



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Sandro Wopereis**

**Validação da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo para a  
Investigação de Marcadores de Diagnóstico e de Prognóstico para  
o Câncer de Mama**

Florianópolis - SC

2019

**Sandro Wopereis**

**Validação da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo para a  
Investigação de Marcadores de Diagnóstico e de Prognóstico para  
o Câncer de Mama**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, para à obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Área de Concentração: Análises Clínicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cláudia Santos da Silva

Florianópolis - SC

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wopereis, Sandro

Validação da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo para a Investigação de Marcadores de Diagnóstico e de Prognóstico para o Câncer de Mama / Sandro Wopereis ; orientadora, Maria Claudia Santos da Silva, 2019.

87 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Câncer de Mama. 3. Métodos Analíticos. 4. Marcadores Tumorais. 5. Citometria de Fluxo. I. Santos da Silva, Maria Claudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Sandro Wopereis

**Validação da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo para a Investigação de Marcadores de Diagnóstico e de Prognóstico para o Câncer de Mama**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Rodolfo Patussi Correia, Dr.

Hospital Israelita Albert Einstein

Profa. Iara Fabrícia Kretzer, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

---

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna

Coordenadora do Programa

---

Profa. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva

Orientadora

Florianópolis, 07 de Agosto de 2019.

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Marian e Ignacio por todo amor que recebi durante esses anos todos. Graças a eles, que não mediram esforços para me proporcionar um ambiente de oportunidades e carinho, que fizeram com que eu pudesse alcançar voos cada vez maiores.

Aos meus amados irmãos, Gustavo, parceiro de uma vida toda e que tenho a certeza absoluta de poder contar com ele para tudo, e Marcelo, que a cada ano que passa mostra-se uma pessoa íntegra e com uma maturidade impressionante para um adolescente.

À minha amada companheira, Francine, pessoa mais empática que já conheci em minha vida e que me proporciona amor, carinho, companheirismo e um aprendizado diário que me fez e me faz pessoa muito melhor e mais ética.

À Professora Maria Cláudia Santos da Silva, que depositou a confiança na execução desse projeto em mim e me orientou primorosamente; motivando-me e me cobrando quando necessário, mas também me dando a liberdade para desenvolver e aprimorar o projeto junto com ela.

Aos amigos do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH): Laura, Chandra, Iris, Amanda Abdalla, Amanda Jacques, Natália, Daiane, Mariana, Bruna, Jéssica, Bárbara e Manoela; por todas as contribuições, os momentos de descontração e de aprendizado durante a execução desse trabalho.

À Dra. Daniella e a todos os servidores e residentes da Unidade de Anatomia Patológica do Hospital Universitário, que abriram as portas e um leque de amizades para mim, fazendo-me com que me sentisse à vontade para acompanhar e aprender as técnicas ali executadas.

Aos mastologistas Dr. Bráulio e Dr. Renato pela contribuição e pela confiança na execução do trabalho.

Ao professor Dr. Heraldo Possolo de Souza, que gentilmente nos forneceu a linhagem de células SKBR3.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, onde eu tenho a honra e o prazer de dividir a bancada com tanta gente competente e agradável. Especialmente aos meus colegas do setor de Imunoquímica: Michelle, Emerita, Neto, Letícia, Carlão e Patrícia Casas; que se doaram em dobro para cobrir os momentos onde me fiz ausente para que eu pudesse desenvolver essa tese.

Aos amigos que tenho a sorte de ter e que me proporcionam muitas alegrias e muitos momentos de crescimento pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, e às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESC por proporcionar infraestrutura e recursos para a execução desse trabalho.

“Quantas vezes a gente, em busca da ventura,  
procede tal e qual o avozinho infeliz:  
Em vão, por toda parte, os óculos procura  
tendo-os na ponta do nariz!”

*Mario Quintana*

## RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer que mais acomete a população mundial, o que causa um forte impacto financeiro sobre os sistemas de saúde. Atualmente, o diagnóstico do câncer de mama é realizado pela análise morfológica e imuno-histoquímica do tecido removido. Todavia, essa metodologia apresenta algumas limitações como: a morosidade, o limite do número de marcadores fenotípicos a serem avaliados simultaneamente, e o número limitado de células analisadas por amostra. Portanto, vê-se a necessidade do desenvolvimento de metodologias capazes de auxiliar aquelas já utilizadas, o que possibilita a detecção rápida e segura das células tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho foi validar a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a investigação de marcadores de diagnóstico e de prognóstico para o câncer de mama e investigar os subtipos de linfócitos infiltrados no tumor e sua relação com o desenvolvimento tumoral. Para tanto, 52 amostras de tumores de mama foram seccionadas e maceradas juntamente com tampão salina-fosfato. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi marcada com anticorpos contra receptores de estradiol (RE), progesterona (RP), HER2, Ki67, CD3, CD4, CD8 e CD45 e analisadas por citometria de fluxo. Para determinar o padrão de expressão das amostras, as células tumorais marcadas foram comparadas com os linfócitos, que não expressam os marcadores de importância para o câncer de mama. Todos os resultados foram comparados com a imuno-histoquímica (padrão ouro) em relação a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), exceto o Ki67, onde foi realizada a comparação do viés entre as metodologias e a correlação entre os subtipos de linfócitos e características tumorais. Os resultados obtidos comparando a citometria de fluxo com a imuno-histoquímica (padrão ouro) para cada marcador foram: análise de RE (sensibilidade: 75%, especificidade: 90%, VPP: 96,7%, VPN: 47,4%); análise de RP (sensibilidade: 72%, especificidade: 70%, VPP: 79,3%, VPN: 60,8%); análise de HER2 (sensibilidade: 80%, especificidade: 90,2%, VPP: 66,7%, VPN: 94,9%). A análise do marcador de proliferação celular Ki67 por citometria de fluxo mostrou-se equivalente à imuno-histoquímica, com a vantagem de não apresentar viés observacional. Não foram observadas correlações entre o perfil da população de linfócitos intratumorais com o subtipo molecular ou com o grau histológico do tumor. Os resultados do presente estudo evidenciam a capacidade da citometria de fluxo para detectar com segurança e agilidade os marcadores do câncer de mama utilizados na prática clínica, aliada à possibilidade de investigar o fenótipo das células linfoides infiltradas no tecido tumoral. Acredita-se que a utilização da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica e a imuno-histoquímica podem sobrepor as limitações individuais de cada uma das metodologias e proporcionar resultados fidedignos de maneira mais rápida e eficiente, o que resultará em diagnósticos mais rápidos e prognósticos mais acurados, beneficiando diretamente os pacientes.

Palavras-chave: Câncer de Mama; Citometria de Fluxo; Imuno-histoquímica; Marcadores Tumorais; Métodos Analíticos.



## ABSTRACT

Breast cancer is the second most common cancer worldwide, which causes an important financial impact over the healthcare systems. Nowadays, molecular diagnosis of breast cancer is performed by morphological analysis and immunohistochemistry of the removed tissue. However, this methodology has some limitations: it slowness, few markers that can be evaluated simultaneously and only a limited number of cells is analyzed per sample. Therefore, there is a demand for development of new analytical methods able to support the currently used, making detection of cancer cells faster and safer. So, the aim of this study is to validate flow cytometry immunophenotyping to investigate diagnostic and prognostic markers of breast cancer and investigate the subtypes of tumor infiltrating lymphocytes and their relationship with tumor development. Therefore, tumor samples from surgical specimens of patients were first sliced and then macerated together with phosphate-buffered saline. Then, 52 samples were filtered and the single cell suspension obtained was labeled with antibodies against estradiol receptors (ER), progesterone receptors (PR), HER2 receptors, Ki67, CD3, CD4, CD8 and CD45 and analyzed by flow cytometry. In order to determine the expression patterns of the samples, labeled BC cells were compared with lymphocytes, which do not express the receptors of interest. All the results were compared with reference methods in terms of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), except Ki67, which had the methodological bias compared and the correlations between intratumoral lymphocytes profile and the breast cancer characteristics. The results obtained comparing flow cytometry with reference method for each marker were: ER detection (sensitivity: 75%; specificity: 90%; PPV: 96,7%; NPV: 47,4%); PR detection (sensitivity: 72%; specificity: 70%; PPV: 79,3%; NPV: 60,8%); HER2 detection (sensitivity: 80%; specificity: 90,2%; PPV: 66,7%; NPV: 94,9%). The analysis of proliferation marker Ki67 by flow cytometry proved to be equivalent to immunohistochemistry, with the advantage of being free from observational bias. No correlation was observed between the intratumoral lymphocyte population profile and the molecular subtype or tumor grade. The results obtained so far show the capacity of flow cytometry to detect and differentiate with agility and safety breast cancer markers used in clinical practice, together with the possibility of investigate the phenotype of tumor infiltrated lymphocytes. We believe that flow cytometry, together with morphological analysis and immunohistochemistry can overcome individual limitations of each methodology and provide reliable results on a faster and efficient manner, resulting in faster diagnosis and more accurate prognosis, directly benefiting patients.

