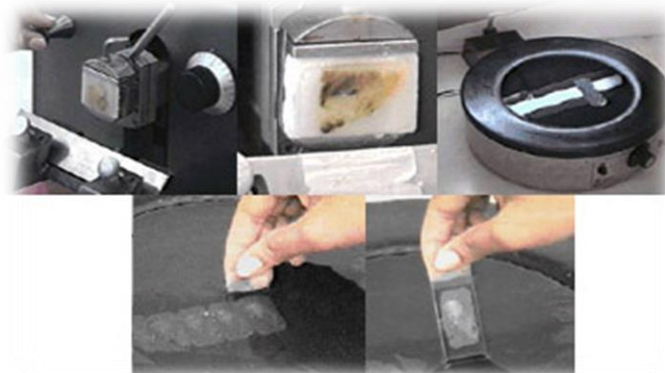


Figura 3.4.2: Processo de corte e de colocação dos cortes nas lâminas. (retirado de <http://www.lamedpatologia.com.br>).

Para a visualização microscópica do tecido utilizou-se a coloração de rotina com hematoxilina-eosina. A hematoxilina é responsável pela coloração dos núcleos, evidenciados a roxo, pois como são ácidos vão ter afinidade com o corante básico. Por outro lado, a eosina é particularmente sensível ao álcool e é um corante ácido utilizado como um corante de fundo, assumindo uma tonalidade desde rosa até vermelho, diferente consoante o constituinte. Para se realizar esta coloração colocaram-se as lâminas com os cortes na máquina histológica *Leica ST5010* (*Leica Biosystems*), onde, de forma automatizada, as lâminas sofrem uma marcação com excesso de hematoxilina, depois são mergulhadas em soluções com várias concentrações de álcool de forma a eliminar a cor das substâncias com pouca afinidade e por fim são mergulhadas em eosina. Nesta máquina realizou-se também a montagem das lâminas com as lamelas *Surgipath*[®] *Premier Cover Glass* (*Leica Biosystems*) e com o meio de montagem *Leica CV Mount* (*Leica Biosystems*).

3.5- Tratamento das amostras- Laboratório de Imunohistoquímica do Serviço de Anatomia Patológica

Nos casos de tecido mamário é sempre realizado um conjunto de biomarcadores: RE, RP, Her2 e Ki-67. Para o processo de corte dos blocos e da colocação dos cortes nas lâminas procede-se de igual forma ao descrito na metodologia 3.4 mas utilizaram-se lâminas adesivadas *Superfrost® Plus (ThermoFisher Scientific)*. Nas lâminas para imunohistoquímica foi adicionado também um controlo positivo, ou seja, um corte de tecido pré-selecionado onde se tem a certeza que vai sofrer marcação pelo anticorpo e permite assim identificar falhas na aplicação do anticorpo na lâmina em estudo e se a técnica funciona de uma forma adequada. Para os anticorpos RE, RP e Her2 utilizou-se como controlo tecido mamário normal e para o Ki-67 utilizou-se amígdala. Após as lâminas possuírem os cortes colocaram-se durante 1h na estufa a 60°C.

Depois de secas, colocaram-se as lâminas na máquina de imunohistoquímica *BenchMark GX (Roche)* para sofrerem marcação com os respetivos anticorpos. Este equipamento possui ainda reagentes que são utilizados em todos os procedimentos de marcação: Condicionador celular 2 (CC2) e Condicionador celular 1 (CC1) - soluções pré-diluídas utilizadas para um pré-tratamento das amostras de tecido durante a imunohistoquímica; Tampão de lavagem - efetua uma lavagem às lâminas fornecendo um ambiente aquoso favorável para a marcação de imunohistoquímica; Solução de cobertura (LCS) - cria uma película que mantém as lâminas húmidas durante a etapa de marcação criando assim uma barreira entre os reagentes aquosos e o ar; Tampão salino de citrato de sódio (SSC) - efetua uma lavagem às lâminas entre as reações; *Ez Prep* - utilizado para a remoção da parafina. (50)

Quando a máquina termina a marcação, lavaram-se as lâminas com detergente e água quente para remover a camada gordurosa que as mantém húmidas e colocaram-se na máquina histológica *Leica ST5010 (Leica Biosystems)* para realizarem a montagem das lamelas.

Seguidamente as lâminas foram presentes ao médico patologista para diagnóstico.

3.6- Determinação do número de linfócitos nas amostras por Citometria de Fluxo

Com as amostras de tecido fresco que foram recolhidas no serviço de Anatomia Patológica do HVFX e do HCD realizou-se uma primeira análise com a técnica de Citometria de fluxo de forma a seleccionar tumores com maior infiltrado linfocitário para uma posterior análise pela técnica de imunohistoquímica.

As amostras dos tumores frescos e biópsias foram mecanicamente dissociadas utilizando um *Medicon (Bioscience)*, filtradas com uma malha de 30 µm e lavadas com solução tampão de fosfato salino 1x (PBS). As amostras foram coradas com *BD Horizon Stable Viability Stain 450 (BD Biosciences)* (fluorescência de emissão máxima a 450nm) e excepto uma das amostras que serviu para análise do componente *unstained*, nas restantes amostras foi adicionado o *cocktail* de anticorpos CD3 (clone UCHT1, fluorescência de excitação máxima a 401nm e fluorescência de emissão máxima a 452nm)(*BD Biosciences*), CD4 (clone RPA-T4, fluorescência de excitação máxima a 401nm e fluorescência de emissão máxima a 452nm)(*BD Biosciences*) e CD8 (clone RPA-T8, fluorescência de excitação máxima a 405nm e fluorescência de emissão máxima a 510nm)(*BD Biosciences*). As amostras foram fixadas e permeabilizadas com o *kit Fix/Perm® (eBiosciences)*, seguido de coloração intracelular. Para a medição das fluorescência utilizou-se um citómetro de fluxo (*BD FACSAria™*) e os resultados foram analisados utilizando o programa *FlowJo® V10*.

3.7- Determinação do nível de expressão dos linfócitos CD3, CD4, CD8 e CD20 e de PD-L1 nas amostras por Imunohistoquímica

Após a seleção por citometria de fluxo dos casos a utilizar, realizaram-se cinco cortes num micrótopo rotativo semi-automatizado (*Leica Biosystems*) de cada caso, um corte para cada anticorpo. Foram utilizadas lâminas adesivadas *Superfrost® Plus* (*ThermoFisher Scientific*) e como controlos positivos usou-se apêndice para o CD3 e CD20, amígdala para o CD4 e CD8 e uma combinação de amígdala e placenta para o PD-L1.

O estudo das subpopulações linfocitárias realizou-se no serviço de anatomia patológica do HVFX. Os blocos para a realização dos cortes mantiveram-se numa placa de refrigeração a $\approx -20^{\circ}\text{C}$, de seguida os cortes realizaram-se a $2\mu\text{m}$ e utilizou-se uma tina com água destilada à temperatura ambiente para orientação dos cortes da lâmina e uma segunda tina com água destilada a uma temperatura de 56°C para melhorar a adesão dos cortes à lâmina. Posteriormente à colocação dos cortes, as lâminas foram durante 1h para estufa a 60°C .

Colocaram-se as lâminas na máquina de imunohistoquímica *BenchMark GX* (*Roche*) após a sua saída da estufa. Neste tipo de aparelho utilizou-se como cromogéneo o *OptiView Diaminobenzidine (DAB) Immunohistochemistry Detection Kit* (*Ventana®*) (Anexo I), que utiliza um método indireto para visualizar anticorpos específicos ligados aos antigénios depositando um precipitado de cor castanha. Utilizaram-se os anticorpos anti-CD3 (2GV6- Anexo II) (*Ventana®*), anti-CD4 (SP35- Anexo III) (*Ventana®*), anti-CD20 (L26- Anexo IV) (*Ventana®*), e anti-CD8 (SP57- Anexo V) (*Ventana®*).

Depois de terminado o processo de marcação, lavaram-se as lâminas com detergente e colocaram-se na máquina histológica *Leica ST5010* (*Leica Biosystems*) para a montagem das lâminas com as lamelas *Surgipath® Premier Cover Glass* (*Leica Biosystems*) e com o meio de montagem *Leica CV Mount* (*Leica Biosystems*)

Avaliou-se então o estado de marcação dos controlos e a expressão linfocitária intratumoral e peritumoral.

Para a marcação imunohistoquímica com PD-L1 (SP263) (*Ventana*[®]), o estudo realizou-se no serviço de anatomia patológica do HCD. Os procedimentos para este anticorpo foram iguais aos mencionados acima, apenas a máquina para a marcação imunohistoquímica foi a *BenchMark ULTRA* (*Roche*), onde também se utilizou como cromogéneo o *OptiView DAB Immunohistochemistry Detection Kit* (*Ventana*[®]).

4-Resultados

4.1- Características clínico-patológicas das doentes

Os dados clínico-patológicos correspondentes às doentes selecionadas para o estudo deste projeto, encontram-se registados na Tabela 1. Como o tratamento neoadjuvante demora cerca de 6 meses, houve doentes que foram adicionadas recentemente ao estudo e para as quais não foi possível obter a resposta da NACT, visto ainda estarem em tratamento.

Tabela 1: Características clínico-patológicas das doentes utilizadas para o estudo. As doentes do HVFX com fundo azul, e do HCD com fundo laranja.

Doente	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais	História Ginecológica	Diagnóstico	RE (%)	RP (%)	Ki-67 (%)	Her2	Dimensão do tumor	Gânglios	Tratamentos	Resposta a NACT
1	47	80	1,63	Sem história familiar oncológica	Sem antecedentes pessoais	Menarca 12 anos; 1 ^a gravidez 27 anos; G4P3A1; amamentação 16+16+16 meses; ACO 2 meses	Mama esquerda; Carcinoma invasivo, sem tipo específico, G2	100	5	75	negativo (0)	Por RMM, esboço nodular com 40mm de contornos irregulares	Com metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel	Resposta completa
2	64	52	1,59	Irmã morreu aos 74a com c mama.	Sem antecedentes pessoais	Sem filhos; Menopausa 47a; sem THS	Carcinoma invasivo de padrão comum na mama direita; G2	100	negativo	15	equivoco (2+)- aguarda SISH	tumor com 30mm	Sem metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel + RT	Resposta significativa, após NACT tumor com 10mm
3	45	81	1,63	Não há cancro na família. Irmã com lesões mama quísticas	Sem antecedentes pessoais	G2P2; ACO 29 anos	Carcinoma invasivo da mama direita, de padrão comum, G2	50	5	60	positivo (3+)	Pela peça de tumorectomia, tumor com 40x50x30mm	Sem metástases	4AC, 12 paclitaxel + RT + TAM	Não realizou NACT

Doente	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais	História Ginecológica	Diagnóstico	RE (%)	RP (%)	Ki-67 (%)	Her2	Dimensão do tumor	Gânglios	Tratamentos	Resposta a NACT
4	46	66	1,60	Mão com tumor cerebral, em doença estável	HTA	Menarca 15 anos; Não está em menopausa; G3P3A0; 1ª gravidez 22 anos; ACO fez 25 anos	Carcinoma invasivo de padrão comum, carcinoma ductal in situ presente, grau 2	100	negativo	60	negativo (1+)	Pela RMM o tumor tem 25,4x15,1mm, irregular	Sem metástases	Fez NACT: 4AC - 12 semanas paclitaxel	Após NACT o tumor tem 15x12mm
5	66	72	1,67	Prima com tumor do osso, prima direita com cancro SNC	HTA; DM2; Hipercolesterolemia	Menarca 12 anos; G2 P2; amamentou pouco tempo; ACO poucos anos; menopausa cirurgica por mioma aos 38 anos	Mama esquerda; Carcinoma invasivo de padrão comum, Grau 2	75	negativo	70	positivo (3+)	Por RM mamária: 25x19mm	Com metástases	NACT com AC e pacli	Melhoria significativa, tumor com 8mm de diametro
6	39	72	1,67	Avó materna: neoplasia útero; Tia materna faleceu c/68a de neoplasia do útero	Bronquite asmática; Síndrome depressivo	Menarca 12a; Não está na menopausa; G1P1A0; 1ª gravidez 33a; ACO 21a	Carcinoma invasivo NST da mama direita; Grau 1;	negativo	negativo	50	positivo (3+)	Tumor com 5mm	Com metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel, com transtuzumab, sem TAM	Pós NACT, tumor com 35mm
7	58	68	1,68	Mãe teve cancro da mama aos 47 anos, prima da mãe com cancro da mama aos 63 anos	HTA, diabetes insulino-dependentes	Menarca 11 anos/1ª gravidez aos 28anos; G1P1; Menopausa 55 anos	Carcinoma lobular invasivo da mama direita, bem diferenciado	100	50	15	negativo (0)	Tumor com 45mm	Com metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel	Sem resposta
8	60	78	1,56	Sem história familiar oncológica	DM, HTA, cirurgia hérnia inguinal	Menarca 10 anos; 1ª gravidez 17 anos; G1P1; Menopausa 55 anos; THS 2 anos	Mama esquerda; Carcinoma invasivo sem tipo específico, G1	negativo	negativo	50	negativo	Tumor com 30mm	Com metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel	Pouca resposta, tumor com 26x7mm

Doente	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais	História Ginecológica	Diagnóstico	RE (%)	RP (%)	Ki-67 (%)	Her2	Dimensão do tumor	Gânglios	Tratamentos	Resposta a NACT
9	42	86	1,70	Sem história familiar oncológica	Sem antecedentes pessoais	Menarca 16 anos; Não está na menopausa; G5P4A1; 1ª gravidez 26a; ACO 16anos	Lesão maligna, multifocal, mama esquerda. Carcinoma invasivo, G1	100	100	5	negativo (1+)	Pela peça: I-tumor firme com 13mm; II-tumor firme e mal delimitado com 11mm.	Sem metástases	Apenas TAM	Não realizou NACT
10	67	60	1,51	Cancro da mama numa prima aos 30 anos, primo com próstata.	DM2, HTA, Hipercolesterolemia	Menarca 14 anos; G5P3 IVG2; Menopausa 44anos sem THS	Carcinoma invasivo da mama, carcinoma mucinoso, mama esquerda, G1	100	<5	5	negativo (0)	Tumor com 23mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
11	59	60	1,60	Sem história familiar oncológica	Cirurgia prolapsia vaginal, CVL	Menarca 14a/ 1ª gravidez 20a/ G3P2A1/ Menopausa 55a	Carcinoma invasivo da mama direita, G1	100	5	5	Negativo (2+)	Tumor com 18mm no QSE	Com metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
12	74	56	1,58	Mãe faleceu de neoplasia hepática aos 86a	Osteoporose, arritmia	Menarca 18a/ Menopausa 40a/ G1P1/ 1ª Gravidez 33a	Carcinoma inasivo da mama esquerda, G1	100	<5	<5	negativo (1+)	Nódulo com 10x7mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
13	65	70	1,60	Mãe com neoplasia da mama aos 68a	Sem antecedentes pessoais	Menarca 12a/ Menopausa 50a/ 1ª gravidez 19a/ G2 P2A0	Carcinoma invasivo de tipo não especial da mama direita, G1	100	100	10	negativo (1+)	Condensação com 10mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
14	35	52	1,62	Tia materna faleceu de cancro da mama aos 50 anos	Sem antecedentes pessoais	Menarca 12 anos; 1ª gravidez 23 anos; G2P1A1; Amamentação 5 meses; ACO 3 anos; Não está na menopausa	Carcinoma invasivo de padrão comum G2, mama esquerda, multicêntrico	100	75	15	negativo (0)	Pela peça de tumorectomia, diâmetro máximo de tumor 29mm.	Com metástases	Quimioterapia adjuvante + RT + TAM	Não realizou NACT

Doente	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais	História Ginecológica	Diagnóstico	RE (%)	RP (%)	Ki-67 (%)	Her2	Dimensão do tumor	Gânglios	Tratamentos	Resposta a NACT
15	74	70	1,56	Sem história familiar oncológica	Hipotiroidismo, nódulo tireoideu	Menarca 14a/ Menopausa cirurgica aos 40a/ G3P3A0/ 1ª gravidez 17a	Carcinoma invasivo da mama esquerda, de padrão comum, multifocal, G2	100	80	15	positivo (2+)	Pela peça de tumorectomia, tumor I com 25mm de maior eixo, tumor II e tumor III com 10mm de maior eixo	Sem metástases	1 ano de trastuzumab	Não realizou NACT
16	72	58	1,56	Filha com neoplasia da mama aos 52a	HTA, pacemaker, quisto renal	Menarca 14a/ G4P2/ 1ªgravidez 22/ Menopausa 44a com THS	Carcinoma invasivo da mama esquerda, unifocal, G2	100	100	20	negativo (0)	Pela peça de tumorectomia, tumor com 14x11x10mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
17	37	52	1,66	Pai faleceu com cancro colon; irmã com neoplasia da lingua	Sem antecedentes pessoais	Menarca 13a/ G2P2/ não está na menopausa	carcinoma invasivo da mama esquerda, unifocal, G3	100	100	80	negativo (0)	Pela peça de tumorectomia, tumor com 15x10x20mm, branco, limites mal definidos.	Com micrometástases	Quimioterapia adjuvante + RT	Não realizou NACT
18	34	63	1,58	Mãe e Tia com neoplasia da mama	Cirurgia urológica	Menarca 13a/ 1ª gravidez 18a/ G2P2/ Não faz ACO	Carcinoma invasivo da mama esquerda, de padrão comum, G1	100	85	25	negativo (1+)	Por TC torácico, 15x23mm de diâmetro	Com metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel	Tratamento a decorrer
19	66	61	1,50	Tia materna morreu com cancro da mama, Mãe com tiróide	Azia (teve H. Pylori)	Menarca 13 anos; Menopausa 48 anos; 1ªgravidez 20 anos; G4P1; 3 IVG	Carcinoma invasivo de padrão comum da mama esquerda, G2	100	30	60	negativo (1+)	Por RMM: 35x26mm	Sem metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel	Pós NACT, tumor com 20mm

Doente	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais	História Ginecológica	Diagnóstico	RE (%)	RP (%)	Ki-67 (%)	Her2	Dimensão do tumor	Gânglios	Tratamentos	Resposta a NACT
20	48	54	1,59	Sem história familiar oncológica	Caucasiana, Sem antecedentes pessoais	Menarca 11a/ 1ª gravidez 30a/ G2P2/ ACO 7 anos	Carcinoma invasivo da mama esquerda, G1	100	80	1	negativo (1+)	Por RMM nódulo com 8mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
21	47	70	1,68	Tia materna com neoplasia da mama	Hérnia inguinal, tunel carpico, nódulo tiróide	Menarca 13a/ 1ª gravidez 27a / G2P2/ Menopausa 47anos	Carcinoma invasivo NST da mama esquerda; G1, bem diferenciado	100	100	50	negativo (0)	Por EO- lesão com 11mm	Com metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel, RT e TAM	Persiste o foco externo e inferior á direita e que atualmente mede 7mm.
22	60	62	1,55	Pai com neoplasia da prostata, irmão faleceu com neoplasia no pâncreas	Artrite reumatóide, doença osteoarticular	Menarca 11a/ G1P1/ Aco 5anos/ Menopausa 52a/ sem THS	Carcinoma invasivo da mama direita. G2	100	90	40	negativo (0)	Nódulo com 21x16mm	Com metástases	NACT com 4AC e 12 semanas de paclitaxel	Tratamento a decorrer
23	52	65	1,62	Sem história familiar oncológica	Sem antecedentes pessoais	Não foi possível concluir	Carcinoma invasivo da mama esquerda, de tipo não especial. G2, calcificações presentes	100	<5	50	negativo (1+)	Tumor com 19mm	Com metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
24	49	60	1,58	Irmã com cancro da mama aos 36 anos.	Ex fumadora	Menaarca 12a/ 1ª gravidez 33a/	Carcinoma invasivo da mama direita, multifocal, G2	95	95	7,7	negativo (1+)	Tumor com 23mm	Com metástases	RT e TAM	Não realizou NACT

Doente	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais	História Ginecológica	Diagnóstico	RE (%)	RP (%)	Ki-67 (%)	Her2	Dimensão do tumor	Gânglios	Tratamentos	Resposta a NACT
25	60	95	1,60	Sem história familiar oncológica	Cirurgia a miomas	Menarca 12anos/Menopausa 56anos/ 1º gravidez 18anos	Carcinoma invasivo da mama esquerda, G2	100	10	10	Negativo (1+)	Tumor com 7mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
26	39	87	1,60	Mãe e tia com cancro da mama; Tio materno faleceu com cancro da mama (52 anos)	Trombocitopenia	Menarca 12anos / 1ªgravidez 27anos	Carcinoma invasivo da mama direita, G2	95	50	23,5	Negativo (1+)	Tumor com 65mm	Com metástases	Quimioterapia após cirurgia	Não realizou NACT
27	45	72	1,58	Avô paterno com carcinoma próstata aos 84 anos	Dois abortos espontâneos; Fumadora	Não foi possível concluir	Carcinoma invasivo da mama direita, G3	negativo	negativo	55,9	negativo	Tumor com 15x20x23mm	Sem metástases	NACT	Resposta parcial
28	57	78	1,69	Mãe com cancro mama aos 43 anos	HTA; Cirurgia a varizes	Menarca 12anos/Menopausa 50anos	Carcinoma invasivo da mama esquerda, padrão ductal, G3	negativo	negativo	50,8	Positivo (3+)	Tumor com 30mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
29	55	74	1,64	Tia, irmã do pai, cancro da mama aos 45 anos;	Gânglios na tiróide	Menarca 12anos/Menopausa 47anos/ 1ªgravidez 23anos	Carcinoma invasivo da mama esquerda, G3	95	negativo	22,4	Negativo (1+)	Tumor com 10x9mm	Com metástases	Quimioterapia após cirurgia	Não realizou NACT
30	69	67	-	Sem história familiar oncológica	HTA	Menarca 12anos/Menopausa 45anos/ 1ªgravidez 26anos	Carcinoma invasivo da mama direita, G2	100	95	30	Negativo	Tumor com 15mm	Sem metástases	Quimioterapia após cirurgia	Não realizou NACT

Doente	Idade	Peso (Kg)	Altura (m)	Antecedentes familiares	Antecedentes pessoais	História Ginecológica	Diagnóstico	RE (%)	RP (%)	Ki-67 (%)	Her2	Dimensão do tumor	Gânglios	Tratamentos	Resposta a NACT
31	77	45	1,54	Sem história familiar oncológica	Deslipidemia; Quisto na trompa aos 40	Menarca 14anos/Menopausa 40anos/ 1ªgravidez 24anos	Carcinoma invasivo da mama esquerda, G3	5	negativo	97	Negativo (1+)	Tumor com 36mm	Sem metástases	NACT	Resposta parcial
32	48	72	1,57	Sem história familiar oncológica	Rinite alérgica; Síndrome depressivo	Não foi possível concluir	Carcinoma invasivo da mama esquerda, G3	negativo	negativo	66,9	negativo	Tumor com 28mm	Sem metástases	RT e TAM	Não realizou NACT
33	84	60	1,63	Pai com cancro do colón	Traumatismo da mama esquerda aos 50 anos; Deslipidemia; Má circulação	Menarca 10anos/Menopausa 53anos	Carcinoma invasivo da mama esquerda, G2	95	25	20	Negativo (1+)	Tumor com 36mm	Com metástases	RT e TAM	Não realizou NACT

4.2- Resultados Obtidos por citometria de fluxo

Para o tratamento dos dados obtidos com a citometria de fluxo foi utilizado o programa *FlowJo*® V10. Para cada doente foi analisado o componente *unstained* da amostra (amostra sem marcação com o *cocktail* de anticorpos, o que permite analisar a autofluorescência normal do tumor) e a amostra que sofreu marcação com os anticorpos.

Foi então criada uma *gate strategy* para a análise das amostras, tomando como exemplo a doente 2:

1º) O primeiro passo da *gate strategy* é obter a percentagem de células que realmente possuímos na amostra. Seleciona-se *side scatter A* (SSC-A), que mede a granularidade, em função do *forward scatter A* (FSC-A), que mede o tamanho das células (Figura 4.2.1). De seguida é criada uma *gate* para as células com um tamanho superior a 50k (Figura 4.2.1), porque o que se encontra abaixo desse valor é considerado lixo, visto que não possui o tamanho suficiente para ser considerado uma célula. Estas contaminações podem ocorrer durante a dissociação da amostra ao triturar ou mesmo na leitura do citómetro se este não estiver limpo. Obtemos então o total de células da nossa amostra, que no caso da doente 2 para a amostra do componente *unstained* é 61,7 %. Este passo da *gate strategy* é realizado para todas as amostras

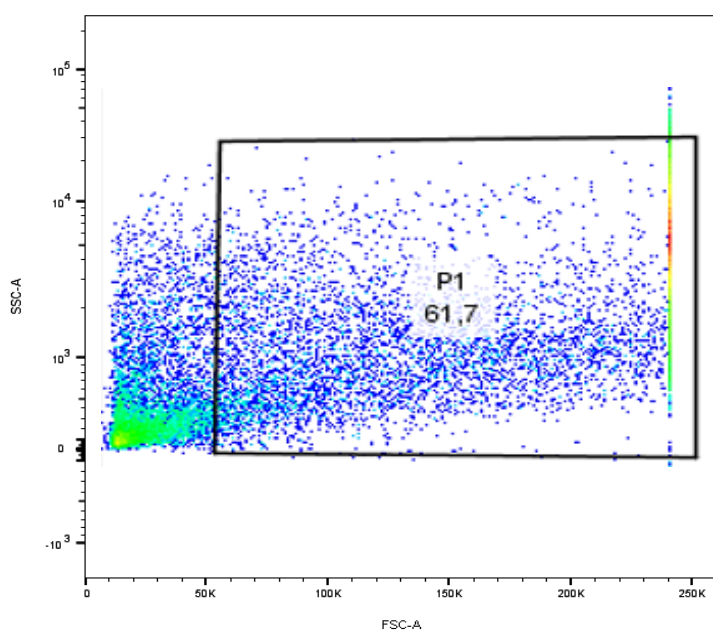


Figura 4.2.1: FlowJo - seleção da *gate* para as células com tamanho superior a 50k para a amostra do componente *unstained* da doente 2.

2º) Por vezes, quando o fluxo de análise está muito rápido, podem passar várias células ao mesmo tempo no feixe de luz. Então para diferenciar o grupo de *single cells* do grupo de agregados, dentro da *gate* P1 anteriormente calculada, seleciona-se FSC-A (mede a área) em função de FSC-H (mede a altura) (Figura 4.2.2). Assim é possível ter controlo de que apenas se mede uma célula de cada vez. Para selecionar a *gate* das *single cell* os pontos mais elevados não são incluídos visto que possuem valores de altura muito alto comparando com a área. (Figura 4.2.2). No caso da doente 2 para a amostra do componente *unstained* obtemos 43,7% de *single cells*. Este passo também é realizado para todas as amostras.

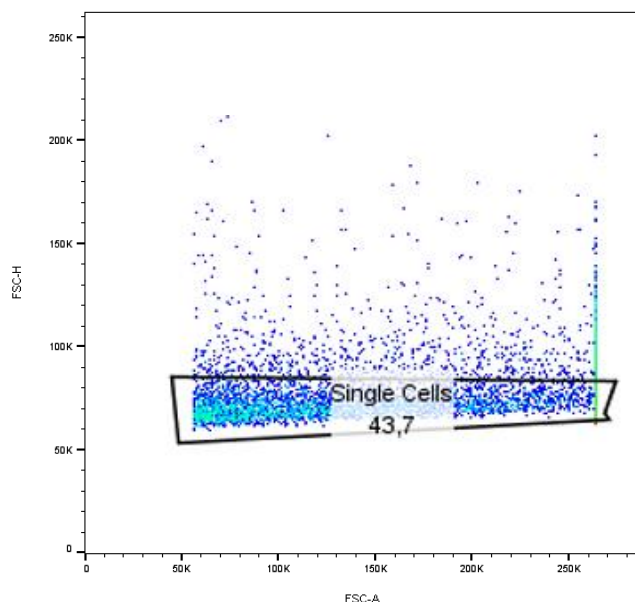


Figura 4.2.2: FlowJo - seleção da *gate* das *Single Cells*, excluindo os pontos mais elevados por possuírem uma altura desproporcional à área, para a amostrado componente *unstained* da doente 2.

3º) Para obtermos a percentagem do anticorpo CD3 na nossa amostra, utiliza-se o resultado obtido com os passos anteriores, para a amostra para o componente *unstained* e para a amostra com a marcação linfocitária, e colocam-se ambos na mesma frequência do anticorpo CD3 para obtermos a sua percentagem, ou seja, coloca-se na frequência “*Comp-PerCP-A*” que corresponde à fluorescência do CD3 na nossa amostra. Ao fazermos uma comparação entre o componente *unstained* e a amostra conseguimos criar uma *gate*, com as células que não se encontram no componente *unstained*, o que corresponde aos linfócitos CD3 presentes na amostra, que no caso da doente 2 tem 81,6% (Figura 4.2.3).

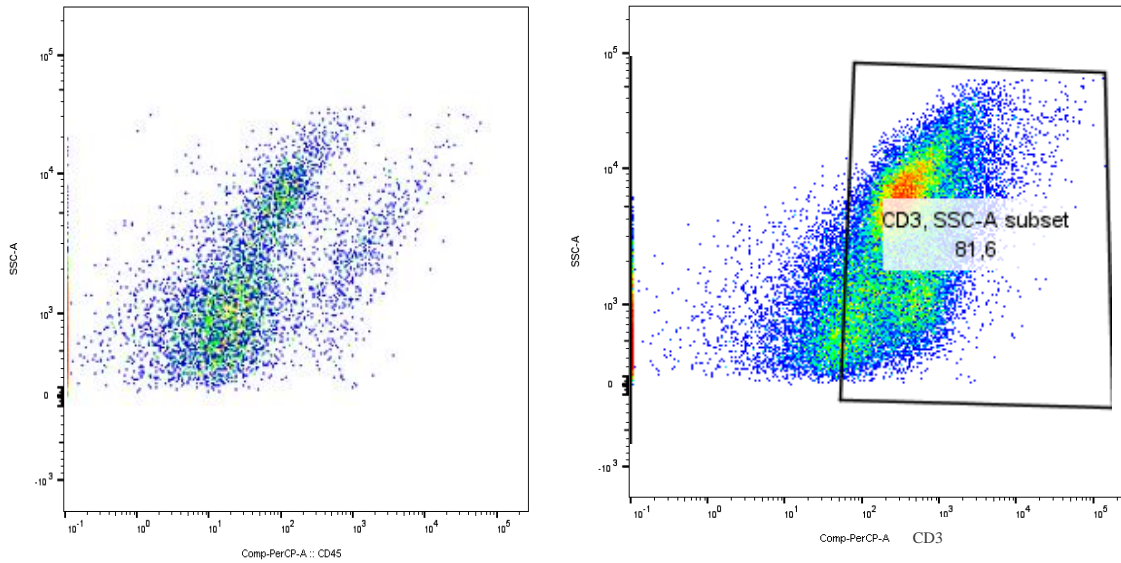


Figura 4 Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar 0 ao texto que deverá aparecer aqui..**2.3:** Flow Jo- Comparação das fluorescências da amostra do componente *unstained* e da amostra com o anticorpo para o CD3, com a frequência “Comp-PerCP-A” e criar a *gate* dos linfócitos CD3 para a doente 2.

4º) Dentro então da *gate* dos linfócitos CD3 avalia-se a percentagem de CD4 e de CD8 dentro dos CD3. Comparando sempre a fluorescência da amostra do componente *unstained* com a mesma fluorescência da amostra, para o caso do CD4 “*Comp-FITC-A*”, cria-se a *gate* correspondente aos linfócitos CD4, que no caso da doente 2 são um total de 77,2% (Figura 4.2.4).

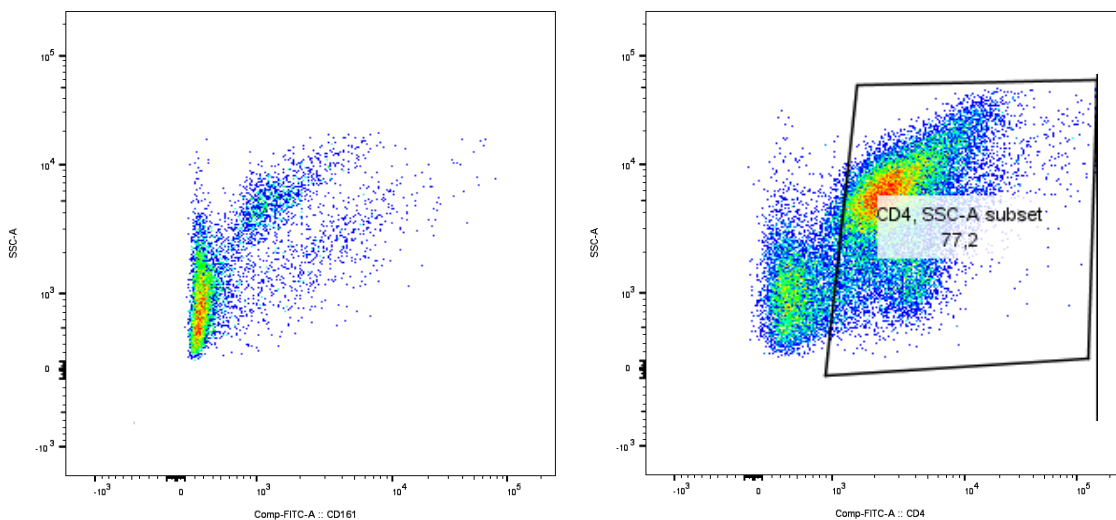


Figura 4.2.4: Flow Jo- Comparação das fluorescências da amostra do componente *unstained* e da amostra com o anticorpo para o CD4, com a frequência “Comp-FITC-A” e criar a *gate* dos linfócitos CD-4 dentro dos CD3 para a doente 2.

Comparando por fim fluorescência da amostra do componente *unstained* com a mesma fluorescência da amostra, para o caso do CD8 “*Comp-PE-A*”, cria-se a *gate* correspondente aos linfócitos CD8 dentro dos CD3, que no caso da doente 2 corresponde a um total de 23% (Figura 4.2.5).

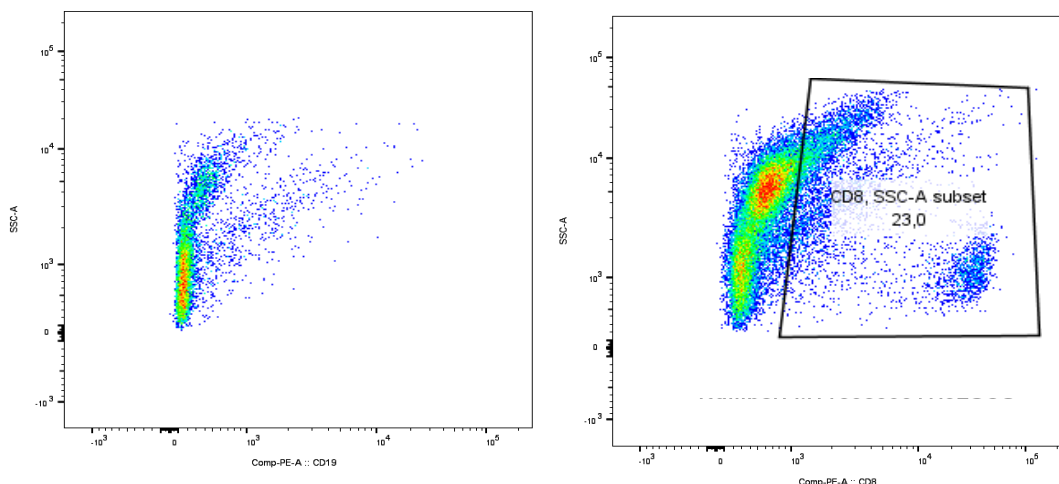


Figura 4.2.5: Flow Jo- Comparação das fluorescências da amostra do componente *unstained* e da amostra com o anticorpo para o CD8, com a frequência “*Comp-PE-A*” e criar a *gate* dos linfócitos CD-8 dentro dos CD3 para a doente 2.

Após a análise por citometria de fluxo foram escolhidos casos com grandes quantidades de linfócitos, casos com poucos linfócitos para compararmos se os resultados obtidos por imunohistoquímica coincidem com os resultados da citometria, e foram escolhidos casos de doentes com uma boa resposta a NACT e sem resposta a NACT de forma a tentar criar uma relação entre os níveis de expressão de linfócitos e a resposta a NACT. Os resultados obtidos por citometria para as doentes seleccionadas encontram-se registados na Tabela 2.

Tabela 2: Percentagens dos linfócitos CD3, CD4 e CD8 apartir da citometria de fluxo das doentes utilizadas para o estudo.