**Keywords:** Breast Cancer; Flow Cytometry; Immunohistochemistry; Tumor Markers; Analytical Methods.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Incidência (por 100000 habitantes) mundial do câncer de mama.....	6
Figura 2 – Taxa de mortalidade (por 100000 habitantes) global do câncer de mama.	6
Figura 3 – Estimativa para 2018-2019 dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não-melanoma.....	7
Figura 4 – Teste de autofluorescência das células tumorais.....	25
Figura 5 – Estratégia de <i>Gating</i> .....	26
Figura 6 – Estratégia de <i>Gating</i> dos linfócitos intratumorais.....	29
Figura 7 – Comparação entre células MCF-7 marcadas com anticorpos anti-RE e células MCF-7 não-marcadas.....	32
Figura 8 – Comparação entre células MCF-7 marcadas com anticorpos anti-RP e células MCF-7 não-marcadas.....	33
Figura 9 – Comparação entre células SKBR3 marcadas com anticorpos anti-HER2 e células SKBR3 não-marcadas.....	34
Figura 10 – Comparação entre células MDA-MB-231 marcadas com anticorpos anti-EGFR e células MDA-MB-231 não-marcadas.....	35
Figura 11 – Verificação da presença das células tumorais nas amostras.....	38
Figura 12 – Comparação dos perfis de expressão de receptores de estrógeno por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica em amostras de câncer de mama.....	40
Figura 13 – Comparação dos perfis de expressão de receptores de progesterona por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica em amostras de câncer de mama.....	44
Figura 14 – Comparação dos perfis de expressão de receptores HER2 por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica em amostras de câncer de mama.....	48
Figura 15. Determinação da expressão do marcador de proliferação Ki67 em células de tumores de mama por citometria de fluxo.....	52
Figura 16. Gráfico de dispersão de Bland-Altman.....	53

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Diagrama para cálculo de sensibilidade e especificidade – Receptores de estrógeno.....	41
Quadro 2 – Diagrama para cálculo de sensibilidade e especificidade – Receptores de progesterona.....	45
Quadro 3 – Diagrama para cálculo de sensibilidade e especificidade – Receptores HER2.....	49
Quadro 4 – Distribuição das amostras considerando a expressão de receptores hormonais e razão CD4/CD8.....	56
Quadro 5 – Distribuição das amostras considerando a expressão de receptores HER2 e razão CD4/CD8.....	57
Quadro 6 – Distribuição das amostras por grau histológico e razão CD4/CD8.....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão de expressão de marcadores dos diferentes subtipos de câncer de mama.....	11
Tabela 2 – Painel de anticorpos utilizados.....	27
Tabela 3 – Comparação dos valores de intensidade de fluorescência média (IFM) de células marcadas e não-marcadas.....	35
Tabela 4 – Perfil dos pacientes participantes do estudo.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD – 7-aminoactinomicina D

APC – Aloficocianina

DAB – Diaminobenzidina

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FN – Falsos Negativos

FP – Falsos Positivos

HER2 – *Human Epidermal Growth Factor 2*

HU-UFSC/EBSERH – Hospital Universitário Universidade Federal de Santa Catarina/ Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IFM – Intensidade de Fluorescência Média

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Salina-Fosfato

PE – Ficoeritrina

PerCP – Proteína Clorofila Peridina

RE – Receptor de Estrógeno

RP – Receptor de Progesterona

UA – Unidades Arbitrárias

UAP – Unidade de Anatomia Patológica

VN – Verdadeiros Negativos

VP – Verdadeiros Positivos

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1. ETIOLOGIA, EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DO CÂNCER DE MAMA. 3	
2.2. DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE MAMA E O SEU DIAGNÓSTICO .....	7
2.3. TRATAMENTO ATUAL DO CÂNCER DE MAMA E PERSPECTIVAS FUTURAS .	13
2.4. CITOMETRIA DE FLUXO E IMUNO-HISTOQUÍMICA NA ANÁLISE DE TUMORES SÓLIDOS .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
3.1. OBJETIVO GERAL: .....	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
4.1. CULTURA CELULAR E TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS .....	20
4.2. SELEÇÃO DOS PACIENTES .....	22
4.3. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ORIGEM HUMANA .....	23
4.4. PAINEL DE ANTICORPOS UTILIZADO, MARCAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	24
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
5.1. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES ADEQUADAS DOS ANTICORPOS DE INTERESSE .....	31
5.2. PERFIL DOS PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO .....	36
5.3. COMPARAÇÃO ENTRE IMUNO-HISTOQUÍMICA E CITOMETRIA DE FLUXO NA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES CELULARES .....	36
<b>5.3.1. Análise da Expressão de Receptores de Estrógeno</b> .....	39
<b>5.3.2. Análise da Expressão dos Receptores de Progesterona</b> .....	43
<b>5.3.3. Análise da Expressão dos Receptores HER2</b> .....	46
5.4. COMPARAÇÃO ENTRE IMUNO-HISTOQUÍMICA E CITOMETRIA DE FLUXO NA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI67 .....	50
5.5. ANÁLISE DO PERFIL DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS INTRATUMORAIS E SUA RELAÇÃO COM O SUBTIPO TUMORAL E O GRAU HISTOLÓGICO DO TUMOR	55
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças cujas características em comum são a proliferação celular rápida e descontrolada associada à capacidade de invasão dos tecidos adjacentes e, eventualmente, de órgãos distantes (OMS, 2017).

Embora existam papiros de mais de 3000 anos atrás com relatos de pacientes com crescimento anormal de determinados tecidos, as primeiras descrições do que conhecemos como câncer vem da Grécia antiga (HAJDU, 2010a). Hipócrates (460-375 AC) ao dissecar tumores sólidos associou o formato do tumor – uma massa sólida com veias ao seu redor – ao formato de um caranguejo com suas patas, do grego *Karkinos*. Posteriormente, a palavra *Karkinos* foi traduzida para o latim, cancer, termo que é utilizado até os dias de hoje (MOSS, 1989).

Além de realizar as primeiras descrições de alguns tipos de câncer, Hipócrates não se dedicou somente a identificá-los e classificá-los; mas também a elucidar quais as razões que culminavam no desenvolvimento dessas neoplasias. Para tanto ele desenvolveu a teoria humoral, onde a saúde de um indivíduo era pautada por um equilíbrio entre quatro tipos de fluidos corporais – sangue, fleuma, bile amarela e bile negra – e as doenças eram fruto de um desequilíbrio entre esses fluidos. O câncer, por exemplo, era atribuído a um excesso de bile negra. Essa teoria foi aceita até a idade média, visto que as religiões proibiam a realização de estudos sobre o corpo humano (ACS, 2014; KARPOZILOS; PAVLIDIS, 2004).

Somente durante a revolução científica, no final do período do renascimento (1300-1600 D.C.), é que começaram a surgir novas teorias acerca da etiologia do câncer. Diversas teorias foram propostas, algumas pregavam que o câncer ocorria em virtude do extravazamento de linfa, outras a consideravam uma doença infecciosa e havia também, aquelas que associavam o desenvolvimento de tumores a traumas (ACS, 2014). Apenas em 1858, o entendimento de como eram formados os tumores tomou os moldes que conhecemos hoje. Rudolf Virchow concluiu que os cânceres não somente eram formados por células, como eram as próprias células que davam origem a novas células (HAJDU, 2011).

Desde então, inúmeros esforços têm sido feitos a fim de desenvolver novos métodos de diagnósticos e de investigação das causas dessa doença, que acometeu mais de 18,1 milhões de pessoas e causou 9,6 milhões de mortes apenas no ano de 2018, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRAY et al., 2018; OMS, 2018).

Dentre os diversos tipos de câncer existentes, destaca-se o câncer de mama, pois o mesmo levantamento realizado pela OMS em 2018 mostra que essa neoplasia foi responsável por mais de 2,1 milhões de novos casos e 627.000 óbitos no último ano. O câncer de mama é o tipo de neoplasia que mais atinge e mata mulheres ao redor do mundo (BRAY et al., 2018; OMS, 2018).

Ainda não há conhecimento de mecanismos que sirvam de gatilho direto para a perda dos mecanismos de controle de replicação celular e o consequente desenvolvimento dessa enfermidade. Sabe-se que parte dos casos está associada a fatores genéticos e o restante está associado a fatores ambientais e estilo de vida (BURGESS E PUHALLA, 2014; YIANNAKOPOULOU, 2014).

Atualmente o diagnóstico do câncer de mama inicia com a mamografia e, em caso de suspeita de malignidade é realizada uma biópsia a fim de identificar o perfil de expressão dos marcadores de câncer de mama do nódulo em questão. A metodologia padrão-ouro para a determinação do perfil de expressão é a análise imuno-histoquímica do tumor (SENKUS et al., 2015). Todavia, essa metodologia apresenta algumas limitações, como a morosidade, o limite do número de marcadores moleculares a serem avaliados simultaneamente, e o número limitado de células analisadas por amostra. Portanto, vê-se a necessidade do desenvolvimento de metodologias capazes de auxiliar aquelas já utilizadas, possibilitando a detecção rápida e segura das células tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho foi validar a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a investigação de marcadores de diagnóstico e de prognóstico para o câncer de mama.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Etiologia, Epidemiologia e Fatores de Risco do Câncer de Mama

O câncer de mama é considerado uma doença multifatorial, onde há influência de componentes genéticos e ambientais. Dentre os maiores progressos realizados nessa área estão a caracterização dos genes *BRCA-1* e *BRCA-2* e suas mutações. Ambos os genes codificam proteínas fundamentais nos processos de reparo do DNA por recombinação homóloga, especialmente nos casos de quebra nos dois lados da dupla fita. Sem as proteínas de reparo, o material genético fica suscetível a rearranjos inadequados, o que eleva a propensão ao desenvolvimento de tumores (APARICIO et al., 2014; O' DONOVAN; LIVINGSTON, 2010). No entanto, apenas cerca de 10% de todos os casos de câncer de mama parecem ter influência direta de um componente hereditário (PARKES; ARUN; LITTON, 2017), como as mutações nos genes supracitados. Os outros 90% dos casos são considerados esporádicos e estão relacionados a questões ambientais, de estilo de vida e, eventualmente, de mutações em outros genes (SUN et al., 2017).

A etiologia do câncer de mama é complexa e requer cautela ao avaliar fatores de risco. Além do mais, há diferentes tipos de tumores mamários, o que nos leva a inferir que as peculiaridades de cada tipo de tumor podem estar relacionadas à exposição a determinados fatores de risco (HIATT; BRODY, 2018).

Outro fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de mama é a utilização de hormônios exógenos, geralmente administrados na forma de anticoncepcionais ou nos tratamentos de reposição hormonal pós-menopausa (SUN et al., 2017). O estudo realizado por Hunter et al. (2010) demonstrou que existe um aumento na probabilidade do surgimento de câncer em usuárias de anticoncepcionais, no entanto, este risco volta aos níveis normais quatro anos após a interrupção do tratamento. Considerando que as usuárias de anticoncepcionais são mulheres mais jovens e, portanto, menos propensas a desenvolver esse tipo de tumor, o risco oferecido por esses medicamentos para a população em geral é baixo. Por outro lado, os

tratamentos de reposição hormonal apresentam de fato um risco maior às pacientes (BETHEA et al., 2015), visto que estão associados a uma maior probabilidade no desenvolvimento dessa neoplasia (ROSSOUW et al., 2002). No entanto, esse risco também pode ser amenizado com a interrupção do tratamento de reposição hormonal, como demonstrado em um ensaio clínico realizado por Chlebowski e colaboradores (2009) que mostrou que o risco se normaliza dois anos após a interrupção do tratamento.