Paciente	CD3 (%)		
1	61,4	CD4 (%)	71,6
		CD8 (%)	22,5
2	81,6	CD4 (%)	77,2
		CD8 (%)	23,0

Paciente	CD3 (%)		
3	50,1	CD4 (%)	80,8
		CD8 (%)	35,1
4	63,5	CD4 (%)	72,9
		CD8 (%)	29,6
5	77,3	CD4 (%)	85,0
		CD8 (%)	14,6
6	16,3	CD4 (%)	74,9
		CD8 (%)	27,6
7	25,0	CD4 (%)	64,3
		CD8 (%)	34,3
8	45,1	CD4 (%)	53,5
		CD8 (%)	36,8
9	77,3	CD4 (%)	81,8
		CD8 (%)	29,8
10	61,5	CD4 (%)	58,7
		CD8 (%)	47,3
11	75,7	CD4 (%)	60,6
		CD8 (%)	35,7
12	43,6	CD4 (%)	30,5
		CD8 (%)	11,1

Paciente	CD3 (%)		
13	86,3	CD4 (%)	58,4
		CD8 (%)	33,8
14	86,0	CD4 (%)	85,4
		CD8 (%)	15,5
15	95,6	CD4 (%)	84,4
		CD8 (%)	27,4
16	95,8	CD4 (%)	75,6
		CD8 (%)	43,0
17	91,3	CD4 (%)	32,8
		CD8 (%)	64,2
18	76,9	CD4 (%)	30,8
		CD8 (%)	15,8
19	22,6	CD4 (%)	44,7
		CD8 (%)	33,9
20	93,4	CD4 (%)	52,4
		CD8 (%)	31,0
21	16,3	CD4 (%)	84,8
		CD8 (%)	16,6
22	81,0	CD4 (%)	74,7
		CD8 (%)	43,9

Paciente	CD3 (%)		
23	63,2	CD4 (%)	48,3
		CD8 (%)	14,8
24	15,5	CD4 (%)	81,2
		CD8 (%)	23,0
25	47,2	CD4 (%)	60,8
		CD8 (%)	39,8
26	14,4	CD4 (%)	76,8
		CD8 (%)	34,0
27	8,72	CD4 (%)	84,1
		CD8 (%)	26,5
28	14,5	CD4 (%)	22,7
		CD8 (%)	80,6
29	4,36	CD4 (%)	73,4
		CD8 (%)	27,6
30	0,65	CD4 (%)	88,4
		CD8 (%)	14,8
31	29,2	CD4 (%)	7,72
		CD8 (%)	2,14

Paciente	CD3 (%)		
32	9,3	CD4 (%)	32,7
		CD8 (%)	65,6
33	33	CD4 (%)	7,9
		CD8 (%)	5,73

4.3- Resultados Obtidos pela técnica de imunohistoquímica para a marcação dos linfócitos CD3, CD4, CD8 e CD20

A análise imunohistoquímica linfocitária apenas foi possível realizar em 29 doentes do nosso estudo devido à perda de tecido entre os cortes histológicos das restantes. Não se obteve marcação linfocitária das doentes 30,31,32,33.

Após a marcação imunohistoquímica das amostras com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD20 foi realizada uma análise onde se tem em conta se a marcação de células linfocitárias é intra ou peritumoral e a quantidade de linfócitos marcados (0,1+,2+,3+). Os resultados obtidos para a marcação linfocitária encontram-se registados na Tabela 3.

Tabela 3: Marcação linfocitária obtida com a técnica de imunohistoquímica em 29 das doentes seleccionadas para o estudo.

		Negativo	Positivo						
			intra			peri			
			1+	2+	3+	1+	2+	3+	
1	CD3			x			x		
	CD4			x			x		
	CD8		x				x		
	CD20		x				x		
2	CD3						x		
	CD4						x		
	CD8						x		
	CD20		x						
3	CD3				x				x
	CD4				x				x
	CD8		x					x	
	CD20		x					x	
4	CD3		x						
	CD4		x						
	CD8		x						
	CD20			x					
5	CD3		x				x		
	CD4		x				x		
	CD8		x				x		
	CD20			x					

		Negativo	Positivo					
			intra			peri		
			1+	2+	3+	1+	2+	3+
6	CD3						x	
	CD4						x	
	CD8					x		
	CD20					x		
7	CD3			x			x	
	CD4			x			x	
	CD8			x			x	
	CD20		x			x		
8	CD3			x			x	
	CD4			x			x	
	CD8		x			x		
	CD20		x			x		
9	CD3			x			x	
	CD4			x			x	
	CD8		x			x		
	CD20		x			x		
10	CD3			x				
	CD4		x					
	CD8		x					
	CD20			x				
11	CD3		x					
	CD4		x					
	CD8		x					
	CD20	x						
12	CD3		x					
	CD4		x					
	CD8		x					
	CD20	x						
13	CD3						x	
	CD4						x	
	CD8					x		
	CD20					x		
14	CD3		x				x	
	CD4		x				x	
	CD8		x				x	
	CD20					x		

		Negativo	Positivo					
			intra			peri		
			1+	2+	3+	1+	2+	3+
15	CD3						x	
	CD4						x	
	CD8					x		
	CD20					x		
16	CD3		x				x	
	CD4		x			x		
	CD8		x				x	
	CD20					x		
17	CD3				x			x
	CD4			x			x	
	CD8			x			x	
	CD20						x	
18	CD3			x				
	CD4			x				
	CD8			x				
	CD20		x					
19	CD3			x				
	CD4			x				
	CD8		x					
	CD20	x						
20	CD3		x					
	CD4		x					
	CD8		x					
	CD20		x					
21	CD3		x					
	CD4		x					
	CD8		x					
	CD20	x						
22	CD3			x			x	
	CD4			x			x	
	CD8		x			x		
	CD20	x						
23	CD3		x				x	
	CD4		x				x	
	CD8		x				x	
	CD20		x				x	

		Negativo	Positivo					
			intra			peri		
			1+	2+	3+	1+	2+	3+
24	CD3		x				x	
	CD4		x				x	
	CD8		x				x	
	CD20						x	
25	CD3						x	
	CD4					x		
	CD8					x		
	CD20					x		
26	CD3		x			x		
	CD4		x			x		
	CD8		x			x		
	CD20	x						
27	CD3		x				x	
	CD4		x				x	
	CD8		x				x	
	CD20					x		
28	CD3				x			x
	CD4			x			x	
	CD8				x			x
	CD20		x			x		
29	CD3		x					
	CD4		x					
	CD8		x					
	CD20	x						

Analisando os resultados obtidos, por exemplo, para a doente 17 com um carcinoma da mama invasivo, observamos para o anticorpo anti-CD3 uma marcação linfocitária intratumoral e peritumoral com um *score* de 3+. A marcação do anticorpo anti-CD3 (2GV6) localiza-se principalmente na membrana de células T maduras (Figura 4.3.1-A) e podemos observar na Figura 4.3.1-B a marcação linfocitária intratumoral 3+ do anticorpo anti-CD3, onde a marcação acastanhada se encontra no centro do tumor. Por outro lado, na Figura 4.3.2, obtivemos uma marcação linfocitária peritumoral 3+, onde existe marcação acastanhada na periferia do tumor.

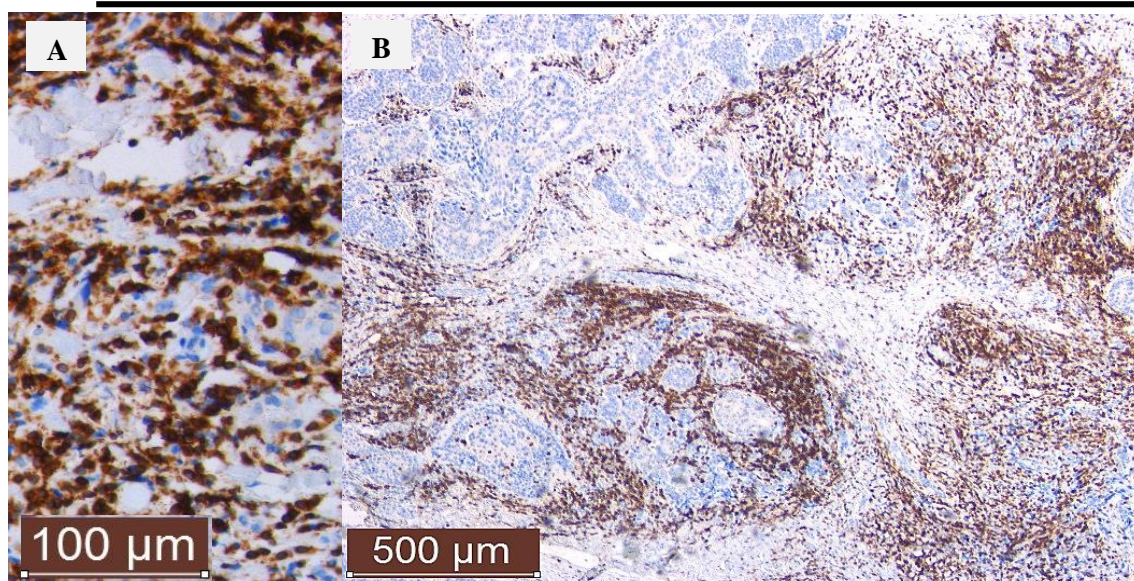


Figura 4.3.1: Marcação imunohistoquímica de anti-CD3; A- marcação da membrana das células T com uma ampliação total de 200x; B- marcação linfocitária intratumoral com um *score* 3+ e com uma ampliação total de 50x.

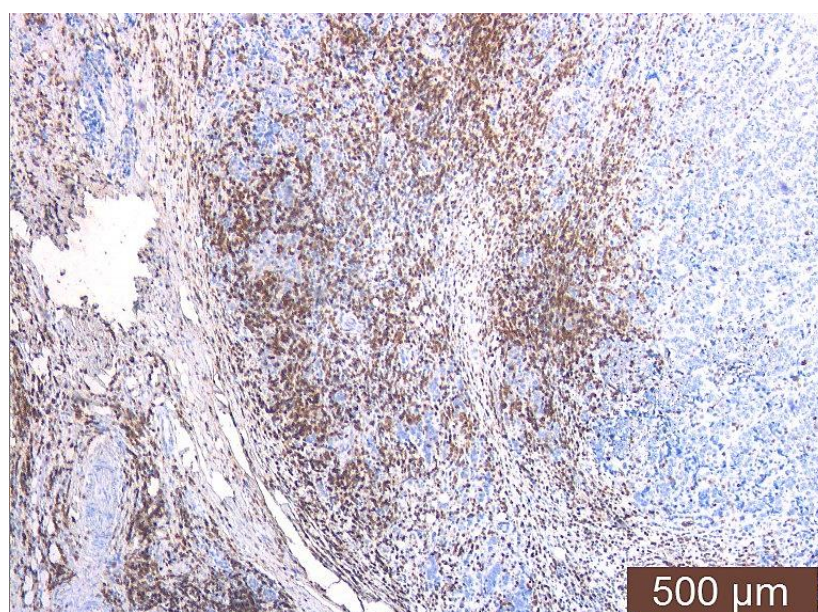


Figura 4.3.2: Marcação linfocitária peritumoral 3+ do anticorpo anti-CD3: marcação acastanhada na periferia do tumor com uma ampliação total de 50x.

Utilizando os resultados obtidos com a marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-CD3 para a doente 27, observamos uma marcação linfocitária intratumoral de 1+ (Figura 4.3.3- A) e uma marcação linfocitária peritumoral de 2+ (Figura 4.3.3- B).

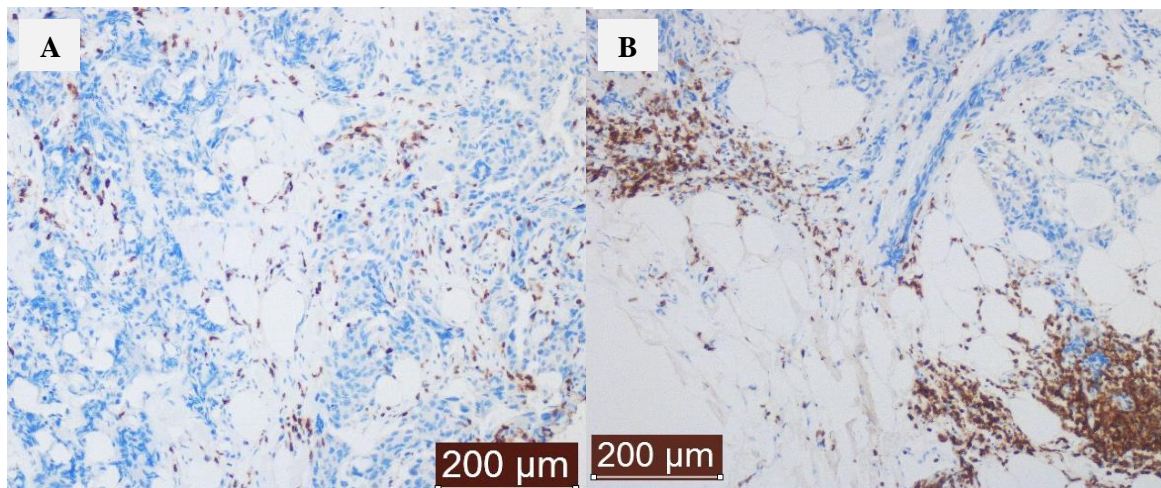


Figura 4.3.3: Marcação imunohistoquímica com anti-CD3 da doente 27, A- marcação linfocitária intratumoral de 1+, com uma ampliação total de 100x; B- marcação linfocitária peritumoral de 2+, com uma ampliação total de 100x

Analisando então a marcação com o anticorpo anti-CD4 (SP35) da doente 17, o padrão de coloração é membranoso e marca as células T *helper-inducer*. Obtivemos uma marcação linfocitária intratumoral de 2+ (Figura 4.3.4) e uma marcação linfocitária peritumoral de 2+ (Figura 4.3.5).

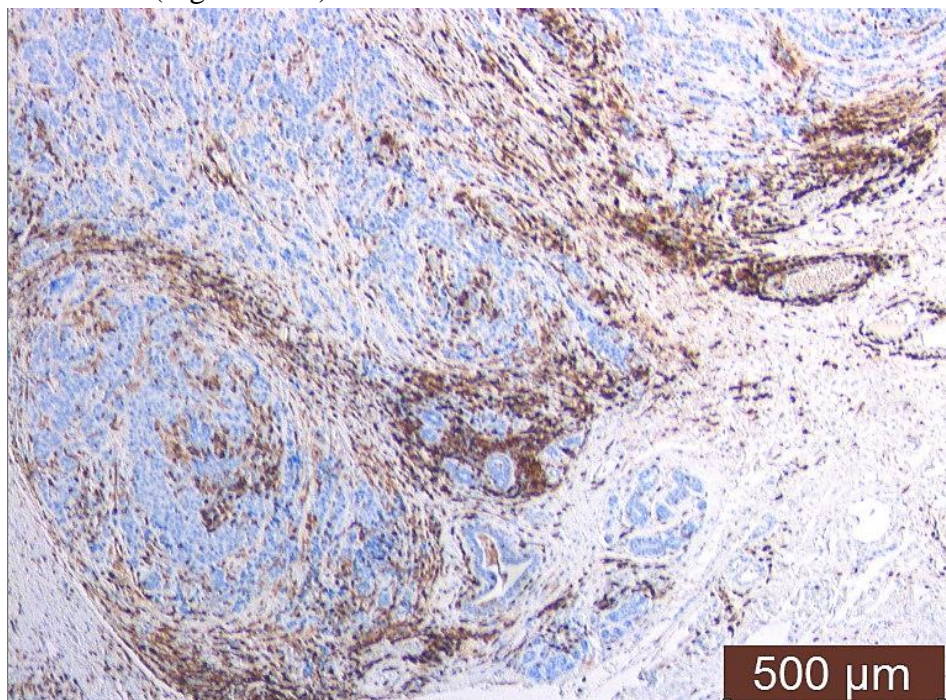


Figura 4.3.4: Padrão de marcação membranoso com o anticorpo anti-CD4 com uma classificação de marcação linfocitária intratumoral 2+, com uma ampliação total de 50x.

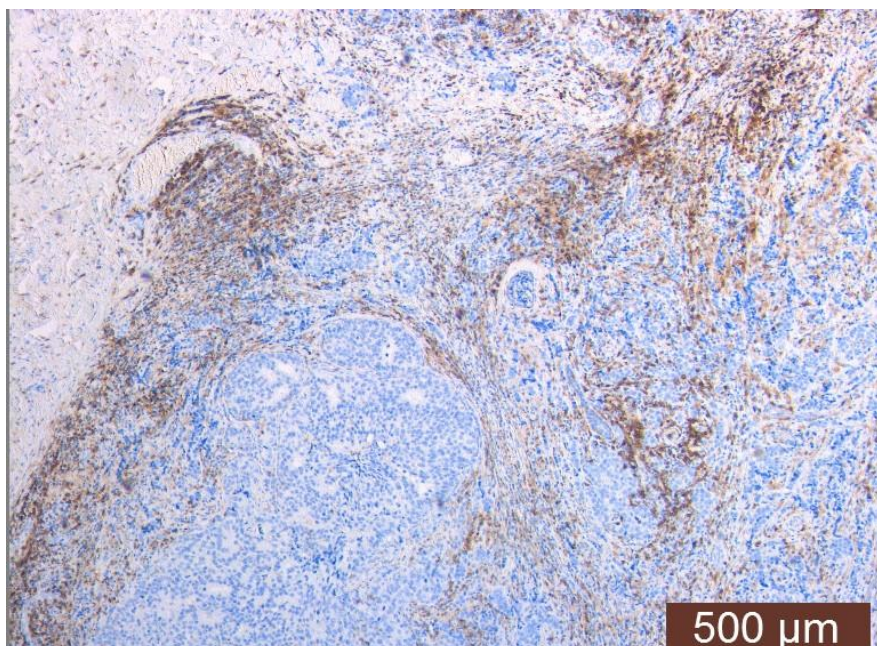


Figura 4.3.5: Padrão de marcação membranoso com o anticorpo anti-CD4 com uma classificação de marcação linfocitária peritumoral 2+, com uma ampliação total de 50x.

Por outro lado, o anticorpo anti-CD8 (SP57) realiza uma marcação membranar nas células T citotóxicas e para a doente 17 obteve-se uma marcação linfocitária intratumoral 2+ (Figura 4.3.6-A) e uma marcação linfocitária peritumoral 2+ (Figura 4.3.6-B). Observa-se uma maior marcação e no centro do tumor na Figura 4.3.6 A, e uma marcação mais suave e na periferia do tumor na Figura 4.3.6 B.

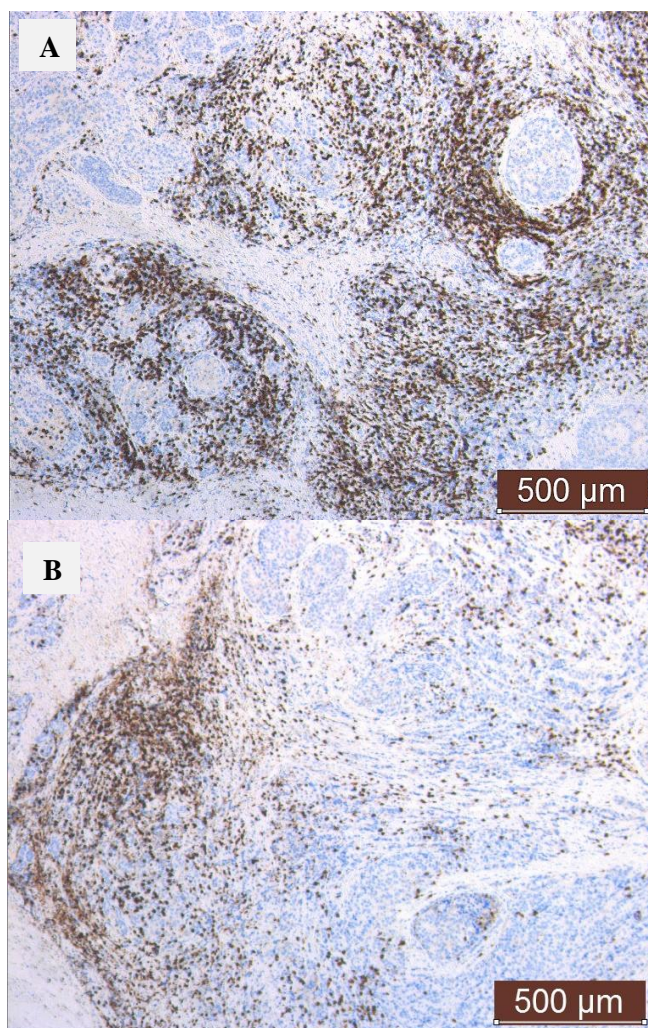


Figura 4.3.6: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8; A- marcação linfocitária intratumoral 2+ com uma ampliação total de 50x; B- marcação linfocitária peritumoral 2+, com uma ampliação total de 50x.

Analisando por fim a marcação com o anticorpo anti-CD20 (L26), também realiza uma marcação membranar mas neste caso de células B. Na Figura 4.3.7-A verificamos a marcação linfocitária peritumoral 2+ para a doente 3 e na Figura 4.3.7-B observamos uma marcação linfocitária negativa tanto no centro do tumor como na sua periferia para a doente 26.

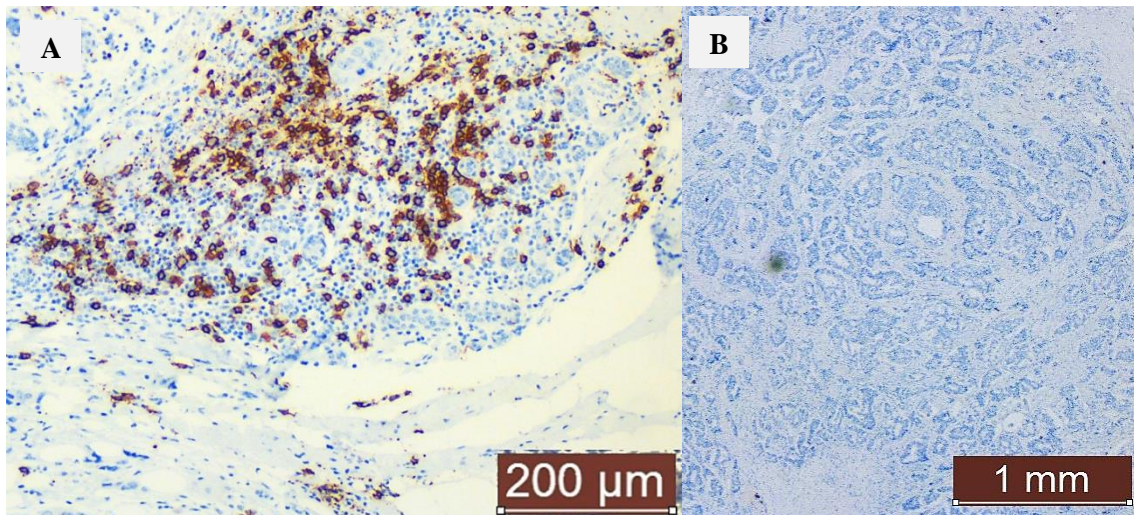


Figura 4.3.7: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD20, A- marcação linfocitária peritumoral 2+ da doente 3, com uma ampliação total de 100x; B- marcação linfocitária negativa da doente 26, com uma ampliação total de 25x.

4.4- Resultados Obtidos pela técnica de imunohistoquímica para a marcação de PD-L1

A análise imunohistoquímica com o anticorpo PD-L1 apenas foi possível realizar em 27 doentes do nosso estudo devido à perda de tecido entre os cortes histológicos das restantes. Não se obteve marcação linfocitária das doentes 5, 6,9,19,21 e 22.

Após a marcação das amostras com o anticorpo anti-PD-L1 foi realizada uma análise a estruturas celulares morfológicamente distintas: ao *tumour infiltrating lymphocytes* (TILS) e às células tumorais. A expressão de PD-L1 é considerada positiva quando ocorre em mais do 5% das células tumorais. Os resultados obtidos para a marcação de PD-L1 encontram-se registados na Tabela 4.

Tabela 4: Marcação com o anticorpo anti-PD-L1 obtida com a técnica de imunohistoquímica em 27 das doentes selecionadas para o estudo. As doentes 5, 6,9,19,21 e 22 foram excluídas da marcação com PD-L1.

	Células Tumorais (%)	TILS			
		0	1	2	3
1	0	x			
2	0	x			
3	0		x		
4	5		x		
7	0	x			
8	0		x		
10	0	x			
11	0	x			
12	0	x			

13	0	x			
14	0			x	
15	0	x			
16	0	x			
17	10				x
18	0			x	
20	0	x			
23	0	x			
24	50%	x			
25	0	x			
26	0	x			
27	0		x		
28	1-9%			x	
29	0	x			
30	0	x			
31	1-10%	x			
32	30%				x
33	0	x			

O anticorpo anti-PD-L1 realiza uma marcação membranar nas células tumorais. Para o estudo imunohistoquímico do anticorpo anti-PD-L1 foram usados como controlo amígdala e placenta (Figura 4.4.1), onde é possível observar uma marcação membranar acastanhada.

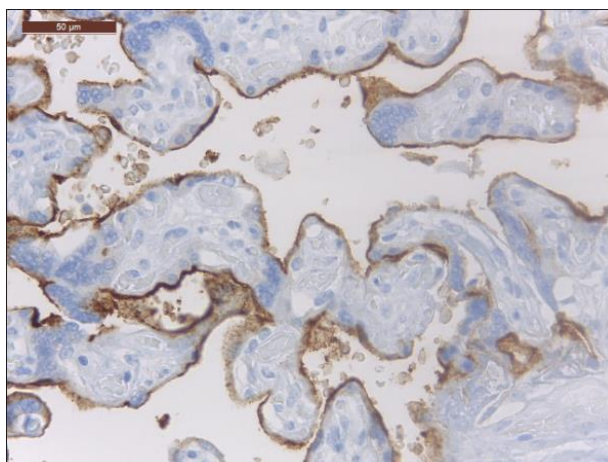


Figura 4.4.1: Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-PD-L1 no teste de controlo positivo de placenta, com uma ampliação total de x40.

As células tumorais apresentavam uma cromatina condensada, núcleos aumentados e citoplasmas também aumentados e mal definidos. A Figura 4.4.2-A corresponde à marcação positiva pelo anticorpo anti-PD-L1 das células tumorais da doente 17, com uma marcação acastanhada de cerca de 10%.

Por outro lado as células linfocitárias apresentavam cromatina pouco densa, núcleos mais pequenos e condensados e citoplasmas prolongados. Na Figura 4.4.2-B observamos uma marcação 3+ com anticorpo anti-PD-L1 acastanhada nas células imunes.

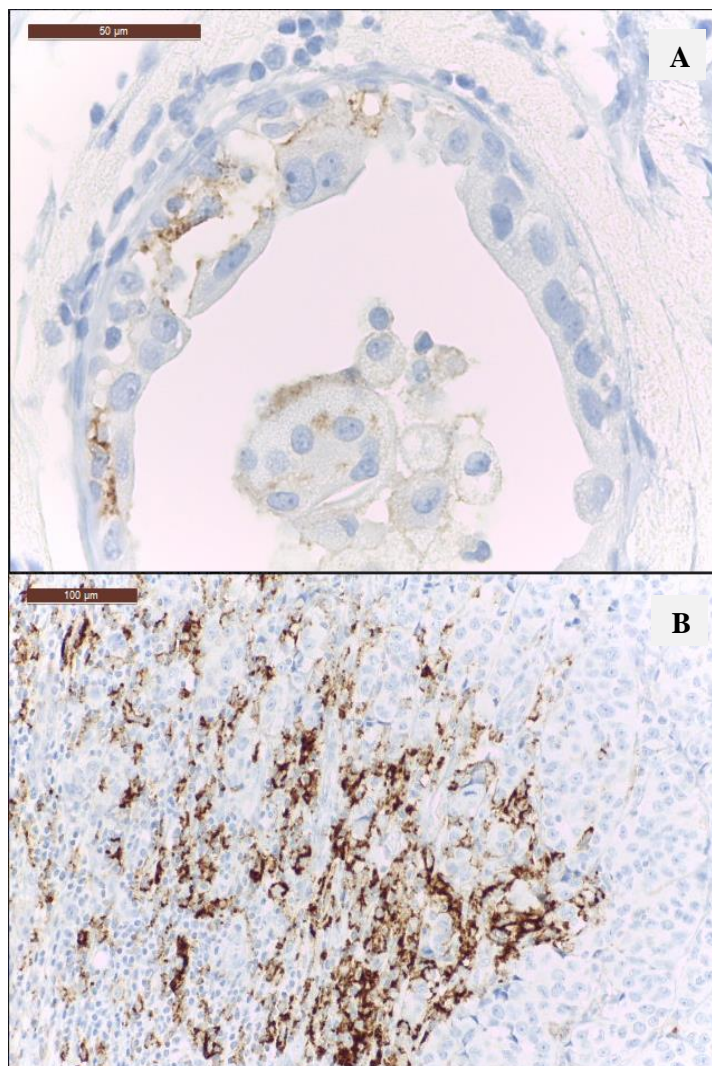


Figura 4.4.2: Marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-PD-L1, A- marcação de 10% das células tumorais, com uma ampliação total de 63x; B- marcação linfocitária 3+, com uma ampliação total de 20x.

4.5- Corelação entre os resultados obtidos por imunohistoquímica e citometria de fluxo

Um dos objetivos do nosso estudo era comparar se os resultados obtidos com a marcação imunohistoquímica corroboram os resultados obtidos através da citometria de fluxo. Para o tratamento dos dados obtidos utilizou-se o programa *GraphPad (software Prism 7)*.

Na Figura 4.5.1 observamos a percentagem de CD3 obtida pela técnica de citometria de fluxo, calculada através do *FlowJo*, em função da marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-CD3, classificada em scores de 0, 1+, 2+ e 3+. A marcação imunohistoquímica foi dividida em intratumoral e peritumoral, no entanto, em citometria de fluxo esta divisão não acontece, então fomos comparar o total da percentagem de CD3 na amostra obtida por citometria tanto com a marcação imunohistoquímica intratumoral como a marcação imunohistoquímica peritumoral. O esperado seria que a uma marcação imunohistoquímica baixa correspondesse um menor valor de percentagem de CD3 obtido por citometria, no entanto, ao observamos os graficos 1a e 1b, vemos que tal não acontece quer na marcação intratumoral ou peritumoral, porém os dados apresentados não foram estatisticamente significativos para a correlação. Ou seja, não se observa correlação entre os dados de citometria de fluxo e de imunohistoquímica.

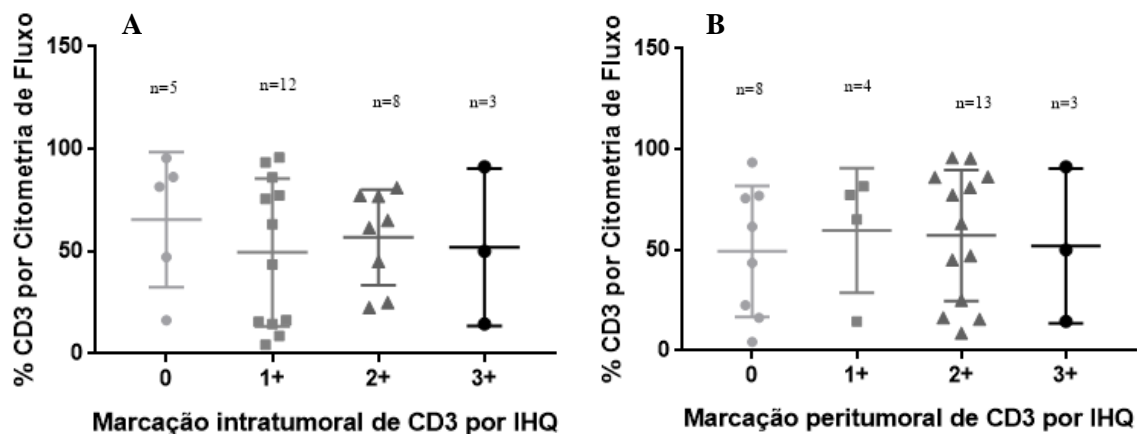


Figura 4.5.1: Comparação entre a percentagem de células CD3 obtida por citometria de fluxo com a marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD3, **A-** marcação imunohistoquímica intratumoral do anticorpo anti-CD3; **B-** marcação imunohistoquímica peritumoral do anticorpo anti-CD3.

Para a comparação entre as percentagens de CD4 e CD8 foi calculada, com a utilização do programa *Flow Jo*, a frequência destas células em função ao número das *single cell*. Na Figura 4.5.2-A e 4.5.2-B observamos a percentagem de células CD4 obtida por citometria de fluxo em função da marcação imunohistoquímica do antiorno anti-CD4. Os resultados obtidos também não apresentaram valores estatisticamente significativos para a correlação. Ou seja, de novo não se observa correlação entre os dados obtidos por citometria e os dados obtidos por imunohistoquímica.

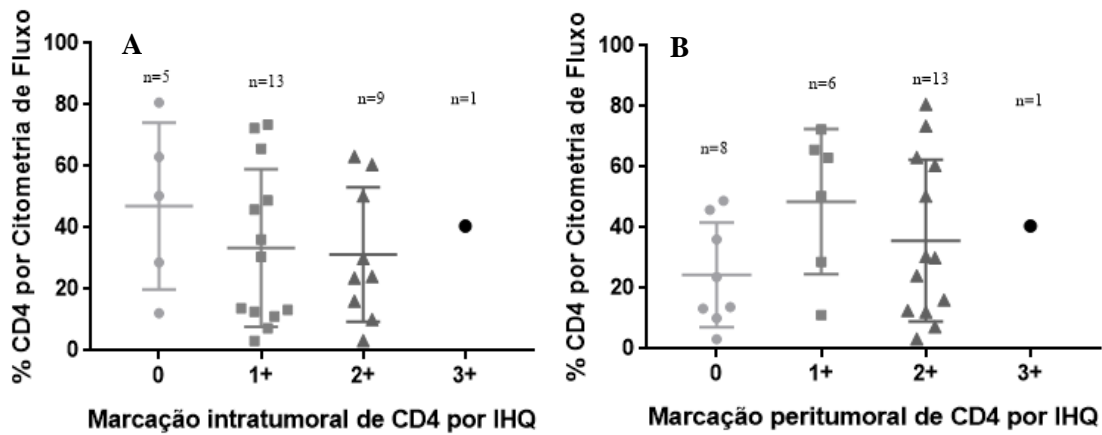


Figura 4.5.2: Comparação entre a percentagem de células CD4 obtida por citometria de fluxo com a marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD4, A- marcação imunohistoquímica intratumoral com o anticorpo anti-CD4; B- marcação imunohistoquímica peritumoral com o anticorpo anti-CD4.

Na Figura 4.5.3-A e na Figura 4.5.3-B observamos a percentagem de células CD8 obtida por citometria de fluxo em função da marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8 mas os resultados não terem sido estatisticamente significativos para a existência de correlação, ou seja, também não se observar a existência de correlação entre os dados obtidos por citometria e os dados obtidos por imunohistoquímica.

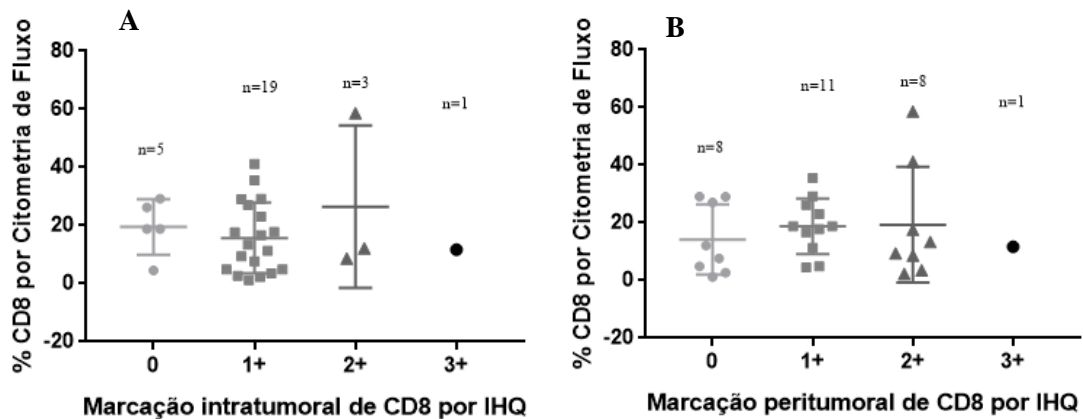


Figura 4.5.3: Comparação entre a percentagem de células CD8 obtida por citometria de fluxo com a marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8, A- marcação imunohistoquímica intratumoral com o anticorpo anti-CD8; B- marcação imunohistoquímica peritumoral com o anticorpo anti-CD8.