A obesidade também oferece risco ao desenvolvimento de tumores invasivos, porém, esse risco está mais vinculado às mulheres pós-menopausa (HIATT; BRODY, 2018). Em contrapartida, em mulheres pré-menopausa o risco associado ao desenvolvimento de alguns subtipos de tumores de mama é reduzido (PICON-RUIZ et al., 2017). Acredita-se que esse paradoxo seja motivado pelas diferenças entre os subtipos tumorais encontrados em mulheres mais velhas e mais jovens, sendo que nas primeiras há uma maior prevalência de tumores que apresentam receptores hormonais. Visto que o tecido adiposo é importante para o metabolismo e o armazenamento desses hormônios (KERSHAW; FLIER, 2004), um índice de gordura corporal elevado pode contribuir no crescimento tumoral. Quanto aos tumores de pacientes mais jovens, esses estariam associados a outros fatores de risco, como mutações genéticas (HIATT; BRODY, 2018; YANG et al., 2010).

Outro fator associado ao desenvolvimento dessa neoplasia é o consumo de drogas lícitas, como o tabaco e o álcool. A fumaça do cigarro possui mais de 20 compostos sabidamente carcinogênicos, e, embora esteja diretamente associada ao câncer de pulmão, existem estudos apontando uma relação com o câncer de mama (HIATT; BRODY, 2018; JOHNSON et al., 2010). Já o consumo de bebidas alcoólicas possui uma estrita relação com o desenvolvimento do câncer de mama, onde dependendo da quantidade de álcool ingerida por dia, o risco de câncer de mama pode aumentar em mais de 40% quando comparado a um indivíduo que não consome esse tipo de bebida (HAMAJIMA et al., 2002).

Ainda, existem outros fatores de risco que apresentam uma relação menos específica com o câncer de mama, mas que são carcinogênicos reconhecidos, como as radiações ionizantes, os compostos químicos e os

pesticidas, entre outros; e não podem ser negligenciados (HIATT; BRODY, 2018).

É importante ressaltar que todos os fatores de risco supracitados são potencialmente evitáveis por estarem relacionados ao ambiente e/ou ao estilo de vida pessoal, contudo, ainda existem outros fatores de risco importantes e difíceis de evitar que, em geral, estão relacionados à alterações da condição hormonal do paciente. Dentre esses fatores pode-se citar a precocidade da primeira menstruação, a gravidez em idade mais avançada, a nuliparidade e a menopausa tardia (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

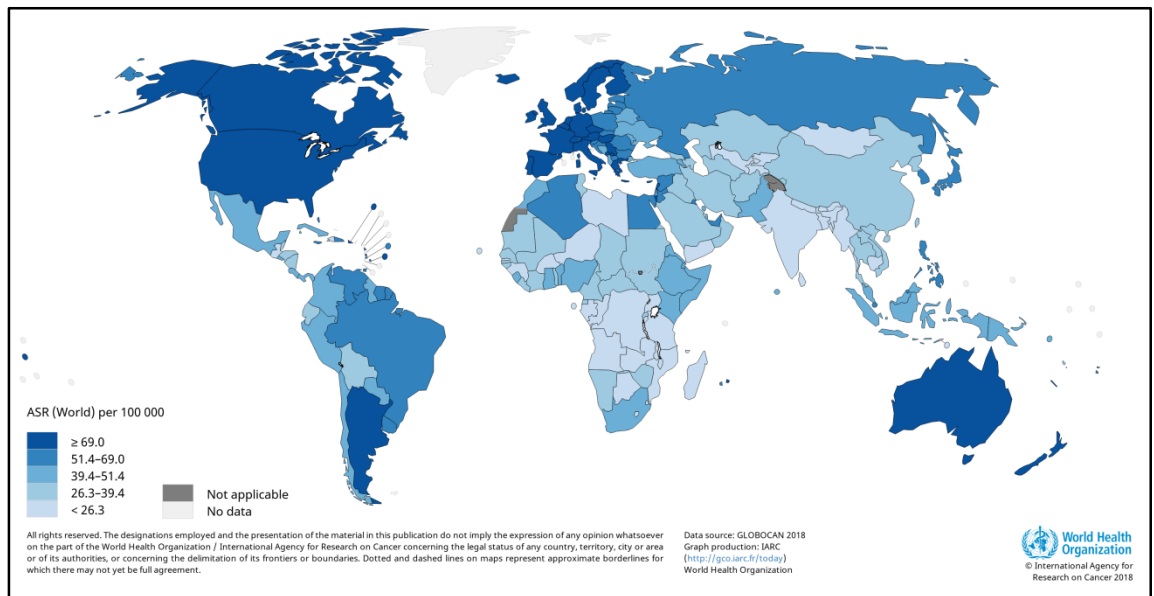
Evidentemente também existem fatores que reduzem o risco de desenvolvimento de tumores do tecido mamário, que são basicamente a manutenção de uma dieta saudável bem como a realização de atividade física regular (HIATT; BRODY, 2018; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Embora essas duas práticas citadas contribuam para a manutenção de uma vida saudável como um todo, não representam de fato uma estratégia de prevenção primária contra o câncer de mama, e considerando o impacto populacional dessa doença, sua prevenção, bem como a redução de morbidade e mortalidade seguem como um desafio a ser alcançado em diversos países.

Com relação à epidemiologia do câncer de mama, ele é o segundo tipo de câncer mais comum ao redor do mundo, e o mais frequente se considerarmos apenas as pacientes do sexo feminino. Segundo dados da OMS, somente em 2018 foram diagnosticados mais de 2.100.000 novos casos dessa doença (WHO, 2018). A incidência varia conforme a região do mundo analisada (Figura 1), e em algumas regiões pode ser quatro vezes superior a de outras. Isso pode estar relacionado ao tipo de dieta e do ambiente, pois muitos dos países de maior incidência de câncer de mama adotam um estilo de vida e padrões de alimentação ocidentais, que estão associados à obesidade e esta é fator de risco ao desenvolvimento dos tumores de mama (SHAPIRA, 2017; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003; TORRE et al., 2015).

As taxas de mortalidade por câncer de mama não oscilam tanto quanto a incidência. Mesmo nos países desenvolvidos, que podem realizar um diagnóstico mais eficiente, as taxas de mortalidade por câncer de mama são semelhantes às de países subdesenvolvidos. Isso pode ser explicado pelo

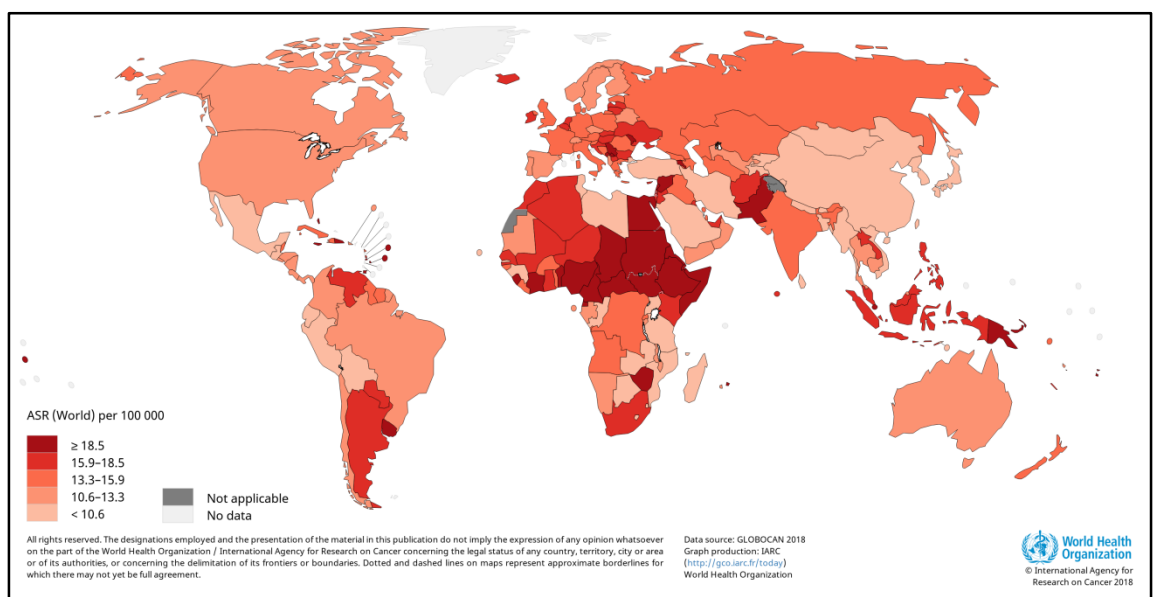
fato de que esses apresentam uma expectativa de vida menor do que os primeiros, e, em muitos casos, os pacientes não são diagnosticados ou vem a óbito antes do período que a doença se manifesta (Figura 2), Somente em 2018, em todo o mundo, foram registrados mais de 626.000 óbitos decorrentes de câncer de mama (WHO, 2018).

**Figura 1.** Incidência (por 100000 habitantes) mundial do câncer de mama.



Fonte: WHO; IARC, 2018.


**Figura 2.** Taxa de mortalidade (por 100000 habitantes) global do câncer de mama.



Fonte: WHO; IARC, 2018.

De acordo com os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres no Brasil (exceto pele não melanoma), representando 29,5% de todos os casos estimados de câncer para 2018 e 2019 (Figura 3) (INCA, 2017). A incidência dessa doença em nosso país é de 56,33 casos a cada 100 mil habitantes.

**Figura 3.** Estimativa 2018-2019 dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018.

Tendo em vista o importante impacto populacional dessa doença e a inexistência de estratégias de prevenção primária, se faz necessária a compreensão dos mecanismos de evolução desse tipo de tumor, bem como a adoção de estratégias de diagnóstico precoce. No Brasil, por exemplo, a maioria dos casos de câncer de mama é encontrada pela própria paciente em estágios mais avançados, o que acarreta na necessidade de tratamentos mais agressivos e aumento das taxas de mortalidade (BATISTON, 2009).

## 2.2. Desenvolvimento do Câncer de Mama e o seu Diagnóstico

Os carcinomas invasivos de mama são em sua maioria adenocarcinomas, ou seja, derivam das unidades funcionais da mama, lóbulos e ductos, e são distinguidos morfológicamente entre carcinomas ductais ou lobulares invasivos. Por não apresentarem nenhuma característica morfológica específica, esses tumores são classificados como carcinomas “sem outras especificações”. Também existe uma ampla gama de tumores que possuem características peculiares, e, portanto, são classificados

conforme seu fenótipo morfológico, e podem variar em relação ao prognóstico e/ou características clínicas (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Embora os carcinomas invasivos de mama apresentem essa gama fenotípica, os eventos que servem de gatilho ao desenvolvimento tumoral têm características em comum. Em geral, o início de um tumor é um processo deflagrado por alterações genéticas, que resultam na perda de mecanismos regulatórios dos processos de multiplicação celular que culminam na formação das células tumorais (FRIEDMANN-MORVINSKI; VERMA, 2014). As alterações nas proteínas BRCA-1 e p53 são exemplos que causam modificações nocivas aos processos de replicação celular, a primeira está relacionada diretamente ao processo de reparo do DNA e a última é a mais importante na manutenção da estabilidade genômica e controle do ciclo celular (BOURDON; SURGET; KHOURY, 2013; O' DONOVAN; LIVINGSTON, 2010).

Não são apenas mecanismos intracelulares que atuam no combate à multiplicação celular descontrolada, o sistema imunológico também é coparticipante nesse processo, porém de forma um tanto quanto controversa. Dependendo do estágio da doença esse sistema pode contribuir tanto para a erradicação de células tumorais, quanto para a seleção de populações celulares que não são reconhecidas como nocivas ao organismo. Essa hipótese é conhecida como teoria da “imunoedição” do câncer (CIMINO-MATHEWS et al., 2015).

De acordo com essa hipótese, a interação entre o sistema imunológico e os tumores ocorre em três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Na primeira fase, o aparecimento de uma população celular anormal e as alterações no microambiente tumoral desencadeiam um processo inflamatório agudo e o recrutamento de células do sistema imune inato. O reconhecimento dessas células alteradas promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina-12 e o interferon  $\gamma$ , o que amplifica o recrutamento de mais células do sistema imune, a fim de eliminar a população celular anômala. Durante esse processo, as células dendríticas reconhecem antígenos próprios das células tumorais e os apresentam a linfócitos T presentes nos linfonodos, que acabam por se infiltrar no microambiente tumoral dando início a resposta imune adaptativa antitumoral. Ao fim dessa

etapa, as células tumorais podem percorrer diferentes caminhos, ou são eliminadas ou ocorre a seleção de populações de células tumorais que não são identificadas como nocivas aos sistemas de defesa do organismo (CIMINO-MATHEWS et al., 2015; DUNN et al., 2002).

Paradoxalmente, é o próprio desenvolvimento da resposta imune que acaba por pressionar as células tumorais a desenvolverem esses mecanismos evasivos, selecionando células com alterações que não são percebidas pelo sistema imunológico como nocivas ao organismo. Na fase de equilíbrio ocorre a cronificação do processo inflamatório e o recrutamento - pelo próprio tumor - de células do sistema imune (linfócitos T regulatórios e linfócitos T helper 2, por exemplo) formando estruturas linfoides terciárias, que acabam por reduzir a atividade de linfócitos com atividade antitumoral. Ao fim as células tumorais acabam por burlar completamente as defesas do organismo, o que caracteriza a fase de escape, onde ocorre de fato a expansão do processo tumoral (CIMINO-MATHEWS et al., 2015; COUSSENS E POLLARD, 2011).

A presença de estruturas linfoides terciárias já foi detectada em carcinomas invasivos de mama e está relacionada a subtipos mais agressivos do tumor, entretanto, a presença dessas estruturas também faz com que os tumores respondam melhor a imunoterapia, evidenciando novamente a intrincada relação entre o desenvolvimento tumoral e o sistema imunológico (BUISSERET et al., 2016). Os linfócitos são os protagonistas nessa interação entre o sistema imune do indivíduo e as células tumorais, já que basicamente são os linfócitos T CD4+ *helper* 1 que reconhecem as células tumorais como células anormais e, juntamente com outros mediadores, induzem a ação dos linfócitos T CD8+, que promovem a eliminação das células tumorais (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Além disso, a prevalência de linfócitos T CD8+ sobre demais tipos de linfócitos representa um melhor prognóstico e resposta ao tratamento quimioterápico (ASANO et al., 2016; SEO et al., 2013). Entretanto, outras populações de linfócitos parecem reduzir a resposta do sistema imune do indivíduo, e por consequência, comprometer seu prognóstico, como os linfócitos TCD4+ *helper* 2. Esses linfócitos, especialmente quando expressam a proteína FOXP3, reduzem a resposta imune ao tumor, seja por induzir a liberação de citocinas anti-inflamatórias,

seja por induzir a expressão de receptores que suprimem as respostas do sistema imunológico (ASANO et al., 2016; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

Devido ao fato das células tumorais derivarem de células mamárias, é evidente que elas apresentarão características (morfologia, padrão de expressão, etc.) pertinentes ao tecido mamário e responderão a estímulos direcionados a esse tipo de tecido. As glândulas mamárias são particularmente ricas em receptores hormonais. Na mulher esses receptores são essenciais para o desenvolvimento e a maturação adequada desse tecido. O estrogênio é responsável pelo crescimento do sistema de ductos e pela maturação do estroma da mama; e a progesterona pelo desenvolvimento do sistema lóbulo-alveolar (MACIAS; HINCK, 2012). No câncer de mama esses dois receptores podem estar presentes ou não no tecido tumoral, dependendo do padrão de expressão da célula que lhe deu origem.

O padrão de expressão de marcadores nas células neoplásicas da mama serve como base para a classificação do subtipo molecular do tumor que acomete o paciente. O primeiro modelo proposto classificava os tumores apenas como positivos ou negativos para a expressão de receptores de estrogênio subtipo alfa ( $RE\alpha$ ) – o subtipo  $\beta$  não possui relevância clínica – e progesterona (RP). Nas últimas décadas, a classificação incluiu mais marcadores e dividiu os grupos de tumores em quatro subtipos clássicos, conforme a Tabela 1 a seguir (CIMINO-MATHEWS et al., 2015; TSANG; TSE, 2019; VIEIRA, 2007).



Tabela 1 – Padrão de expressão de marcadores dos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama

<b>Subtipo</b>	<b>Padrão de Expressão</b>
<b>Luminal A</b>	RE $\alpha$ + / RP+ / HER2- e Ki67 reduzido
<b>Luminal B</b>	RE $\alpha$ + / RP+ / HER2- e Ki67 elevado ou RE $\alpha$ + / RP+ / HER2+
<b>Superexpressão de HER2</b>	RE $\alpha$ - / RP- / HER2+
<b>Basal (Triplo Negativo)</b>	RE $\alpha$ - / RP- / HER2-

RE $\alpha$ : receptor de estrógeno alfa; RP: receptor de progesterona; HER2: *human epidermal growth factor 2*. **Fonte:** Adaptado de CIMINO-MATHEWS et al., 2015.

Além dos receptores hormonais, na divisão e na caracterização dos quatro subtipos clássicos do câncer de mama, foram incluídos os receptores HER2 e o marcador de proliferação celular Ki-67. O receptor HER2 foi descoberto em 1985 (COUSSENS et al., 1985), e é um receptor ligado a tirosina cinase, que faz parte de uma família de receptores de fatores de crescimento epidérmicos (IGNATIADIS et al., 2009). Em 1987, Slamon e colaboradores encontraram uma associação direta entre a expressão desse receptor e a menor sobrevida em pacientes com câncer de mama, e desde o começo dos anos 2000, a avaliação da expressão do receptor HER2 é utilizada como um dos determinantes para o prognóstico e para a escolha da conduta terapêutica que será aplicada ao paciente. A descoberta do Ki67 como marcador de proliferação celular na análise dos carcinomas de mama também ocorreu a partir do final dos anos 80 (BARNARD et al., 1987). Essa proteína está diretamente relacionada com a síntese de RNA ribossômico e o aumento da proliferação celular (BULLWINKEL et al., 2006). Posteriormente, essa proteína foi incluída no painel de marcadores utilizados no diagnóstico desses tipos de tumores para a diferenciação entre os subtipos luminal A e luminal B.

Desses quatro subtipos clássicos de câncer de mama, os mais prevalentes são os subtipos luminal A e luminal B, que juntos respondem por

aproximadamente 70% de todos os casos de câncer de mama, seguidos pelo subtipo triplo-negativo, com uma prevalência estimada entre 10 a 20% dos casos e o subtipo HER2 cuja prevalência varia entre 5 e 10% dos casos (CAREY et al., 2006; TAMIMI et al., 2008). Sendo que no Brasil, os poucos estudos acerca da prevalência dos subtipos clássicos de câncer de mama apresentaram perfil semelhante ao reportado pela literatura (CINTRA et al., 2012; VIEIRA, 2007).

Atualmente, outros subtipos de câncer de mama já são conhecidos, no entanto, esses só podem ser caracterizados pelas técnicas de *microarray*, as quais são pouco acessíveis a rotina em virtude do custo elevado e complexidade (PRAT; PEROU, 2010). Como a descoberta desses subtipos não causou alterações nos protocolos de tratamentos preconizados, a classificação clássica segue amplamente utilizada devido a sua aplicabilidade, e por fornecer respostas acerca de quais tratamentos podem ser utilizados, anti-hormonal para os tumores que expressam receptores hormonais e bloqueadores de HER2 quando conveniente (CAREY et al., 2006; YIN et al., 2015).

Mesmo com a ocorrência de tantos processos no microambiente tumoral, como o crescimento induzido por hormônios, inflamação, entre outros, em geral a presença do tumor passa despercebida até que ele seja palpável ou que haja retração em alguma região da mama, os quais são os sintomas mais comumente descritos pelas pacientes (LUFF et al., 1932; SINGH et al., 2014). Como até o momento não há estratégia de prevenção primária que impeça definitivamente o desenvolvimento do câncer de mama, como, por exemplo, uma vacina; o ideal é a realização de um diagnóstico precoce, se possível antes do aparecimento dos sintomas supracitados (CARTER et al., 2015). O único procedimento de triagem recomendado pelas diretrizes europeias de monitoramento de câncer de mama, bem como pelas diretrizes brasileiras é a realização de mamografia bianual em mulheres com idade de 50 a 69 anos. Em pacientes acima ou abaixo dessa faixa etária, os riscos de diagnósticos falsos e de exposição à radiação superam os benefícios da mamografia. Entretanto, ambas as diretrizes deixam clara a importância da atenção a qualquer tipo de alteração na mama, independente da idade (GIORDANO et al., 2012; INCA, 2015).