4.6- Corelação entre os resultados obtidos por imunohistoquímica e dados clínico-patológicos

4.6.1- Linfócitos/PD-L1 e o Grau histológico

O primeiro dado clínico que se relacionou com os dados imunohistoquímicos foi o grau histológico (Grau 1, Grau 2, Grau 3). Comparou-se a avaliação imunohistoquímica obtida para a marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3 intratumoral e para a marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3 peritumoral em função do grau histológico (Figura 1.6.1.1). Observa-se uma maior incidência de casos com grau histológico 2 e para a marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3 intratumoral há uma maior incidência na marcação 1+ (Figura 4.6.1.1-A). Por outro lado, na marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3 peritumoral há uma maior incidência de casos com uma marcação linfocitária 2+ de CD3 (Figura 4.6.1.1-B). Ao realizar uma comparação entre os diferentes graus histológicos do tumor e os scores da marcação com o anticorpo anti-CD3, verifica-se que a tumores de grau histológico mais elevado corresponde mais marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3. No entanto não foram obtidos resultados estatisticamente significativos para a correlação. O facto de existir um número reduzido de amostras para tumores de grau 3 pode não ajudar no poder estatístico. Sugere então que existe menor marcação com o anticorpo anti-CD3 nos linfócitos intratumorais e mais marcação nos linfócitos peritumorais.

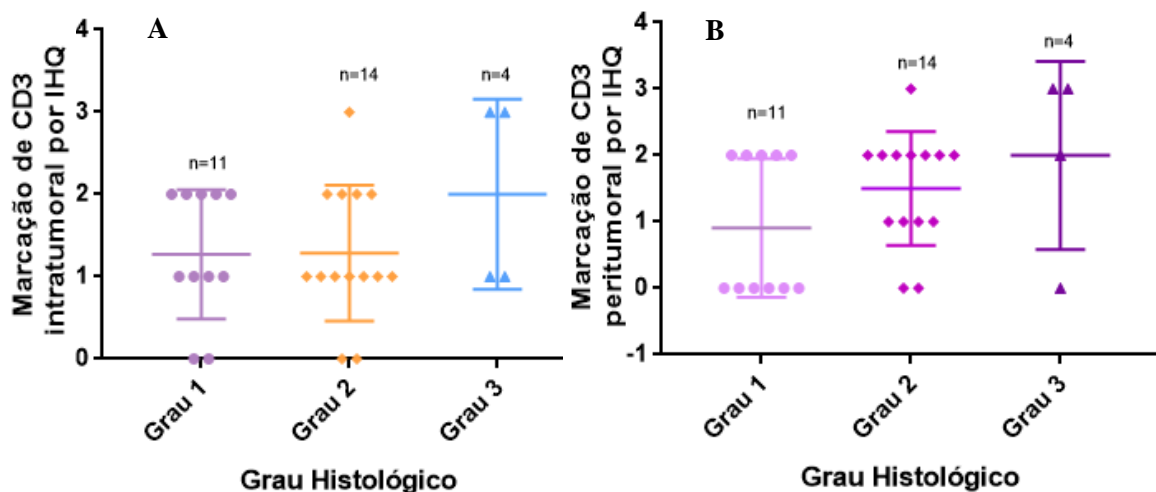


Figura 4.6.1.1: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD3 em função do grau histológico do tumor- **A:** marcação linfocitária intratumoral; **B-** marcação linfocitária peritumoral.

Realizou-se a mesma análise para a marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD4 (Figura 4.6.1.2) e observa-se que para a marcação de linfócitos intratumorais, tal como para a marcação de linfócitos intratumorais com o anticorpo anti-CD3, há uma maior incidência da marcação linfocitária 1+ com o anticorpo anti-CD4 nos tumores de grau histológico 2 (Figura 4.6.1.2-A). Para a marcação linfocitária peritumoral observa-se incidência de marcação linfocitária 1+ e 2+ com o anticorpo anti-CD4 para tumores de grau histológico 2, mas também uma incidência de marcação linfocitária nula com o anticorpo anti-CD4 para tumores de grau histológico 1 (Figura 4.6.1.2-B), no entanto, os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos para se estabelecer uma correlação. Sugere então que para a marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD4 existe uma maior incidência de marcação de linfócitos intratumorais do que peritumorais, possuindo a marcação linfocitária peritumoral um maior número de casos com marcação linfocitária nula com o anticorpo anti-CD4.

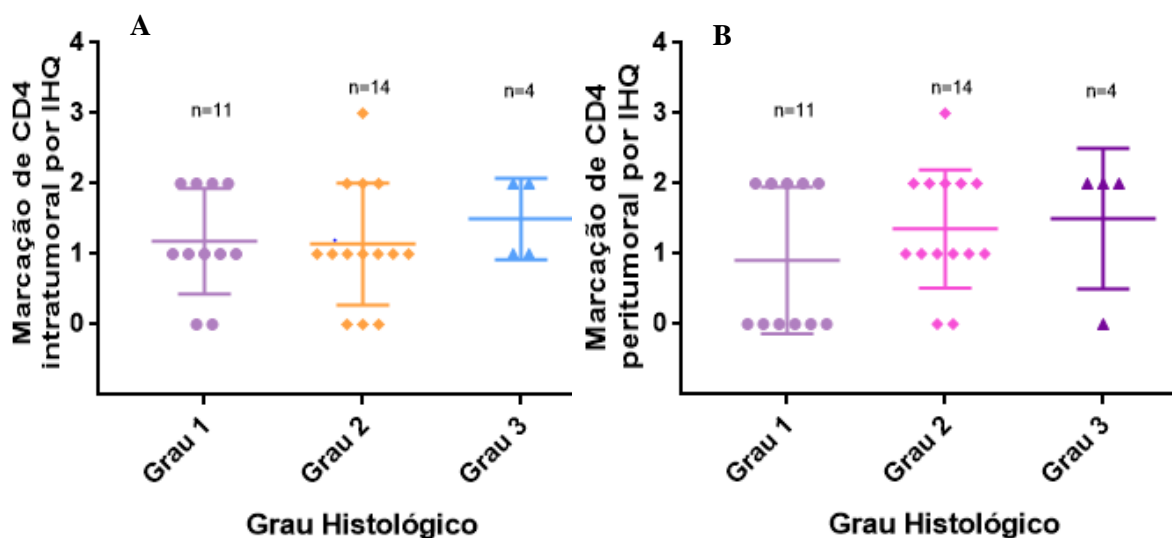


Figura 4.6.1.2: Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-CD4 em função do grau histológico do tumor- **A:** marcação linfocitária intratumoral; **B-** marcação linfocitária peritumoral.

Por outro lado, na análise com o anticorpo anti-CD8 na marcação linfocitária intratumoral obteve-se um valor de p estatisticamente significativo de 0.0297 entre tumores de grau histológico elevado (Grau2-Grau3) (Figura 4.6.1.3.A) e pode-se observar que há uma maioria de marcação linfocitária 1+ com o anticorpo anti-CD8 para tumores com grau histológico 2. Na marcação linfocitária peritumoral também se obteve um valor de p estatisticamente significativo de 0.0278 entre tumores de Grau1/Grau2 (Figura 4.6.1.3-B) e pode-se observar que também para a marcação linfocitária peritumoral a

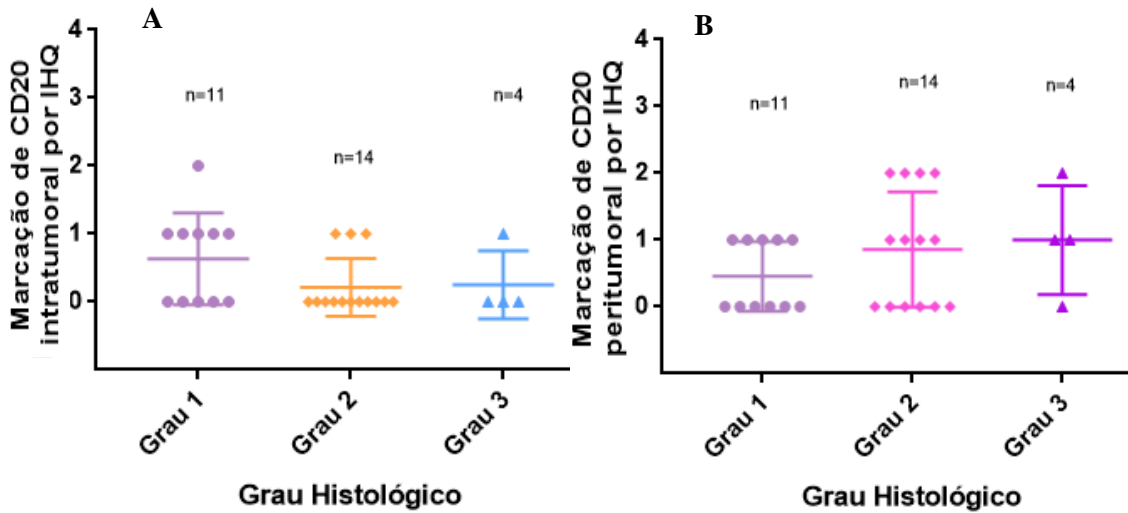


Figura 4.6.1.4: Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-CD20 em função do grau histológico do tumor- **A:** marcação linfocitária intratumoral; **B-** marcação linfocitária peritumoral.

Ao analisar os resultados da marcação com o anticorpo anti-PD-L1, observa-se que para a marcação imunohistoquímica das células imunes (Figura 4.6.1.5-A) há uma maior prevalência de marcação linfocitária nula em tumores de grau 2 e que apenas existe marcação linfocitária 3+ de PD-L1 em tumores de grau histológico 3. Para a marcação de células tumorais (Figura 4.6.1.5-B), existe uma grande incidência de marcação tumoral nula com o anticorpo anti-PD-L1 para tumores de grau 2. Os dados foram estatisticamente significativos entre tumores de grau1/grau3 com $\rho=0.0150$ e entre tumores de grau elevado (grau2/grau3) com $\rho= 0.0259$, o que dá poder estatístico a esta correlação. Isto sugere que o PD-L1 tem maior marcação de células tumorais em tumores com grau histológico mais elevado. Este é um dos resultados mais importantes deste trabalho.

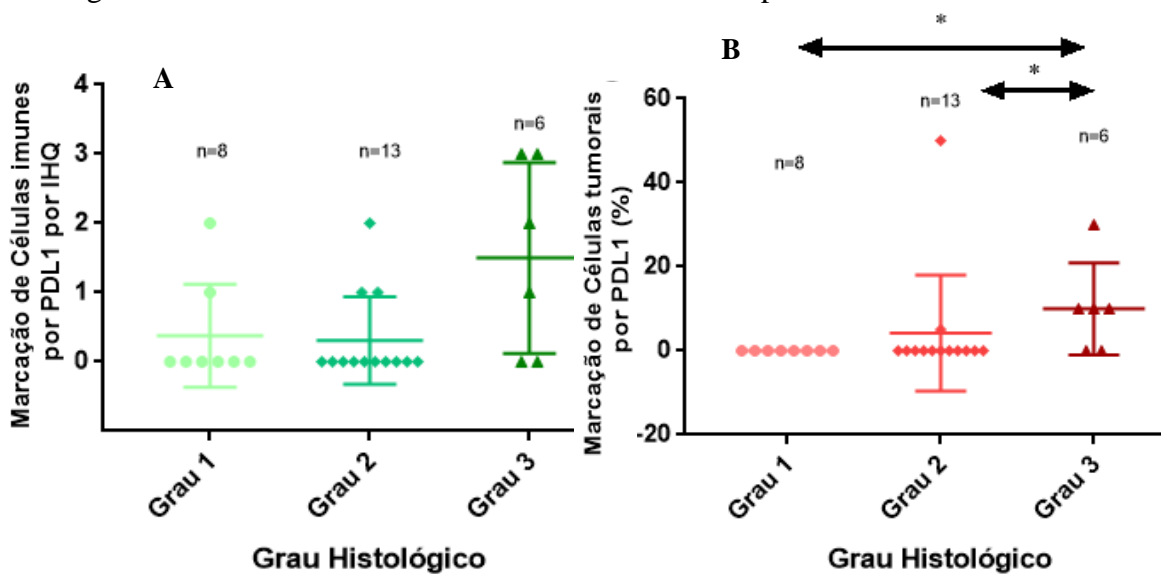


Figura 4.6.1.5: Marcação imunohistoquímica do anticorpo PD-L1 em função do grau histológico do tumor- **A:** marcação das células imunes; **B-** marcação das células tumorais, * ρ value estatisticamente significativo, Grau2-Grau3: $\rho=0.0259$, Grau1-Grau3: $\rho= 0.0150$.

4.6.3- Linfócitos/PD-L1 e os gânglios linfáticos

Foi-se então avaliar a marcação das subpopulações linfocitárias e a marcação imunohistoquímica de PD-L1 em relação aos gânglios linfáticos axilares excisados, ou seja, com o facto de estes possuírem ou não metástases.

Para a marcação linfocitária intratumoral com o anticorpo anti-CD3 (Figura 4.6.3.1-A) podemos observar uma maior incidência de marcação linfocitária 1+ com o anticorpo anti-CD3 para gânglios invadidos, enquanto que na marcação linfocitária peritumoral com o anticorpo anti-CD3 (Figura 4.6.3.1-B) há uma maior incidência de marcação linfocitária 2+ com o anticorpo anti-CD3 para casos com gânglios invadidos. Isto sugere que há maior marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3 em gânglios axilares invadidos.

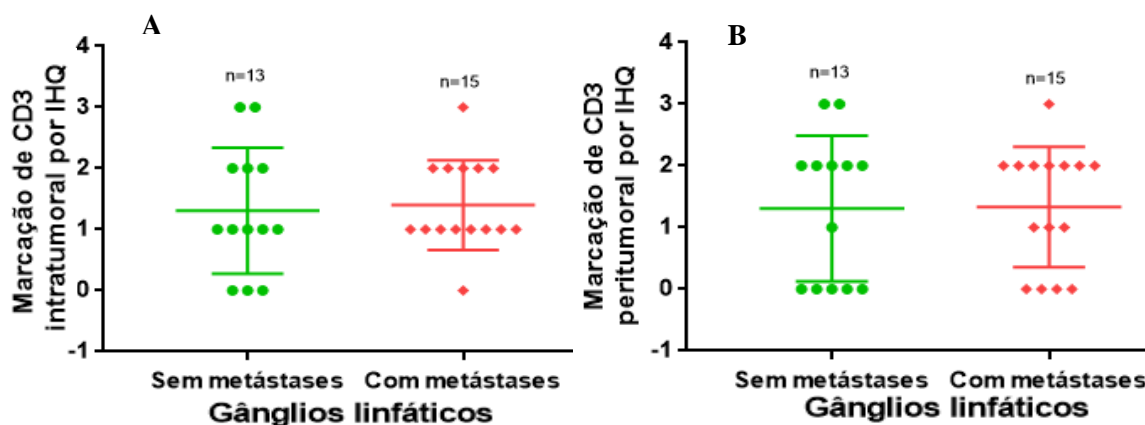


Figura 4.6.3.1: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD3 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos; A- marcação intratumoral; B- marcação peritumoral.

No caso da marcação com o anticorpo anti-CD4, na marcação linfocitária intratumoral (Figura 4.6.3.2-A) observamos também uma maior incidência de marcação linfocitária 1+ com o anticorpo anti-CD4 nos gânglios invadidos, enquanto que na marcação linfocitária peritumoral com o anticorpo anti-CD4 (Figura 4.6.3.2-B) há uma maior incidência de marcação linfocitária 2+ com o anticorpo anti-CD4 para casos com gânglios com metástases. Isto sugere que há maior marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD4 em gânglios axilares invadidos.

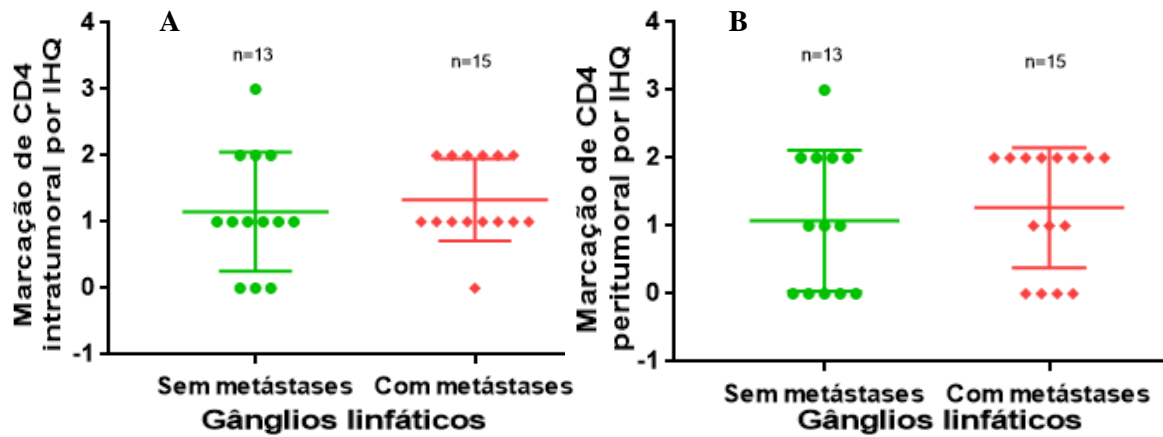


Figura 4.6.3.2: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD4 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos; A- marcação linfocitária intratumoral; B- marcação linfocitária peritumoral.

Na marcação linfocitária intratumoral (Figura 4.6.3.3-A) e peritumoral (Figura 4.6.3.3-B) com o anticorpo anti-CD8 observa-se a mesma análise realizada com o anticorpo anti-CD3 e o anticorpo anti-CD4, que há maior marcação linfocitária nos gânglios axilares invadidos.

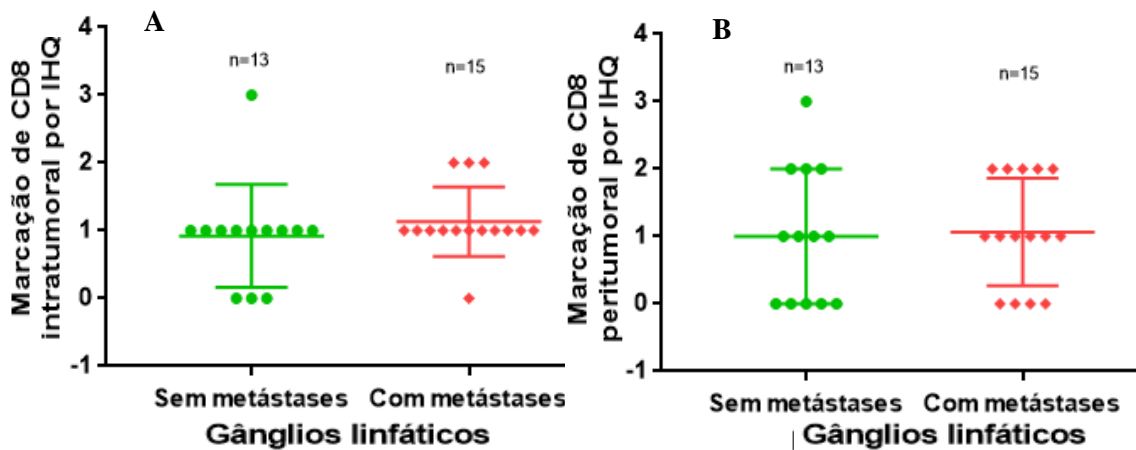


Figura 4.6.3.3: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD8 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos; A- marcação linfocitária intratumoral; B- marcação linfocitária peritumoral.