Após a identificação do nódulo suspeito por meio da mamografia, a segunda etapa do procedimento diagnóstico consiste na realização de biópsia para a identificação da população celular com características malignas, bem como do perfil de expressão de marcadores dessas células, o que permite o reconhecimento dos subtipos histopatológico e molecular do tumor de mama. Essa análise também auxilia na escolha do tratamento mais adequado à paciente, visto que determina o perfil de expressão de marcadores das células tumorais (SENKUS et al., 2015).

### **2.3. Tratamento Atual do Câncer de Mama e Perspectivas Futuras**

A estratégia terapêutica contra as neoplasias de mama é dividida em duas frentes, os tratamentos locais (cirúrgicos ou radioterapia) e os tratamentos sistêmicos (terapia endócrina e quimioterapia). Os protocolos para a utilização de cada tipo de intervenção variam conforme o estadiamento tumoral de cada paciente (SENKUS et al., 2015).

No Brasil, bem como na comunidade europeia, os carcinomas de mama invasivos são divididos em quatro níveis baseando-se no tamanho do tumor, no grau de comprometimento das estruturas adjacentes ao tumor, na existência de comprometimento linfonodal e na presença de metástases (SENKUS et al., 2015). Nos níveis de estadiamento I e II a paciente é submetida à cirurgia de remoção tumoral. Posteriormente, realiza sessões de radioterapia e por último, utiliza tratamento medicamentoso sistêmico, o qual é orientado pela determinação do subtipo molecular do tumor. Em tumores de nível de estadiamento III, geralmente a abordagem antitumoral se inicia com a utilização de medicamentos, seja por terapia hormonal ou quimioterapia, os quais visam à redução do tamanho do tumor para posterior remoção do mesmo. Essa abordagem é especialmente importante quando a paciente opta por cirurgia de conservação da mama em detrimento da mastectomia. Nos casos onde a paciente é diagnosticada com tumores com nível de estadiamento IV, onde há a presença de metástases, o tratamento também é iniciado com a abordagem sistêmica por meio de quimioterapia. O mais importante nesses casos é a busca do equilíbrio entre a resposta tumoral

adequada e o prolongamento da sobrevivência da paciente com qualidade (SENKUS et al., 2015; INCA, 2016).

Os tratamentos contra o câncer de mama têm evoluído consideravelmente com o passar do tempo. As primeiras intervenções cirúrgicas para a realização de mastectomia e remoção de nódulos datam da metade do século XVIII, e apenas no século seguinte houve o reconhecimento de que o esvaziamento axilar para a retirada de linfonodos comprometidos era importante no desfecho clínico das pacientes (BANKS, 1902; HAJDU, 2010b). Porém, essas cirurgias eram realizadas apenas baseando-se em percepções macroscópicas e, conseqüentemente, haviam boas chances da doença se manifestar novamente ou surgirem processos metastáticos. Com o advento da radioterapia no século XX reduziu-se a chance do surgimento de metástases e aumentou-se a expectativa de vida das pacientes, pois dessa forma era possível eliminar os focos de células tumorais indetectáveis nos exames por meio da radiação ou reduzir o tamanho do tumor tornando-os operáveis (BOUCHARD, 1943; LIGHTOWLERS et al., 2017).

Os procedimentos cirúrgicos e de radioterapia, como mencionado anteriormente, abordam a doença de maneira local. Na presença de metástases distantes antes dessas intervenções, essas células não serão afetadas por esse tipo de tratamento, comprometendo o prognóstico das pacientes. Com o estabelecimento da terapia hormonal e da quimioterapia houve uma melhora nesse prospecto, visto que os fármacos atuam de forma sistêmica. A origem da abordagem anti-hormonal se deu em 1896, quando foi observado que algumas pacientes portadoras de câncer de mama tiveram uma redução significativa no tamanho do tumor após passarem por ooforectomia (BEATSON, 1896; JENSEN E JORDAN, 2003). A partir dessas observações foi possível estabelecer a primeira relação entre crescimento tumoral e ação hormonal, a qual deu origem aos tratamentos baseados em antagonistas dos receptores hormonais e à classificação dos tumores baseados em seu perfil de expressão, utilizada até os dias de hoje. Evidentemente, o sucesso desse tipo de abordagem depende de um procedimento diagnóstico de qualidade (HORTON et al., 2018).

A quimioterapia, embora não seja tão específica quanto a terapia anti-hormonal, é extremamente útil nos subtipos tumorais que não expressam esse tipo de receptores, bem como em tumores de alto grau de estadiamento. A utilização dessas terapias varia caso a caso e compõem o arsenal terapêutico utilizado atualmente (SENKUS et al., 2015).

Com a evolução das técnicas diagnósticas, que permitem avaliar o perfil de expressão de genes relevantes no desenvolvimento tumoral para cada paciente e o conhecimento da influência do sistema imune na evolução tumoral, caminha-se rumo a uma maior personalização dos tratamentos. A identificação de infiltrados linfocitários intratumorais e a sua relação com o desfecho clínico dos pacientes tem sido observada em diversos trabalhos, o que estimula a busca por vacinas e fármacos que instiguem as respostas imunes contra as células tumorais (BUISSERET et al., 2016; CIMINO-MATHEWS et al., 2015; GARCÍA-TEIJIDO et al., 2016). Como a maioria dessas respostas necessita da participação direta ou indireta de linfócitos T CD4+ e CD8+, se faz necessária a utilização de metodologias que permitam rastrear de maneira rápida e eficiente o envolvimento dessas populações linfocitárias, como a citometria de fluxo.

#### **2.4. Citometria de Fluxo e Imuno-histoquímica na Análise de Tumores Sólidos**

Na última década, vem crescendo o interesse na aplicação da análise imunofenotípica por citometria de fluxo para avaliação de tumores sólidos (CHANG E HEDLEY, 2012; O'DONNELL et al., 2013). Essa metodologia baseia-se na marcação de antígenos de células isoladas, fixadas e suspensas num meio líquido, por meio de anticorpos conjugados a fluorocromos. Essas células transpassam, uma a uma, por um conjunto de feixes de lasers, que fornecem informações como tamanho, granulosidade e fluorescência emitida (referente ao tipo de fluorocromo ligada ao anticorpo utilizado), o que possibilita uma análise multiparamétrica simultânea de cada uma das células observadas, e permitem a separação de populações celulares dependendo do padrão de expressão de antígenos encontrado nas mesmas (PEDREIRA et al., 2013).

A citometria de fluxo é a metodologia padrão-ouro para o diagnóstico das neoplasias hematológicas, mas existem trabalhos que lograram sucesso na utilização desse método para a determinação da imunofenotipagem e contribuíram no diagnóstico de tumores sólidos de pacientes pediátricos (FERREIRA-FACIO et al., 2013; KOMURO et al., 2007).

As principais vantagens da citometria de fluxo consistem na agilidade da análise das amostras, o que permite a obtenção de resultados em horas, e na possibilidade da análise simultânea de diversos marcadores para todas as populações celulares encontradas (O'DONNELL et al., 2013). Entretanto, como toda metodologia, a citometria de fluxo possui certas limitações, entre elas a impossibilidade da observação da morfologia celular. Esse fator é especialmente relevante nos casos cujo imunofenótipo das células tumorais seja semelhante ao das células normais, como no câncer de mama, onde é necessária a diferenciação morfológica dos grupamentos celulares saudáveis e comprometidos (GOYAL et al., 2016; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

A metodologia padrão-ouro para a determinação do subtipo molecular do câncer de mama é a análise imuno-histoquímica do tecido tumoral. Essa metodologia consiste na marcação de antígenos de interesse por meio de anticorpos conjugados a sistemas enzimáticos, aos quais é adicionado um substrato que gerará um produto de coloração específica, que permite a análise da expressão desses antígenos pela visualização do produto corado nas estruturas visualizadas microscopicamente (NIKIFOROVA; NIKIFOROV, 2013).

As principais vantagens da determinação do subtipo molecular do câncer de mama por imuno-histoquímica são: em primeiro lugar, a possibilidade de se analisar simultaneamente a morfologia tecidual e o padrão de expressão do mesmo, e, em segundo lugar, o fato de ser uma técnica simples e amplamente difundida ao redor do mundo, o que facilita a troca de informações e a comparação entre os protocolos utilizados em diferentes laboratórios (PARK et al., 2012). Contudo, por ser uma técnica que depende de uma série de etapas realizadas manualmente, o laboratório de patologia deve ter rigoroso controle dos processos de preparação das amostras para a manutenção dos antígenos celulares. Outras desvantagens dessa metodologia são a incapacidade em se analisar a totalidade das células da

amostra coletada, o tempo necessário para a liberação do laudo histopatológico e a dificuldade em obter marcações para diversos antígenos no mesmo corte de tecido, seja por falta de disponibilidade de conjugados com enzimas distintas uns dos outros, seja pela necessidade de recorrer a *softwares* a fim de se fazer a interpretação correta dos limites microscópicos de cada coloração (NIKIFOROVA; NIKIFOROV, 2013).

Ademais, há o risco de viés observacional por parte do morfolologista, pois como não há ferramenta para interpretação dos resultados, a avaliação é realizada pelo próprio patologista de maneira semi-quantitativa (FOCKE et al., 2017; POLLEY et al., 2015). Evidentemente existem protocolos que normatizam a interpretação dos resultados para alguns dos marcadores, reduzindo assim eventuais distorções de resultados entre laboratórios. Um dos sistemas de pontuação criados para a avaliação do subtipo molecular do câncer de mama é o sistema de escore Allred. Nesse sistema o tecido tumoral é avaliado quanto à quantidade de células que expressam o marcador de interesse e quanto à intensidade de expressão do mesmo marcador. Ao final da análise o tumor recebe uma pontuação de 0 a 8, que avalia a positividade para um determinado receptor (ALLRED et al., 1998).

Até o momento, não há trabalhos na literatura que compararam as duas metodologias, imunofenotipagem por citometria de fluxo e imunohistoquímica, na sua capacidade de determinar o subtipo molecular do câncer de mama. Os trabalhos que analisaram células de neoplasias mamárias por citometria de fluxo, o fizeram para averiguar a presença de aneuploidia (EWERS; BALDETORP; KILLANDER, 1984), quantificando DNA em seus núcleos ou para a análise de infiltrados linfocitários intratumorais (BUISSERET et al., 2016; GARAUD et al., 2014). Todavia, por conta das características de cada uma das metodologias, não é uma questão de qual seria a melhor delas, mas sim de como elas podem se complementar em benefício de um diagnóstico mais rápido e seguro ao paciente, considerando que muitas vezes esse é diagnosticado tardiamente (LOPES et al., 2017). Além de benefícios ao paciente, o investimento em diagnóstico gera economia aos sistemas de saúde. Estimativas apontam que apenas em 2012 o custo sócio-econômico gerado por conta de erros na análise de receptores

HER2 chegou a quase 1 bilhão de dólares nos Estados Unidos (GARRISON et al., 2015).

Nesse sentido, acredita-se que a utilização da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica e imuno-histoquímica possam sobrepor as limitações individuais de cada uma das metodologias e proporcionar resultados fidedignos de maneira mais rápida e eficiente, resultando em diagnósticos mais precoces, beneficiando diretamente os pacientes. Ademais, como o processo patológico do câncer de mama está intimamente ligado ao sistema imunológico; há a possibilidade de diferenciar, por citometria de fluxo, as populações linfocitárias infiltradas no tumor e as citocinas relacionadas ao processo inflamatório subjacente, o que fornece informações importantes sobre a fisiopatologia e o prognóstico da doença. Sendo assim, este trabalho visa avaliar a viabilidade da utilização da citometria de fluxo no auxílio ao diagnóstico e ao prognóstico do câncer de mama em pacientes atendidas no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC/EBSERH).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral:**

Validar a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a investigação de marcadores de diagnóstico e de prognóstico para o câncer de mama.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

- Estabelecer um painel de anticorpos monoclonais capaz de identificar e diferenciar as células neoplásicas;
- Padronizar e validar a metodologia de citometria de fluxo para a identificação dos subtipos de câncer de mama;
- Comparar os resultados obtidos na imunofenotipagem por citometria de fluxo com aqueles obtidos pela análise imuno-histoquímica;
- Investigar os subtipos de linfócitos infiltrados no tumor e sua relação com o desenvolvimento tumoral.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cultura Celular e Titulação dos Anticorpos

A fim de determinar a concentração mais adequada de anticorpos a serem utilizados nas etapas subsequentes do trabalho, optou-se pela titulação dos mesmos e avaliação da otimização da reação antígeno-anticorpo utilizando-se células de cultura de linhagens derivadas de tumores de mama, as quais possuem um fenótipo conhecido, visto que o perfil de expressão das células oriundas das biópsias era desconhecido.

Nesta etapa foram utilizadas células de segunda passagem das linhagens MCF-7, SKBR3 e MDA-MB231 (ATCC, Manassas, EUA), as quais se enquadram, respectivamente, nos subtipos: luminal A, superexpressão de HER2 e triplo negativo (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Todas as células foram mantidas em garrafas para cultura celular contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco®), 100 U/ml de penicilina (Gibco®), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco®) e 10 mM de tampão HEPES (Gibco®) em pH 7,2. As células foram mantidas em incubadora com atmosfera úmida de 5 % de CO<sub>2</sub> à 37 °C e o meio trocado a cada 2 ou 3 dias para manutenção da viabilidade celular.

Antes dos experimentos de titulação dos anticorpos para citometria de fluxo as células foram tratadas com tripsina (0,25%) durante 5 a 15 minutos, com o objetivo de desagregá-las. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida a um tubo falcon contendo meio de cultura a fim de evitar uma perda de viabilidade por conta da ação da tripsina. Após essa etapa o tubo falcon foi centrifugado a 1500 rotações por minuto para remover o meio de cultura contendo tripsina. Finalmente, o *pellet* celular foi ressuspenso com tampão salina-fosfato (PBS) e essa suspensão foi utilizada na titulação dos anticorpos.

Cada uma das suspensões celulares obtidas foi marcada com anticorpos monoclonais específicos, dependendo do padrão de expressão

das linhagens. As células MCF-7 foram marcadas com 3µl de anticorpos anti REα na concentração de 0,5 mg/ml (Abcam®) e 7µl de anti RP na concentração de 0,2 mg/ml (ThermoFisher®); as células SKBR-3 foram marcadas com 15 µl de anticorpos anti receptor HER2 na concentração de 5 µg/ml (BD®) e as células MDA-MB-231 foram marcadas com 20µl de anticorpos anti receptor EGFR (BD®), conforme indicação da fabricante. Embora as amostras não sejam rotineiramente testadas para a presença do receptor EGFR na prática clínica, optamos pela utilização desse marcador em amostras de tumores do tipo “triplo negativo”, visto que esse receptor eventualmente pode estar expresso em tumores e ser útil na discriminação desse subtipo em específico.

Como os receptores hormonais e o marcador de proliferação celular Ki67 estão localizados no citoplasma das células e, portanto, inacessíveis a técnicas de marcação direta, foi utilizado protocolo de fixação e permeabilização, conforme estabelecido no protocolo operacional padrão do setor de Onco-hematologia do HU-UFSC/EBSERH. Sendo assim, primeiramente 100 µl de suspensão celular foram marcados com os anticorpos contra os antígenos de superfície das células, homogeneizados em vortex e incubados por 15 minutos. Depois, acrescentou-se 1 ml de solução lisante (nos tubos com marcadores direcionados apenas a antígenos da membrana celular) ou 100 µl de reagente de fixação (tubos para análise de antígenos intracitoplasmáticos) seguido de nova incubação por 15 minutos. Posteriormente, à suspensão, foi acrescentado 4 ml de PBS e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2.000 RPM para separação do *pellet* celular e remoção dos resíduos de reagente de fixação e lisante. Após essa etapa, os tubos marcados apenas para antígenos localizados na superfície celular foram ressuspensos com 300 µl de PBS, homogeneizados e estavam prontos para análise. Aos tubos para marcação intracelular, após a remoção do PBS contendo reagente de fixação foi adicionado 100 µl do reagente de permeabilização, seguidos dos anticorpos contra os antígenos intracitoplasmáticos que foram incubados novamente por 15 minutos. Após esse período, foram adicionados aos tubos 4 ml de PBS e os mesmos foram centrifugados novamente por 5 minutos a 2.000 RPM. Finalmente, a solução

PBS contendo os resíduos de reagente de permeabilização foi removida, o *pellet* de células foi ressuspensão com 300 µl de PBS e o tubo pode ser submetido à análise no citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson (BD), San Jose, Ca, USA).

#### **4.2. Seleção dos Pacientes**

Para a realização deste trabalho foram selecionados pacientes diagnosticados com carcinoma invasivo de mama, independentemente do subtipo tumoral e da realização ou não de tratamento prévio, e recomendação de remoção cirúrgica de nódulos, regiões da mama ou mastectomia total. As amostras foram coletadas junto à Unidade de Anatomia Patológica (UAP) do HU-UFSC/EBSERH no período de 27/04/2017 a 06/12/2018. O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (CEPSH) da UFSC (número de protocolo: 1.691.983/2016) e antes do procedimento cirúrgico todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A), conforme orientação do CEPSH.

Nos casos de pacientes cujos tumores fossem menores que 1 cm ou que a retirada de material da amostra pudesse comprometer a análise pelas metodologias utilizadas na UAP do HU-UFSC/EBSERH para o diagnóstico do câncer de mama, estes foram excluídos do estudo. Outro critério de exclusão utilizado foi a ausência de populações de células viáveis após a avaliação com o marcador de viabilidade 7-aminoactinomicina D (7AAD) (BD®).

O cálculo do tamanho amostral mínimo para a validação de um teste qualitativo foi realizado conforme o preconizado por Hulley e Cummings (1988) e resultou num total de 369 amostras. Entretanto, essa quantidade de amostras era superior à incidência esperada pelo INCA (2017) de casos de câncer de mama no município de Florianópolis no biênio 2017/2018 (190 casos). Além disso, a captação e análise dessa quantidade de amostras seriam inviáveis do ponto de vista técnico e financeiro do laboratório. Sendo assim, o presente estudo baseou-se nas diretrizes do *National Committee for*

*Clinical Laboratory Standards* para validação de métodos qualitativos (NCCLS, 2002), que recomenda um mínimo de 50 amostras para a realização desse tipo de trabalho. Ao todo, 70 pacientes aceitaram participar do estudo, dos quais 18 foram excluídos por se enquadrarem em algum dos critérios de exclusão, resultando, portanto, num total de 52 amostras analisadas.

#### **4.3. Processamento das Amostras de Origem Humana**

Após a remoção cirúrgica dos carcinomas invasivos de mama, todas as amostras foram analisadas primeiramente pela equipe da UAP HU-UFSC/EBSERH, a qual determinava durante a macroscopia tumoral, qual porção do tecido tumoral poderia ser cedida à análise por citometria de fluxo. Cada uma dessas amostras possuía um tamanho médio de aproximadamente 0,7 cm<sup>3</sup>. A fim de se garantir que as amostras utilizadas na citometria de fluxo se tratavam de fato de tecido tumoral, nesta etapa também foi confeccionada uma lâmina de microscopia por *imprinting* do material analisado, seguido de fixação e coloração Hematoxilina-Eosina para fins de controle. Posteriormente, a porção a ser analisada por citometria de fluxo foi colocada em um tubo tipo falcon contendo 5 ml de meio de cultura DMEM para manutenção da viabilidade celular e encaminhada ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH) do CCS/UFSC.

Para a realização da imunofenotipagem do tecido mamário é necessário a preparação da amostra a fim de se obter uma suspensão celular. Portanto, nesse processo a amostra foi seccionada em pequenos pedaços com bisturi, e depois macerada em tubo de ensaio contendo 600 µl de PBS. Depois, o conteúdo do tubo de ensaio foi filtrado em filtros de 100 µm para eliminar partículas do tecido cujo tamanho poderia causar entupimento no sistema de fluidos do citômetro de fluxo, e, finalmente, procedeu-se a marcação com anticorpos de interesse da suspensão celular obtida após a filtração. Na etapa de aquisição das amostras por citometria não foi estabelecido um número máximo de eventos a serem adquiridos. Padronizou-se a aquisição do volume total de suspensão celular simples obtido em cada tubo, a fim de se obter uma população representativa das células tumorais.