Para a marcação com o anticorpo anti-CD20, na marcação linfocitária intratumoral (Figura 4.6.3.4-A) para os gânglios sem metástases existe uma maior prevalência de marcação linfocitária nula para o anticorpo anti-CD20 e para gânglios invadidos existe uma maior prevalência de marcação linfocitária 1+. No casos da marcação linfocitária peritumoral com o anticorpo anti-CD20 (Figura 4.6.3.4-B) a

marcação linfocitária nula é maioritária para ambos os tipos de gânglios, invadidos e não invadidos.

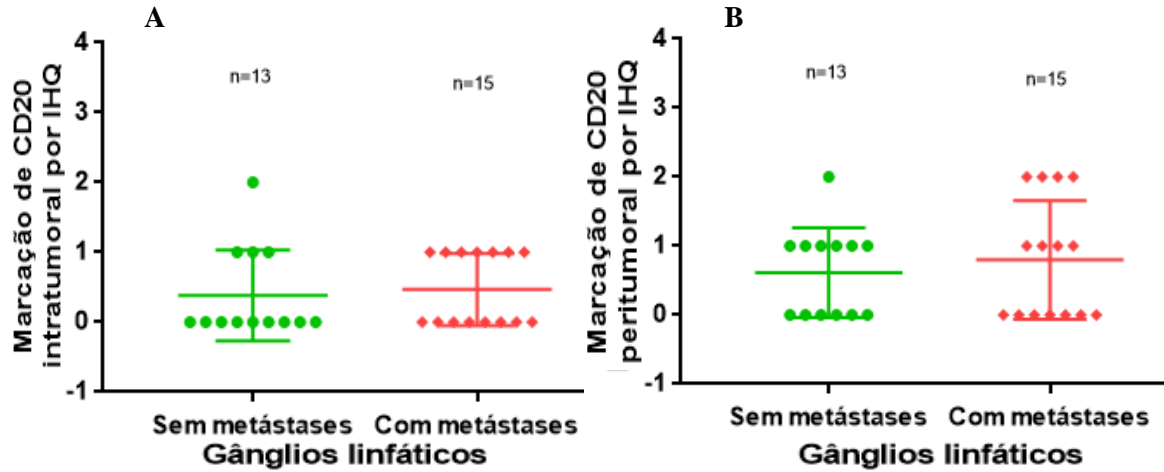


Figura 4.6.3.4: Marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-CD20 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos; A- marcação linfocitária intratumoral; B- marcação linfocitária peritumoral.

Para a marcação com o anticorpo anti-PD-L1, observa-se que tanto a marcação imunohistoquímica das células imunes (Figura 4.6.3.5-A), como a marcação imunohistoquímica de células tumorais (Figura 4.6.3.5-B) há uma grande prevalência de marcação imunohistoquímica nula em ambos os tipos de gânglios. Sugere que o PD-L1 não está presente na maior parte das células imunes nem nas células tumorais para gânglios com metástases, enquanto que nos gânglios sem invasão há maior marcação imunohistoquímica com o anticorpo anti-PD-L1 nas células imunes.

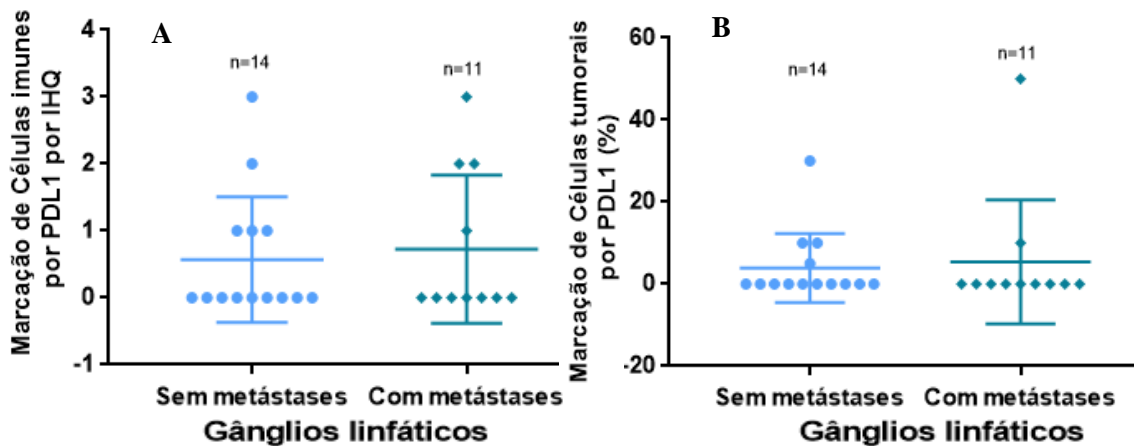


Figura 4.6.3.5: Marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-PD-L1 em função da invasão ou não invasão dos gânglios linfáticos - A: marcação das células imunes; B- marcação das células tumorais.

4.6.4- Linfócitos/PD-L1e o nível de expressão de Ki67

De seguida, relacionou-se os dados obtidos com o índice de proliferação celular, o ki67. Para a marcação com o anticorpo anti-CD3, tanto na marcação linfocitária intratumoral (Figura 4.6.4.1-A) quer na marcação linfocitária peritumoral (Figura 4.6.4.1-B), a uma marcação linfocitária 3+ com o anticorpo anti-CD3 correspondem níveis de expressão de ki67 mais elevados.

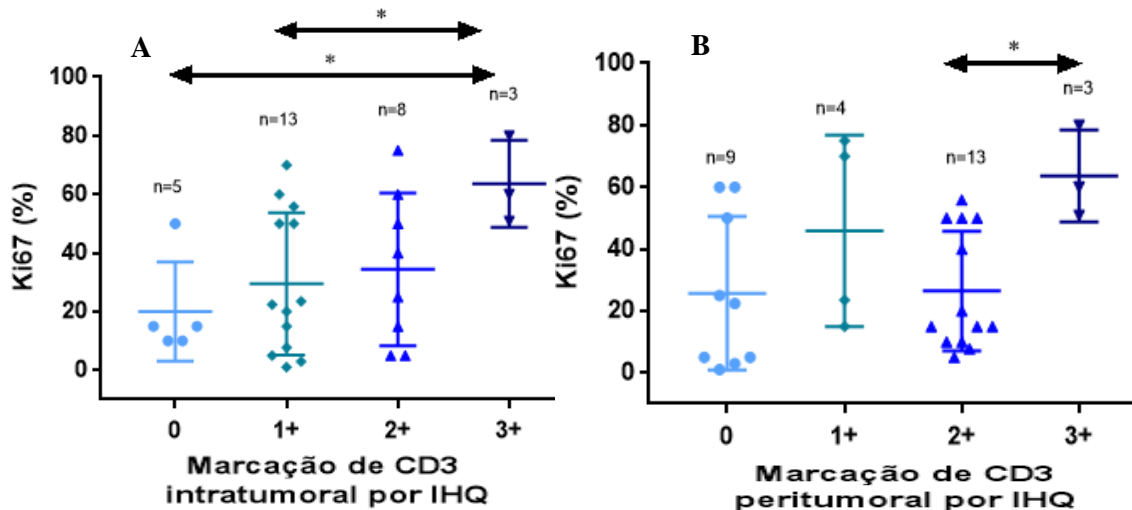


Figura 4.6.4.1: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD3- **A:** marcação linfocitária intratumoral, * ρ value estatisticamente significativo, 0/3+: $\rho=0.0179$, 1+/3+: $\rho=0.0446$; **B-** marcação linfocitária peritumoral, * ρ value estatisticamente significativo, $\rho=0.0071$.

No caso da marcação com o anticorpo anti-CD4, observamos que para a marcação linfocitária intratumoral (Figura 4.6.4.2-A) há uma maior incidência de casos com marcação linfocitária de 1+ com o anticorpo anti-CD4 e uma marcação linfocitária peritumoral (Figura 4.6.4.2-B) há uma maior incidência da marcação linfocitária 2+, às quais corresponde a maior parte dos valores de ki67 mais elevados.

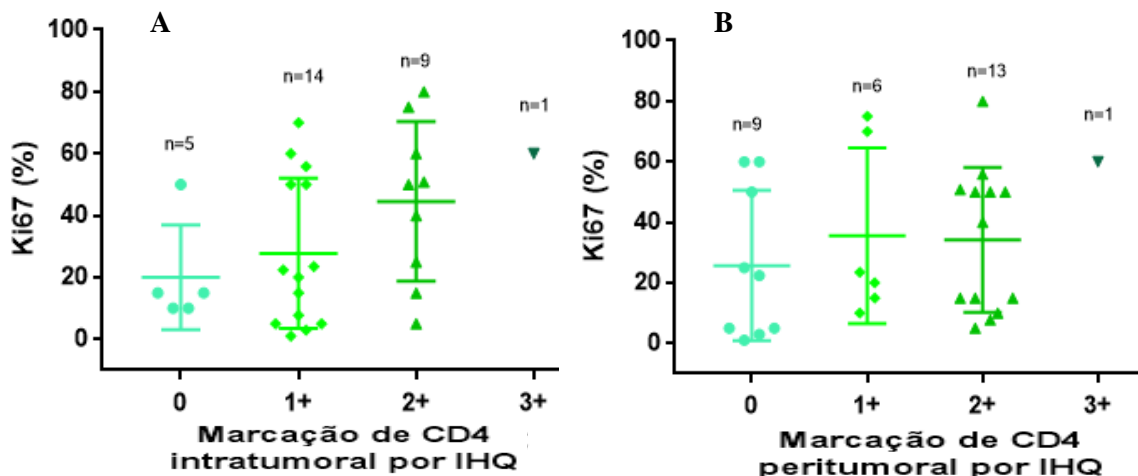


Figura 4.6.4.2: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti-CD4 - **A:** marcação linfocitária intratumoral; **B-** marcação linfocitária peritumoral.

Para a marcação com o anticorpo anti-CD8, na marcação linfocitária intratumoral (Figura 4.6.4.3-A) há uma grande incidência de casos com marcação linfocitária 1+ com o anticorpo anti-CD8, aos quais correspondem as percentagens de ki67 mais elevadas. Por outro lado, para a marcação linfocitária peritumoral (Figura 4.6.4.3-B), os resultados encontram-se uniformemente distribuídos.

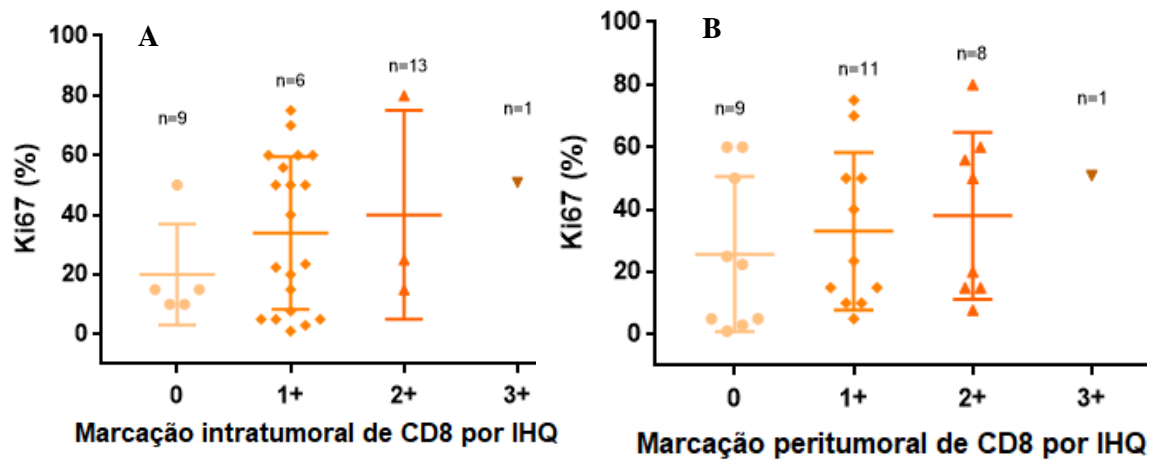


Figura 4.6.4.3: Expressão de ki-67 em função da marcação linfocitária com o anticorpo anti- CD8 - A: marcação linfocitária intratumoral; B- marcação linfocitária peritumoral.

Para a marcação com o anticorpo anti- CD20, observamos que tanto para a marcação intratumoral (Figura 4.6.4.4-A) como na marcação peritumoral (Figura 4.6.4.4-B), há uma maior incidência de casos com marcação nula de CD20 e não se consegue estabelecer qualquer relação entre a marcação com o anticorpo anti-CD20 e a expressão de Ki67..

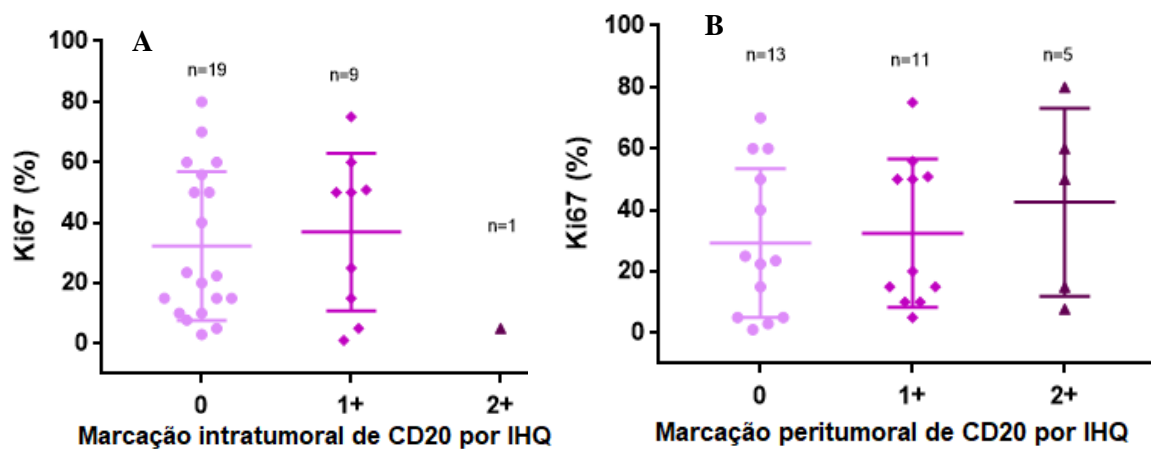


Figura 4.6.4.4: Expressão de ki-67 em função da marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-CD20 - A: marcação intratumoral; B- marcação peritumoral.

Nos resultados obtidos para o anticorpo anti-PD-L1 pode-se observar que na marcação das células imunes (Figura 4.6.4.5-A) e na marcação das células tumorais (Figura 4.6.4.5-B) há uma maior prevalência de casos com marcação do anticorpo anti-PD-L1 nula e que lhes corresponde a grande parte de valores de ki67 mais baixos.

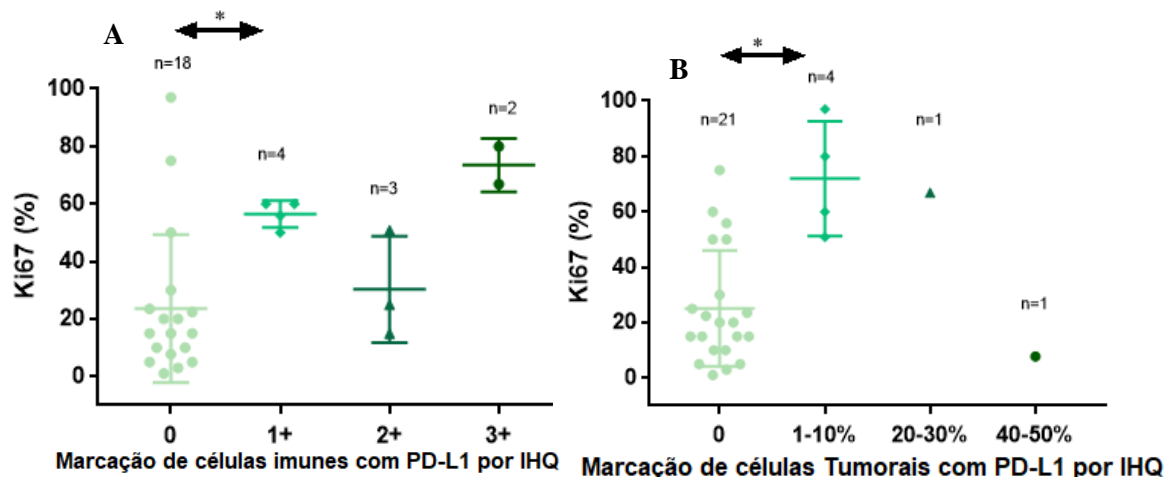


Figura 4.6.4.5: Expressão de ki-67 em função da marcação imunohistoquímica do anticorpo anti-PD-L1- **A:** marcação das células imunes, * ρ value estatisticamente significativo, 0-1+: $\rho=0.0163$; **B-** marcação das células tumorais, * ρ value estatisticamente significativo, $\rho=0.0020$.

4.6.5- Linfócitos/PD-L1 e o Índice de massa corporal (IMC)

Por fim, calculou-se o IMC das doentes utilizadas no estudo com base no seu peso e altura. No caso do anticorpo anti-CD3, observa-se que na marcação intratumoral (Figura 4.6.5.1-A), à medida que aumenta a marcação imunohistoquímica, aumenta o IMC. Por outro lado, para a marcação peritumoral (Figura 4.6.5.1-B), os resultados de IMC encontram-se praticamente uniformizados para as diferentes marcações. Os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos para se estabelecer uma correlação.