#### **4.4. Painel de Anticorpos Utilizado, Marcação e Identificação das Amostras**

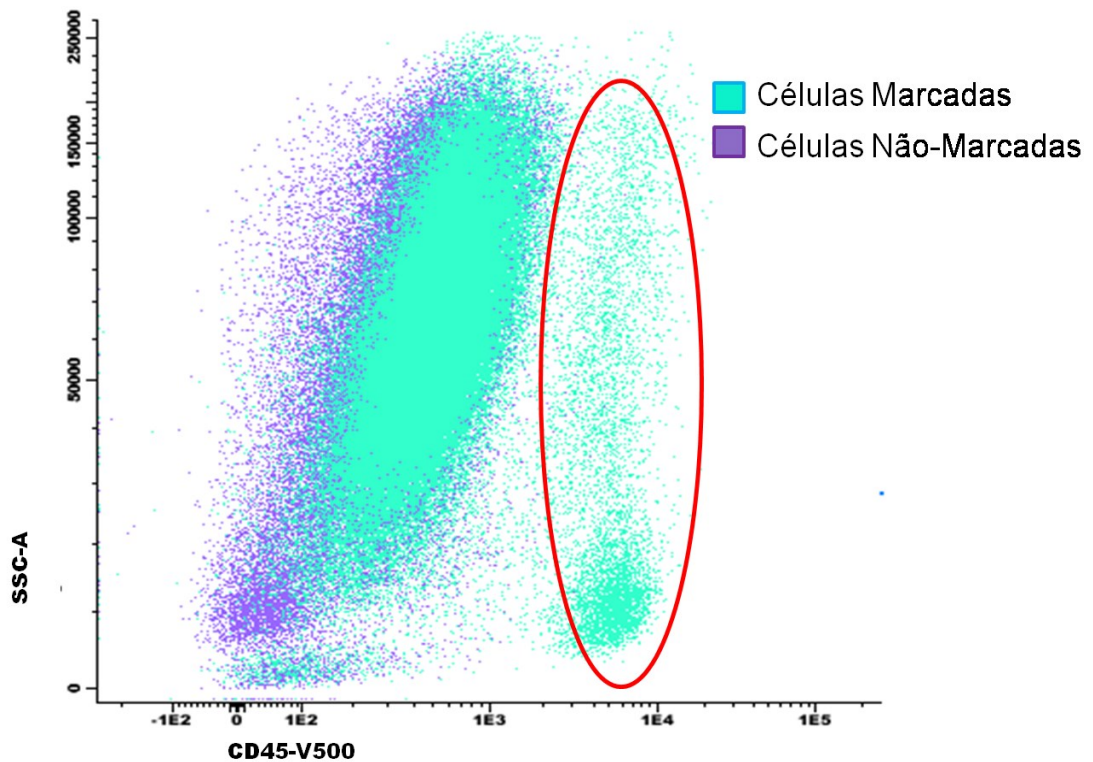
Uma das exigências para a realização de uma análise de qualidade por citometria de fluxo é que as células estejam viáveis. Então, antes de marcar as amostras com os anticorpos usualmente utilizados no diagnóstico de câncer de mama, a viabilidade da amostra foi avaliada com o 7AAD (BD®). Esse composto tem alta afinidade por DNA, assim, se houver dano nas estruturas celulares expondo seu DNA, ele se ligará ao mesmo e as células apresentarão fluorescência, a qual será detectada pelo citômetro de fluxo, demonstrando a inviabilidade das células.

Diferentemente de amostras de sangue periférico, cujas células possuem um perfil amplamente conhecido em relação à expressão do CD 45, para a análise das células de câncer de mama foi necessário estabelecer uma estratégia de análise baseada nas diferenças entre essas populações celulares, como mostra a Figura 5. Assim, sabendo da presença de infiltrados de linfócitos nos tumores de mama, a amostra foi marcada com anti-CD45 (BD®), um marcador pan-leucocitário e não expresso em células mamárias (PAULA et al., 2017) para identificar as células linfoides na amostra. Como as células tumorais em geral são de duas a três vezes maiores que os linfócitos, foi possível identificá-las baseando-se em seu tamanho e na ausência de expressão do receptor CD45. As células com essas características e consideradas viáveis foram marcadas com os anticorpos previamente titulados nos experimentos com as células de cultura, conforme protocolo descrito anteriormente e seguindo o painel de anticorpos descritos na Tabela 2.

Entretanto, mesmo sendo possível diferenciar os dois grupos celulares, observou-se que as células tumorais apresentavam certo grau de fluorescência no comprimento de onda referente ao CD45 (Figura 5, Painel F), embora não expressem esse marcador. Sendo assim, de modo a avaliar o grau de autofluorescência das células tumorais, foi realizado um experimento adicional marcando um tubo de amostra de células tumorais com o anticorpo anti-CD45 e outro sem esse anticorpo. Como pode ser observado na Figura 4,

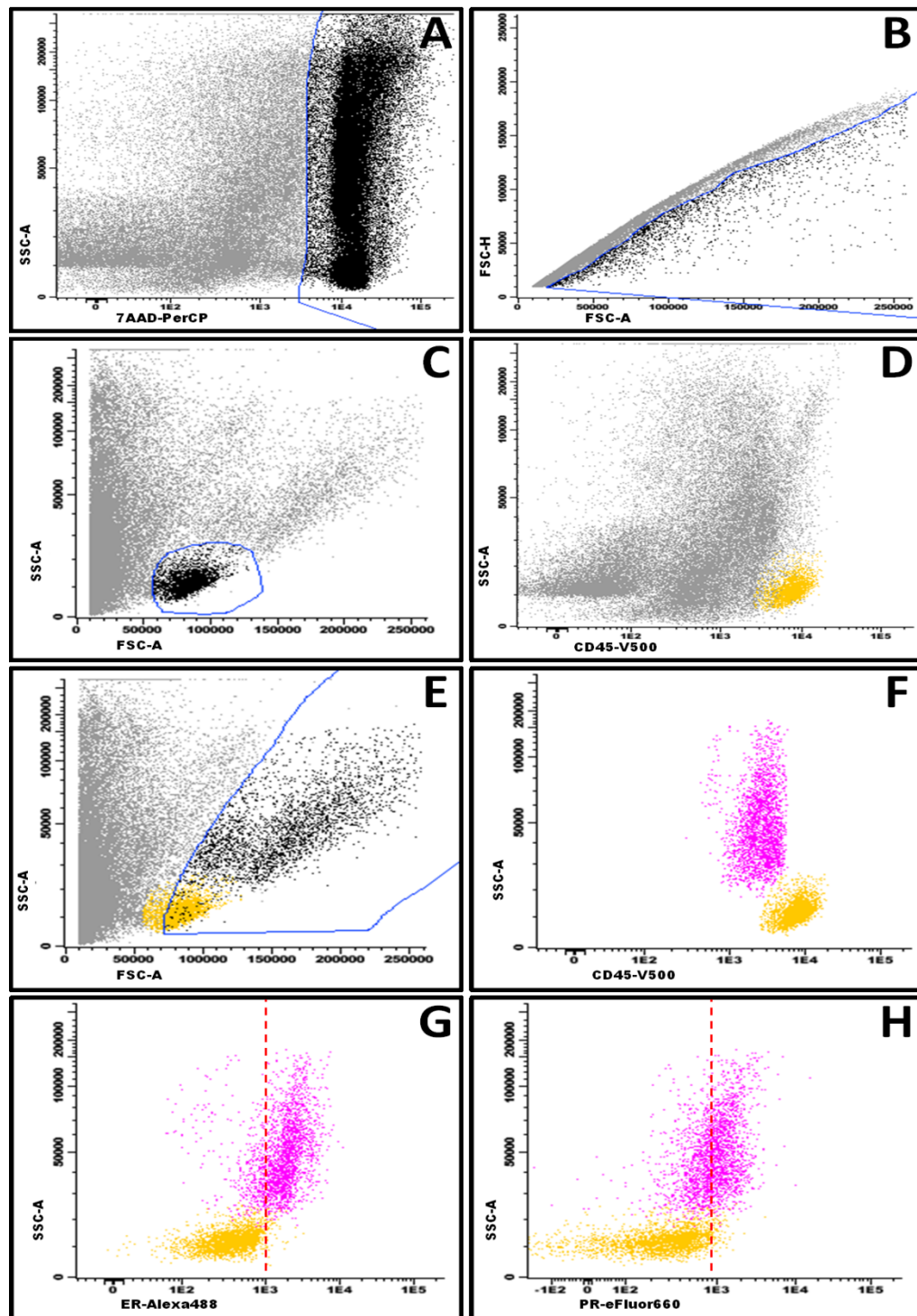
a utilização do anticorpo anti-CD45 permite a visualização das populações linfocitárias e de demais células com alta expressão de CD45, ao passo que as demais populações celulares permanecem com a mesma intensidade de fluorescência, independentemente da utilização ou não de anticorpo anti-CD45, comprovando que as células tumorais possuem certo grau de autofluorescência no comprimento de onda referente ao fluorocromo V500.

**Figura 4.** Teste de autofluorescência das células tumorais



Sobreposição dos *Dot-Plots* da mesma amostra marcada com anticorpos anti CD-45 (em azul) e não marcada com os anticorpos anti CD-45 (lilás). Em destaque estão as populações de linfócitos e demais leucócitos, que possuem alta expressão de CD45. A intensidade de fluorescência das outras populações não é alterada pela marcação com os anticorpos anti CD-45.

Figura 5. Estratégia de *Gating*



**Painel A:** Células não viáveis selecionadas e removidas devido a sua permeabilidade ao 7AAD. **Painel B:** “Dupletes” identificados e excluídos baseando-se nas proporções de FSC-H e FSC-A. **Painéis C e D:** Identificação dos infiltrados de linfócitos intratumorais, células menores com alta expressão de CD45 (amarelo). **Painéis E e F:** Identificação das células tumorais, que são duas a três vezes maiores que os linfócitos e não expressam CD45. **Painéis G e H:** Exemplos da expressão de RE e RP em tumores de mama e sua comparação com os linfócitos. 7AAD: 7-aminoactinomicina D; ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona. **Fonte:** O Autor.



Tabela 2 – Painel de anticorpos utilizados em cada tubo de suspensão celular.