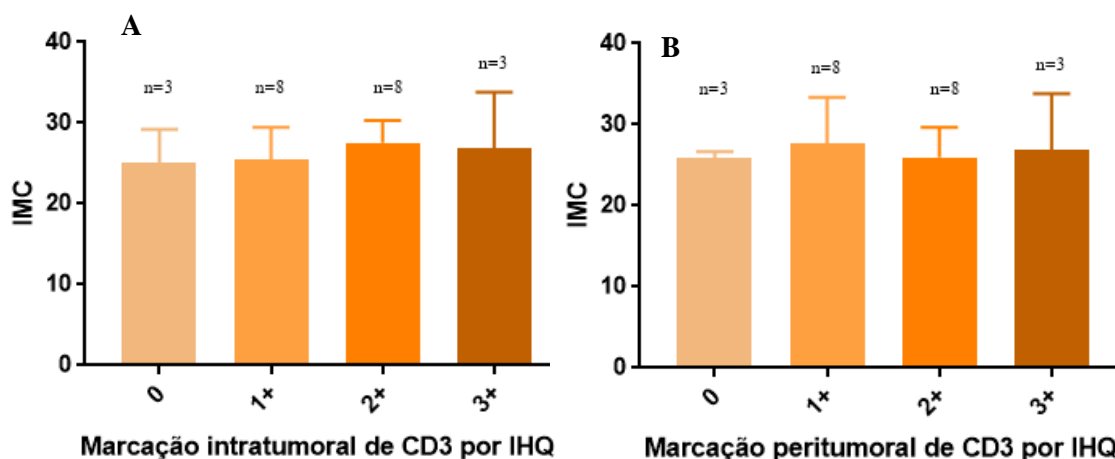


Figura 4.6.5.1: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ, A- marcação linfocitária intratumoral do anticorpo anti-CD3; B- marcação linfocitária peritumoral do anticorpo anti-CD3.

Para a marcação com o anticorpo anti-CD4, tanto na marcação intratumoral (Figura 4.6.5.2-A) como na marcação peritumoral (Figura 4.6.5.2- B), observa-se as mesmas conclusões que com a marcação com anticorpo anti-CD3 e os resultados obtidos não foram estatisticamente significativos para se estabelecer uma correlação.

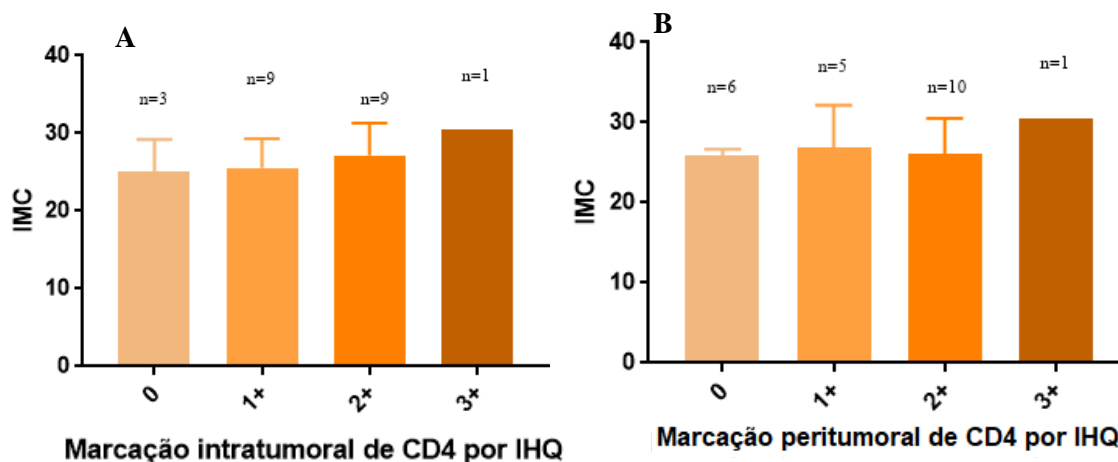


Figura 4.6.5.2: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ, A- marcação intratumoral com o anticorpo anti-CD4; B- marcação peritumoral com o anticorpo anti-CD4.

No caso do anticorpo anti-CD8, para a marcação intratumoral (Figura 4.6.5.3-A) e para a marcação peritumoral (Figura 4.6.5.3-B) observa-se que entre a marcação com o anticorpo anti-CD8 1+ e 2+, há uma diminuição dos valores de IMC, tendo sido obtido na marcação peritumoral um $\rho=0,0456$, não sendo estatisticamente muito significativo e não permitindo novamente estabelecer uma correlação.

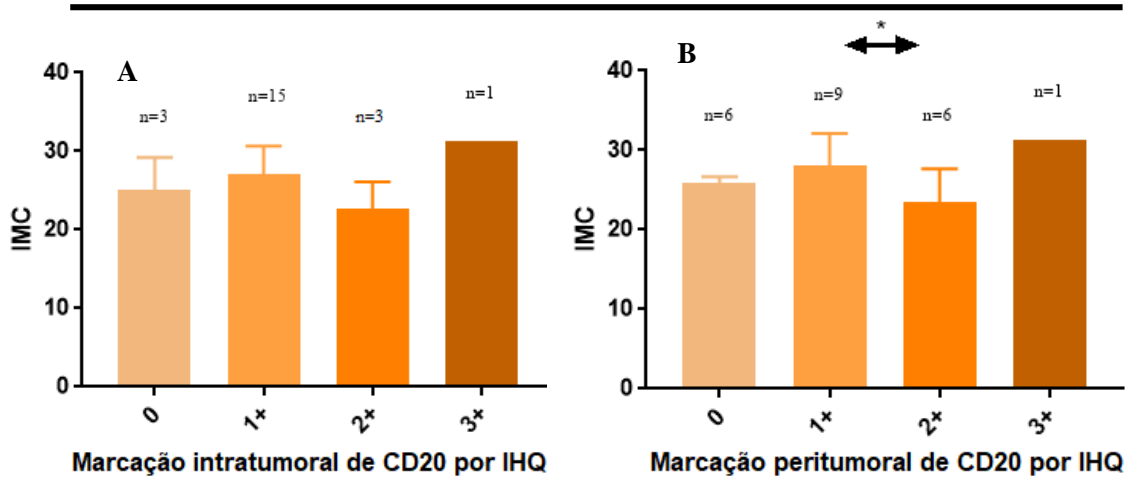


Figura 4.6.5.3: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ, A- marcação intratumoral com o anticorpo anti-CD8; B- marcação peritumoral com o anticorpo anti-CD8, * ρ value estatisticamente significativo, 1+/2+: $\rho=0,0456$.

Tal como para o anticorpo anti-CD8, nos resultados para o anticorpo anti-CD20, tanto na marcação intratumoral (Figura 4.6.5.4-A) como na marcação peritumoral (Figura 4.6.5.4-B), entre a marcação nula e 1+ com o anticorpo anti-CD20 há um aumento de IMC e entre a marcação 1+ e 2+ com o anticorpo anti-CD20 há uma diminuição.

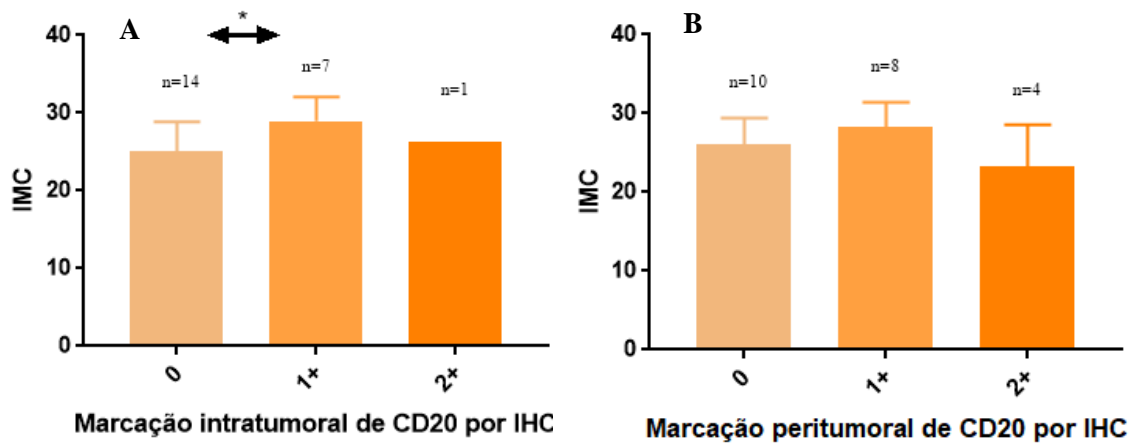


Figura 4.6.5.4: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ, A- marcação intratumoral com o anticorpo anti-CD20, * ρ value estatisticamente significativo, 0/1+: $\rho=0,0441$; B- marcação peritumoral com o anticorpo anti-CD20.

No caso da marcação com o anticorpo anti-PD-L1, na marcação das células imunes (Figura 4.6.5.5-A) os valores de IMC aumentam entre a marcação nula e depois têm a tendência em diminuir à medida que aumenta a marcação IHQ com o anticorpo anti-PD-L1. Por outro lado, na marcação das células tumorais (Figura 4.6.5.5-B) os

valores de IMC encontram-se muito semelhantes entre as diferentes percentagens de marcação das células.

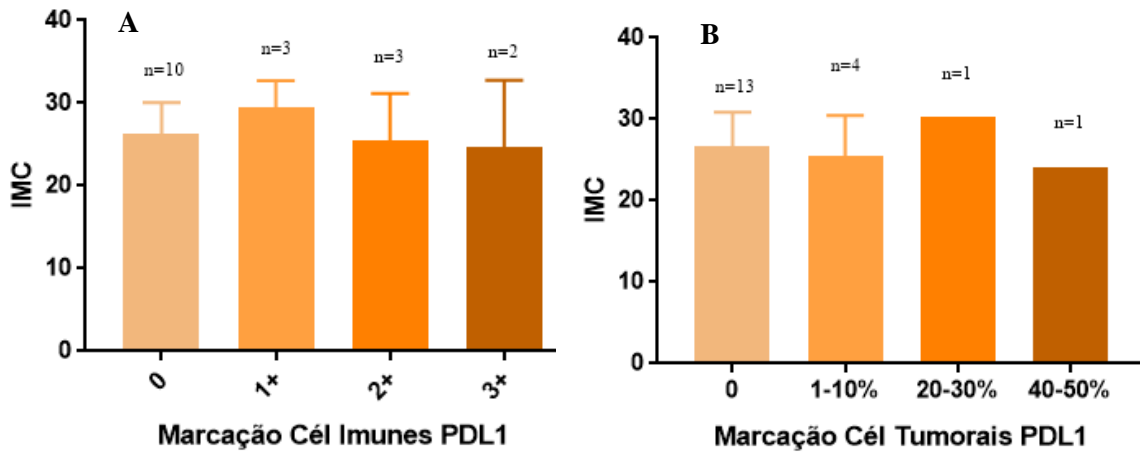


Figura 4.6.5.5: Índice de massa corporal (IMC) em função da marcação por IHQ com o anticorpo anti-PD-L1, A- marcação das células imunes com o anticorpo anti-PD-L1, * ρ value estatisticamente significativo, 0/1+: $\rho=0,0441$; B- marcação das células tumorais com o anticorpo anti-PD-L1.

5-Discussão dos Resultados

A presença de subpopulações linfocitárias no carcinoma da mama tem sido, em estudos anteriores, relacionada com um melhor prognóstico e com uma melhor resposta ao tratamento com NACT. Uma alta marcação imunohistoquímica com os anticorpos anti-CD3, anti-CD8 e anti-CD20 tem sido identificada como um fator preditivo para uma resposta patológica completa (pCR) em estudos com milhares de doentes (46) (51).

Ao correlacionar o grau histológico com a marcação dos diferentes linfócitos observamos que tanto para os linfócitos T (CD3, CD4 e CD8) como para os linfócitos B (CD20) existe uma maior marcação imunohistoquímica nos linfócitos na zona peritumoral. Estes resultados vão corroborar as pesquisas realizadas anteriormente onde descreviam que a infiltração linfocitária era maior nas margens do que no centro do tumor, mostrando que por vezes as células T não se conseguem infiltrar nos tumores, principalmente nos tumores que possuam uma grande componente estromal, barreiras físicas ou um microambiente tumoral hostil. (51) (45) (52) São exemplo disso os adenocarcinomas do pâncreas. Em relação aos resultados com PD-L1, este tem maior marcação de células tumorais em tumores com grau histológico mais elevado. Investigações anteriores conseguiram correlacionar a marcação imunohistoquímica de PD-L1 com tumores de grau histológico III, o que vem concordar com os nossos resultados obtidos para PD-L1 (53). Este resultado é o mais importante deste trabalho porque permite levantar a hipótese de que os tumores mais agressivos expressam mais PD-L1 para se tornarem invisíveis ao sistema imunitário induzindo tolerância.

Ao avaliarmos os subtipos de cancro da mama, os subtipos triplo negativo, Her2 positivo e RE negativo correspondem aos subtipos mais agressivos. Ao correlacionarmos a marcação linfocitária com os subtipos observamos que para os diferentes linfócitos avaliados, existe uma maior marcação linfocitária para o subtipo RE positivo, embora que no caso do CD8 e CD20 esta marcação seja inferior à marcação por CD3 e CD4. Isto sugere que uma maior marcação linfocitária corresponde a subtipos da mama menos agressivos, o que vai contra a literatura publicada, mas é difícil estabelecer uma correlação uma vez que esta marcação em imunohistoquímica não se correlaciona com os dados obtidos por citometria. Pesquisas anteriores afirmam que uma maior marcação

linfocitária está associada a subtipos de cancro da mama mais agressivos. (51) (54) (55) (42) No caso do PD-L1, os resultados obtidos sugerem que tanto na marcação imunohistoquímica de células imunes como na marcação imunohistoquímica de células tumorais, a marcação de PD-L1 é maioritariamente nula em tumores RE positivo e que existe uma marcação imunohistoquímica mais elevada em tumores TN. Estudos anteriores de outros autores demonstram que o PD-L1 está mais expresso em tumores mais agressivos, ou seja Her2 positivos, triplos negativos e tumores com RE fracos. (53) (48) Estes resultados são concordantes com os nossos o que pode sugerir que a via do PD1/PD-L1 está envolvida na reicidência e metastização dos subtipos tumores da mama, como é o caso dos tumores triplo negativos. (53) (56) Este resultado de maior expressão de PD-L1 nos tumores de subtipos biológicos mais agressivos faz sentido e corrobora as nossas previsões clínico-biológicas de que tumores mais agressivos expressam PD-L1 e criam mecanismos para induzir tolerância e escape ao sistema imunitário.

Ao avaliarmos os gânglios linfáticos, fomos correlacionar a presença de metástases nos gânglios com a marcação imunohistoquímica linfocitária. Com os nossos resultados obtidos podemos concluir que há uma maior marcação linfocitária por CD3, CD4, CD8 e CD20 em gânglios invadidos pelo tumor do que em gânglios sem invasão. Na literatura, está descrito que uma baixa marcação linfocitária de CD8 está associada à agressividade tumoral, às características malignas do tumor e às metástases ganglionares (45), o que vem contrariar os resultados obtidos. No entanto, no caso do PD-L1, podemos observar que tem maior marcação imunohistoquímica de células imunes em gânglios sem invasão, o que também vai contra a literatura publicada, de que uma maior marcação imunohistoquímica por PD-L1 ocorre em gânglios com metástases (48) (57). Este resultado é contra intuitivo com as nossas hipóteses clínico biológicas que nos diriam que nos gânglios invadidos haveria maior expressão de PD-L1.

De seguida fomos correlacionar a marcação linfocitária com a expressão de Ki67. A determinação da expressão do ki67 é uma ferramenta muito útil para o prognóstico e para a previsão do tratamento. No caso da marcação linfocitária para CD3, CD4 e CD8 observamos que a uma maior marcação linfocitária corresponde valores de Ki67 mais elevados. No entanto, no caso do CD20, não se consegue estabelecer uma relação, visto que à marcação linfocitária de CD20 nula correspondem os valores mais baixos e mais altos de Ki67. Por outro lado, os resultados obtidos com PD-L1 mostram

que a uma marcação imunohistoquímica nula de PD-L1 corresponde os valores de Ki67 mais baixos. Estes resultados obtidos vão contra publicações anteriores que relacionam positivamente a expressão de PD-L1 com a expressão de Ki67, ou seja, altos níveis de expressão de Ki-67 estão associados a uma alta marcação imunohistoquímica de PD-L1, indicando assim que a expressão de PD-L1 será correlacionável com uma baixa taxa de sobrevivência do doente. (58) (59) Por outro lado, se a presença de subpopulações linfocitárias estão associadas a um melhor prognóstico, era de esperar que a uma maior marcação linfocitária corresponde-se níveis baixos de expressão de Ki67, e não foi a relação que obtivemos com os nossos resultados.

Por fim, fomos avaliar a relação entre a marcação linfocitária e o índice de massa corporal (IMC) das doentes. Para o CD3 e CD4, na marcação linfocitária intratumoral, observamos que o IMC aumenta com o aumento da marcação linfocitária. No entanto, no caso do CD8, para a marcação linfocitária intratumoral e marcação linfocitária peritumoral 1+ e 2+ há uma diminuição do IMC ($\rho=0,0456$). Nos resultados do CD20, entre a marcação linfocitária nula e marcação linfocitária 1+ há um aumento de IMC e entre a marcação linfocitária 1+ e a marcação linfocitária 2+ há uma diminuição do IMC. Nos resultados de PD-L1 podemos observar que os valores de IMC têm tendência a diminuir com o aumento da marcação imunohistoquímica de PD-L1 de células imunes.

6-Conclusão

Após a conclusão deste estudo podemos concluir que uma maior infiltração linfocitária no tumor corresponde a um melhor prognóstico para o doente, mas que curiosamente, também está relacionada com os subtipos de cancro da mama mais agressivos.

A amostragem utilizada para este estudo não foi suficiente para retirar conclusões dos nossos resultados, por exemplo, na correlação linfocitária com a NACT não foi possível retirar uma conclusão uma vez que as doentes que realizaram NACT e que apresentaram resposta foram insuficientes.

Na parte deste estudo da avaliação de subpopulações linfocitárias não foi possível estabelecer qualquer ligação, nem entre as características clínico-biológicas, nem entre a técnica de citometria de fluxo.

O estudo imunohistoquímico com o anticorpo anti-PD-L1 revelou conclusões muito promissoras para o estudo de terapêuticas futuras, uma vez que a expressão de PD-L1 se encontra associada a subtipos de cancro da mama mais agressivos e de grau histológico mais elevado, estando assim envolvido na resposta imune anti-tumoral.

Estes foram os dois resultados mais relevantes deste trabalho:

- Alta expressão de PD-L1 em tumores de grau histológico mais elevado
- Alta expressão de PD-L1 em tumores de subtipos biológicos agressivos.

Conseguimos assim mostrar que os tumores de pior prognóstico poderão usar a via tolerogénica de PD-L1 para anular a resposta imunitária anti-tumoral.

Para perspetivas futuras, pode ser então importante e interessante estudar o infiltrado tumoral antes e após o tratamento com NACT, assim como a influência da expressão de PD-L1 no prognóstico dos doentes, ou seja, redirecionar este estudo sobre os tratamentos que os doentes realizam, quer NACT quer quimioterapia adjuvante, e relacionar a expressão linfocitária e a expressão de PD-L1 com as respostas dos doentes aos tratamentos.

Seria interessante adicionar a este estudo, a avaliação do FoxP3, uma vez uma razão elevada de linfócitos T reguladores Foxp3+/ linfócitos T CD8+ está associada à resistência à terapêutica anti-PD-1, e nos permitia assim correlacionar os dois temas principais deste estudo: subpopulações linfocitárias e terapêuticas anti-PD-1.

7- Referências Bibliográficas

1. Rabaça C. Fisiopatologia Oncológica. Fisiopatologia, Fundamentos e Aplicações, Lisboa: LIDEL. 2007;291–314.
2. National Breast Cancer Foundation. What Is Cancer? [Internet]. 2016 [cited 2018 Jun 28]. Available from: <https://www.nationalbreastcancer.org/what-is-cancer>
3. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. Cell. 2009.
4. Kumar V, Fausto N, A. A. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease . In: Elsevier, Burlington, MA, ed 7. 2008.
5. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. 2011.
7. Hayes D. Atlas of Breast Cancer. 2 edition. Mosby; 2000. 168 p.
8. American Cancer Society. What is Breast Cancer [Internet]. 2017 [cited 2018 Jul 2]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>
9. National Breast Cancer Foundation. Breast Anatomy [Internet]. [cited 2018 Jul 2]. Available from: <https://www.nationalbreastcancer.org/breast-anatomy>
10. John Niederhuber, James Armitage, James Doroshow, Michael Kastan JT. Cancer of the Breast in Abeloff’s Clinical Oncology. 5th Editio. © Saunders 2014; 2013. 2224 p.
11. Saslow D, Boetes C, Burke W, Harms S, Leach MO, Lehman CD, et al. American Cancer Society Guidelines for Breast Screening With MRI as an Adjunct to Mammography. Obstet Gynecol Surv [Internet]. 2007 Jul;62(7):458–60. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00006254-200707000-00021>
12. Pennery E, Speechley V, Rosenfield M. Cancro da mama: respostas sempre à mão. LIDEL- edições técnicas, lda; 2009. 183 p.
13. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018. 2017. p. 44.
14. Cuf instituto de oncologia. O Cancro da mama.
15. American Cancer Society. Cancer Basics [Internet]. 2015 [cited 2018 Jun 27]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>
16. Liga Portuguesa Contra o Cancro. O que é o Cancro? [Internet]. [cited 2018 Jun 27]. Available from: <https://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>

17. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny*. 2015.
18. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *American Family Physician*. 2010.
19. Cancer Research UK. *Breast Cancer*. 2017.
20. Singletary SE, Greene FL. Revision of breast cancer staging: The 6th edition of the TNM Classification. *Seminars in Surgical Oncology*. 2003.
21. Ulaner GA, Riedl CC, Dickler MN, Jhaveri K, Pandit-Taskar N, Weber W. Molecular Imaging of Biomarkers in Breast Cancer. *J Nucl Med*. 2016 Feb;57(Supplement_1):53S–59S.
22. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer*. 2017 Apr;75:284–98.
23. Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, et al. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003 Sep;3(5):573–85.
24. Rimawi MF, Schiff R, Osborne CK. Targeting HER2 for the Treatment of Breast Cancer. *Annu Rev Med*. 2015 Jan;66(1):111–28.
25. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar;344(11):783–92.
26. Ross JS. The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. *Oncologist*. 2003 Aug;8(4):307–25.
27. Ligibel JA, Winer EP. Trastuzumab/chemotherapy combinations in metastatic breast cancer. *Semin Oncol*. 2002;
28. McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: A review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs*. 2002.
29. Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2015.
30. Cunha S, Gano L, Morais GR, Thiemann T, Oliveira MC. «Targeting» de receptores de progesterona com esteróides em cancro da mama. *ASPIC*. 2013.
31. Ferro A. *Imunohistoquímica*. 2014.
32. Mauri D, Pavlidis N, Ioannidis JPA. Neoadjuvant Versus Adjuvant Systemic Treatment in Breast Cancer: A Meta-Analysis. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2005;
33. Kok M, Horlings H., van de Vijver K, Wiersma T, Russell N, Voorwerk L, et al. Adaptive phase II randomized non-comparative trial of nivolumab after induction treatment in triple negative breast cancer: TONIC-trial (LBA14). *Ann Oncol*. 2017;

34. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2016 Jun;17(sup3):43–6.
35. International Agency for Research on Cancer. Breast Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. GLOBOCAN. 2012.
36. Stevens A, Lowe JS. *Human Histology*. Stevens A Lowe J. 2005.
37. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;
38. Newman T. How the immune system works. *Medical News Today* [Internet]. 2018; Available from: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/320101.php>
39. Abbas Abul K., Lichtman; AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier. 2014.
40. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2007 Aug 15;9(4):212. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1746>
41. Abcam. Cancer immunotherapy and the PD-1/PD-L1 checkpoint pathway [Internet]. [cited 2018 Sep 7]. Available from: <https://www.abcam.com/cancer/cancer-immunotherapy-and-the-pd1pd11-pathway>
42. Miyan M, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I, Boniface J. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. *J Transl Med*. 2016;
43. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: From TILs to the clinic. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2016.
44. Wang M, Zhang C, Song Y, Wang Z, Wang Y, Luo F, et al. Mechanism of immune evasion in breast cancer. *OncoTargets and Therapy*. 2017.
45. Kim ST, Jeong H, Woo OH, Seo JH, Kim A, Lee ES, et al. Tumor-infiltrating Lymphocytes, Tumor Characteristics, and Recurrence in Patients With Early Breast Cancer. *Am J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Jun;36(3):224–31. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0000421-201306000-00002>
46. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, González-Billalabeitia E, Conesa MAV, García TG, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2014 Dec 29;16(6):488. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-014-0488-5>

47. Ni L, Dong C. New checkpoints in cancer immunotherapy. *Immunological Reviews*. 2017.
48. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2015 Apr 1;3(4):326–32. Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-14-0133>
49. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Drosler RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;
50. Roche. *Clinical chemistry & immunochemistry*. 2010.
51. Lal A, Chan L, DeVries S, Chin K, Scott GK, Benz CC, et al. FOXP3-positive regulatory T lymphocytes and epithelial FOXP3 expression in synchronous normal, ductal carcinoma in situ, and invasive cancer of the breast. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2013 Jun 28;139(2):381–90. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-013-2556-4>
52. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001 Sep 11;98(19):10869–74. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.191367098>
53. Lou J, Zhou Y, Huang J, Qian X. Relationship between PD-L1 expression and clinical characteristics in patients with breast invasive ductal carcinoma. *Open Med* [Internet]. 2017 Sep 6;12(1). Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/med.2017.12.issue-1/med-2017-0042/med-2017-0042.xml>
54. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Mar 15;65(6):2457–64. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-04-3232>
55. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;
56. Janakiram M, Abadi YM, Sparano JA, Zang X. T Cell Coinhibition and Immunotherapy in Human Breast Cancer. *Discov Med*. 2012;
57. Li M, Li A, Zhou S, Xu Y, Xiao Y, Bi R, et al. Heterogeneity of PD-L1 expression in primary tumors and paired lymph node metastases of triple negative breast cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Dec 2;18(1):4. Available from: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3916-y>
58. Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, ElKum N, Bin Amer SM, Al-Tweigeri T, et

- al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *Int J Cancer*. 2007;
59. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011.
60. BENCHMARK, OptiView V. OptiView DAB IHC Detection Kit.


8- Anexos

8.1- Anexo I: *OptiView DAB Immunohistochemistry Detection Kit*(60)



OptiView DAB IHC Detection Kit

REF 760-700
06396500001

IVD  250

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O OptiView DAB IHC Detection Kit (OptiView) é um sistema indirecto sem biotina para a detecção de anticorpos primários de IgG do rato, IgM do rato e de coelho. O kit destina-se à identificação de alvos através de imuno-histoquímica (IHC) em secções de tecido fixado em formol e impregnado em parafina e em tecido congelado que são coradas nos dispositivos automáticos de coloração da VENTANA e visualizadas através de microscopia óptica. A interpretação clínica de qualquer coloração, ou da ausência de coloração, tem que ser complementada por meio de estudos morfológicos e avaliação dos controlos adequados.

Este produto deverá ser interpretado por um patologista qualificado, em conjunto com um exame histológico, a informação clínica relevante e os controlos adequados.

Este produto destina-se ao diagnóstico *in vitro* (IVD).

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A imuno-histoquímica (IHC) é uma técnica utilizada em laboratórios para fins de diagnóstico. O conceito fundamental da IHC é a localização dos antígenos em secções de tecido utilizando anticorpos primários específicos. Depois de ocorrer a ligação do antígeno-anticorpo, a mesma tem de ser visualizada com uma reacção de cor visível por microscopia óptica ou através da utilização de microscopia de fluorescência. O anticorpo primário específico poderá transportar a molécula geradora do sinal, fornecendo uma visualização directa da ligação. Em alternativa, os métodos de visualização indirecta requerem etapas adicionais para localizar o anticorpo específico e gerar um sinal. As técnicas mais comuns de métodos indirectos utilizam um anticorpo terciário com uma enzima que une o anticorpo secundário direccionado contra as espécies de anticorpo primário com um sistema de substrato cromogénico correspondente. Esta combinação resulta numa precipitação colorida no local da ligação específica do anticorpo. O OptiView DAB IHC Detection Kit utiliza um método indirecto para visualizar anticorpos específicos ligados a antígenos depositando um precipitado de cor castanha.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O kit OptiView DAB IHC Detection Kit detecta anticorpos primários específicos de rato e de coelho ligados a um antígeno em secções de tecido impregnado em parafina ou em tecido congelado. O anticorpo específico é localizado por um anticorpo secundário específico ligado por um anticorpo terciário marcado com enzima. O complexo é então visualizado utilizando um produto do precipitado da enzima.

O OptiView DAB IHC Detection Kit utiliza um cocktail de anticorpos secundários que localizam o anticorpo primário ligado. O cocktail de anticorpos secundários é reconhecido por um anticorpo terciário ligado à enzima que é visualizado com substrato de peróxido de hidrogénio e cromogénio 3, 3'-diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB), que produz um precipitado castanho prontamente detectado por microscopia óptica. Cada etapa é então incubada durante um tempo e a uma temperatura seleccionáveis. No final de cada etapa de incubação, o instrumento VENTANA BenchMark Series lava as secções para remover o material não ligado e aplica solução Liquid Coverslip, que minimiza a evaporação dos reagentes aquosos da lâmina.¹ Os resultados são interpretados utilizando um microscópio óptico e auxiliam no diagnóstico diferencial de processos fisiopatológicos que podem ou não estar associados a um antígeno específico.

Para informações mais detalhadas sobre o funcionamento do instrumento, consultar o Manual do Operador adequado.

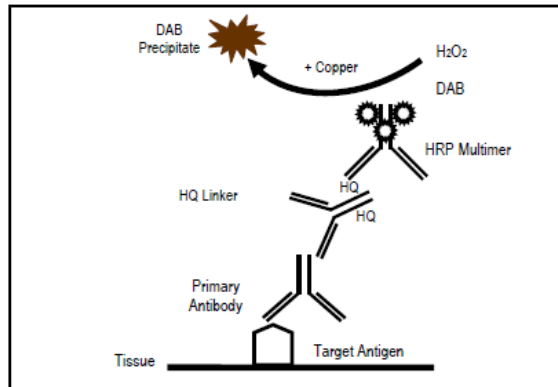


Figura 1. OptiView DAB IHC Detection Kit

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes fornecidos

O OptiView DAB IHC Detection Kit contém reagente suficiente para 250 testes.

Um dispensador de 25 ml	O OptiView Peroxidase Inhibitor contém 3,0% de solução de peróxido de hidrogénio.
Um dispensador de 25 ml	O OptiView HQ Universal Linker contém um cocktail de anticorpos (IgG anti-rato de caprino, IgM anti-rato de caprino e anti-coelho de caprino) marcado com HQ (HQ é um hapteno proprietário ligado de forma covalente aos anticorpos de caprino) (<50 µg/ml) num tampão com proteína com ProClin 300, um conservante.
Um dispensador de 25 ml	O OptiView HRP Multimer contém um anticorpo terciário de HRP marcado anti-HQ monoclonal de rato (<40 µg/ml) num tampão com proteína com ProClin 300, um conservante.
Um dispensador de 25 ml	O OptiView H ₂ O ₂ contém 0,04% de peróxido de hidrogénio numa solução de tampão fosfato.
Um dispensador de 25 ml	O OptiView DAB contém 0,2% de 3, 3'-diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB) numa solução estabilizadora proprietária com um conservante proprietário.
Um dispensador de 25 ml	O OptiView Copper contém sulfato de cobre (5,0 g/l) num tampão de acetato com um conservante proprietário.

Reconstituição, homogeneização, diluição e titulação

O kit de detecção está optimizado para utilização em instrumentos VENTANA BenchMark Series. Não é necessária qualquer reconstituição, homogeneização, diluição ou titulação de reagentes do kit.

A diluição subsequente pode originar a perda de coloração do antígeno. O utilizador deverá validar tais alterações. As diferenças a nível do processamento de tecidos e do procedimento de pré-exame no laboratório podem dar origem a uma variabilidade significativa nos resultados. Para mais informações sobre os controlos, consultar a secção de Procedimentos de controlo de qualidade.

8.2- Anexo II: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD3

Procedimento: BMK OptiView DAB IHC Par v4 (Resumo do protocolo)

Módulo de Marcação BenchMark IHC/ISH

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Protocolo N°	Protocolo	Data da criação
20	CD3	16/07/2015

- 1 Desparafinação [Seleccionado]
- 2 Cell Conditioning [Seleccionado]
- 3 CC1 [Seleccionado]
- 4 CC1 8 Min [Seleccionado]
- 5 CC1 16 Min [Seleccionado]
- 6 CC1 24 Min [Seleccionado]
- 7 Pre Primary Peroxidase Inhibit. [Seleccionado]
- 8 Anticorpo primário [Seleccionado]
- 9 Aplicar Coverslip, uma gota de [anti-CD3 (2GV6)] (Anticorpo), e incubar durante [0 H 18 Min]
- 10 Pós-fixador [Seleccionado]
- 11 Aplicar uma gota de [FIXATIVE 1] (Pós-fixador), Aplicar coverslip e incubar [6 minutos]
- 12 Contrastante [Seleccionado]
- 13 Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN II] (Contrastante), Aplicar coverslip e incubar [12 minutos]
- 14 Pós-contrastante [Seleccionado]
- 15 Aplicar uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar coverslip e incubar [6 minutos]

8.3- Anexo III: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD4

Procedimento: BMK OptiView DAB IHC Par v4 (Resumo do protocolo)

Módulo de Marcação BenchMark IHC/ISH

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Protocolo N°	Protocolo	Data da criação
7	CD4	02/03/2017

- 1 Desparafinação [Seleccionado]
- 2 Cell Conditioning [Seleccionado]
- 3 CC1 [Seleccionado]
- 4 CC1 8 Min [Seleccionado]
- 5 CC1 16 Min [Seleccionado]
- 6 CC1 24 Min [Seleccionado]
- 7 Pre Primary Peroxidase Inhibit. [Seleccionado]
- 8 Anticorpo primário [Seleccionado]
- 9 Aplicar Coverslip, uma gota de [PREP KIT 8] (Anticorpo), e incubar durante [0 H 20 Min]
- 10 Contrastante [Seleccionado]
- 11 Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN II] (Contrastante), Aplicar coverslip e incubar [12 minutos]
- 12 Pós-contrastante [Seleccionado]
- 13 Aplicar uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar coverslip e incubar [6 minutos]

8.4- Anexo IV: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD8

Procedimento: BMK OptiView DAB IHC Par v4 (Resumo do protocolo)

Módulo de Marcação BenchMark IHC/ISH

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Protocolo Nº	Protocolo	Data da criação
35	CD8	26/02/2018

- 1 Desparafinação [Selecionado]
- 2 Cell Conditioning [Selecionado]
- 3 CC1 [Selecionado]
- 4 CC1 8 Min [Selecionado]
- 5 CC1 16 Min [Selecionado]
- 6 CC1 24 Min [Selecionado]
- 7 CC1 32 Min [Selecionado]
- 8 CC1 40 Min [Selecionado]
- 9 Pre Primary Peroxidase Inhibit. [Selecionado]
- 10 Anticorpo primário [Selecionado]
- 11 Aplicar Coverslip, uma gota de [PREP KIT 17] (Anticorpo), e incubar durante [0 H 20 Min]
- 12 Pós-fixador [Selecionado]
- 13 Aplicar uma gota de [FIXATIVE 1] (Pós-fixador), Aplicar coverslip e incubar [4 minutos]
- 14 Contrastante [Selecionado]
- 15 Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN II] (Contrastante), Aplicar coverslip e incubar [12 minutos]
- 16 Pós-contrastante [Selecionado]
- 17 Aplicar uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar coverslip e incubar [6 minutos]

8.5- Anexo V: Protocolo de Marcação Imunohistoquímica de CD20

Procedimento: BMK OptiView DAB IHC Par v4 (Resumo do protocolo)

Módulo de Marcação BenchMark IHC/ISH

Ventana Medical Systems, Inc., 1910 Innovation Park Drive Tucson, Arizona USA

Protocolo Nº	Protocolo	Data da criação
2	CD20	01/06/2015

- 1 Desparafinação [Selecionado]
- 2 Cell Conditioning [Selecionado]
- 3 CC1 [Selecionado]
- 4 CC1 8 Min [Selecionado]
- 5 CC1 16 Min [Selecionado]
- 6 CC1 24 Min [Selecionado]
- 7 Pre Primary Peroxidase Inhibit. [Selecionado]
- 8 Anticorpo primário [Selecionado]
- 9 Aplicar Coverslip, uma gota de [ANTI-CD20] (Anticorpo), e incubar durante [0 H 16 Min]
- 10 Contrastante [Selecionado]
- 11 Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN II] (Contrastante), Aplicar coverslip e incubar [12 minutos]
- 12 Pós-contrastante [Selecionado]
- 13 Aplicar uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar coverslip e incubar [6 minutos]