Tubos	Fluorocromos				
	V500	FITC	PE	PerCP	APC
<b>Tubo 1</b>	CD45	Anti-RE $\alpha$	Anti-HER2	7AAD	Anti-RP
<b>Tubo 2</b>	CD45	Anti-Ki67	X	7AAD	X
<b>Tubo 3</b>	CD45	CD4	CD8	CD3	X
<b>Tubo 4</b>	CD45	X	EGFR	7AAD	X

*FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: phycoerythrin; PerCP: Peridinin Chlorophyll Protein Complex; APC: allophycocyanin; RE $\alpha$ : receptor de estrógeno alfa; RP: receptor de progesterona; HER2: human epidermal growth factor 2; 7AAD: 7-aminoactinomicina D; EGFR: epidermal growth factor receptor. Fonte: O autor.*

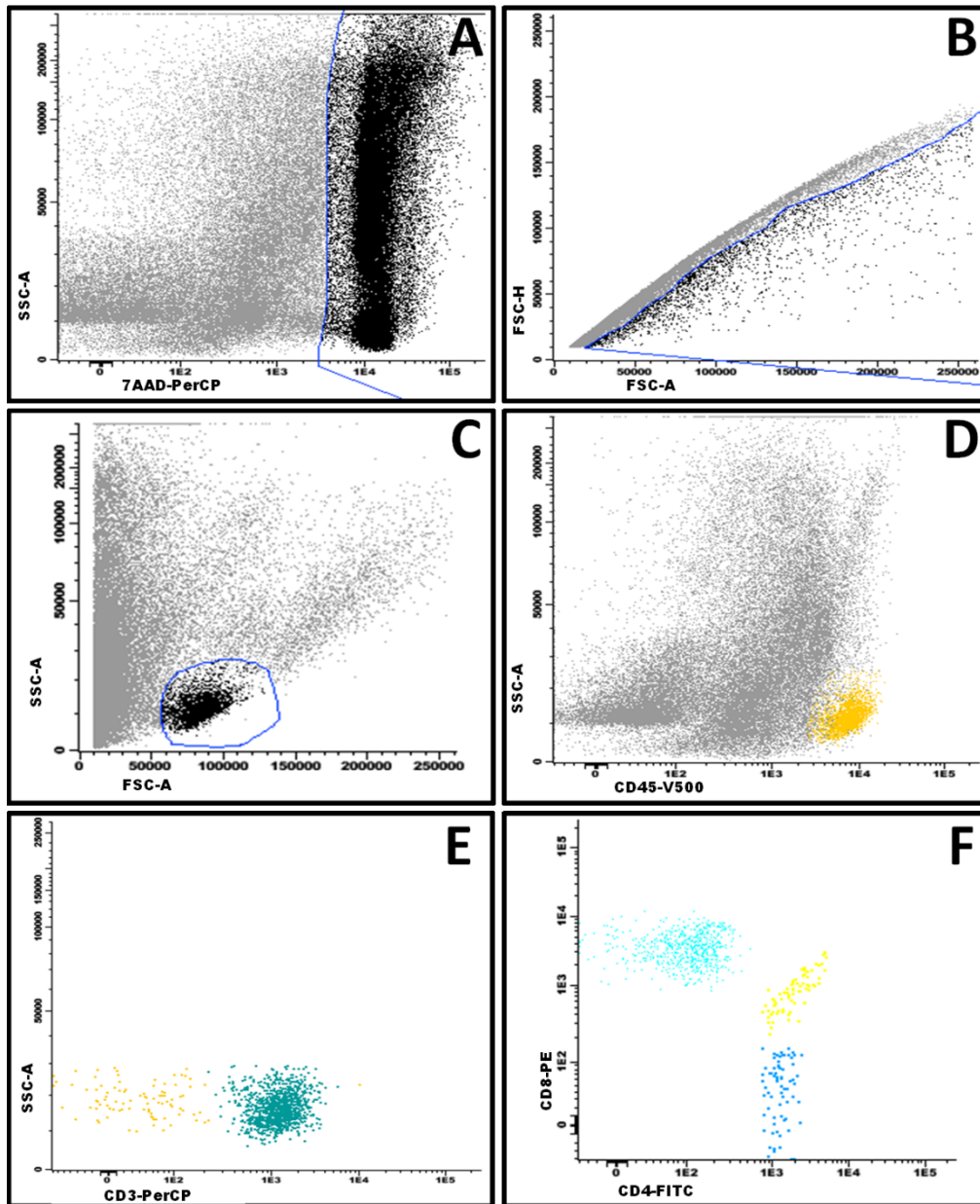
Por fim, após a aquisição das amostras por citometria de fluxo, a intensidade da fluorescência para cada um dos marcadores utilizados foi analisada com o auxílio do *software* Infinicity 1.7 (Cytognos, Salamanca, Espanha). Este *software* permite a discriminação de populações celulares baseando-se em seus perfis de expressão e a subsequente seleção e separação das mesmas através de “*gates*”. A Figura 5 resume a estratégia de *gating* utilizada no presente estudo.

Os resultados obtidos nesta etapa foram confrontados com os resultados das análises imuno-histoquímicas realizadas de forma independente pelos profissionais da UAP HU-UFSC/EBSERH. Posteriormente, esses resultados foram comparados utilizando-se diagramas de contenção que avaliaram a positividade e a negatividade para cada um dos marcadores em ambas as metodologias.

Adicionalmente, foi realizada análise da população de linfócitos intratumorais isolados conforme descrito na Figura 6. Para tanto se buscou discriminar as subpopulações de linfócitos T *helper* e de linfócitos T citotóxicos, por meio da utilização de anticorpos contra CD3, CD4 e CD8 e assim determinar a distribuição relativa (prevalência de linfócitos T CD4+ ou

CD8+) dessas subpopulações em cada um dos pacientes. Assim, foram tomados os valores percentuais de cada um dos subtipos de linfócitos T encontrados e dividiu-se o percentual encontrado de linfócitos T CD4+ pelo percentual de linfócitos T CD8+, estabelecendo uma relação onde valores  $>1$ , indicam predominância de linfócitos T CD4+ e valores  $<1$ , predominância de linfócitos T CD8+. Por fim, verificou-se o perfil dos linfócitos intratumorais tinha alguma relação com o subtipo ou com o grau histológico do tumor.

**Figura 6.** Estratégia de *Gating* dos linfócitos intratumorais



**Painel A:** Células não viáveis selecionadas e removidas devido a sua permeabilidade ao 7AAD. **Painel B:** “Dupletes” identificados e excluídos baseando-se nas proporções de FSC-H e FSC-A. **Painéis C e D:** Identificação dos infiltrados de linfócitos intratumorais, células menores com alta expressão de CD45 (amarelo). **Painel E:** Identificação dos linfócitos T dentro o total de linfócitos intratumorais encontrados. **Painel F:** Figura representativa da diferença de distribuição das subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+. **Fonte:** O Autor.

#### 4.5. Análise Estatística

As variáveis nominais foram sumarizadas como números absolutos e relativos e os resultados obtidos foram comparados com o auxílio de diagramas de contenção. Dentro dos diagramas os resultados foram classificados como verdadeiros positivos (VP), falsos positivos (FP), verdadeiros negativos (VN) e falsos negativos (FN). Para os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram aplicadas as respectivas fórmulas:  $VP/(FN+VP)$ ;  $VN/(FP+VN)$ ;  $VP/(VP+FP)$  e  $VN/(VN+FN)$ . Adicionalmente foi realizado o teste *kappa* de Cohen para avaliar o grau de concordância entre as duas metodologias empregadas, sendo que um coeficiente de *kappa* de valor igual a 1 significa a concordância perfeita entre os testes. Para a comparação entre o perfil dos linfócitos encontrados e sua correlação com o subtipo e o grau histológico tumoral, os dados também foram classificados através de diagramas de contenção e comparados através do teste de qui-quadrado de Pearson. As variáveis numéricas serão sumarizadas como a mediana, a média e o desvio padrão e serão comparadas pelo teste t de Student seguido de análise de Bland-Altman para verificar diferenças entre as metodologias empregadas no estudo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Determinação das Concentrações Adequadas dos Anticorpos de Interesse

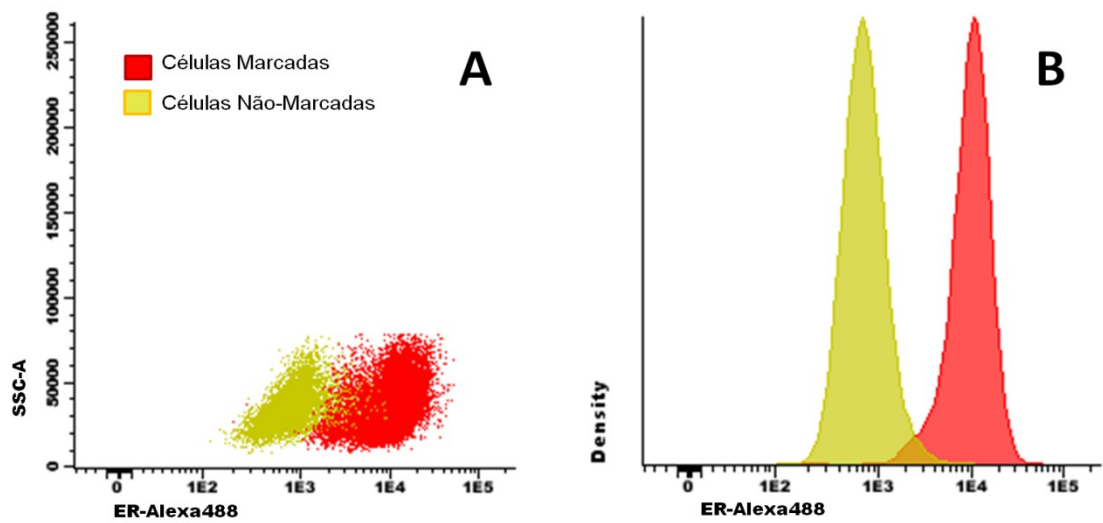
Embora a maior parte dos fabricantes forneça a concentração de anticorpo recomendado nas bulas de seus produtos, a etapa de titulação é essencial para a qualidade das análises, visto que existem diferenças consideráveis na expressão de receptores entre as populações celulares. Além disso, a titulação pode representar uma economia considerável de recursos, pois por vezes são obtidos resultados satisfatórios com quantidades de anticorpos inferiores às recomendadas (COLLINO; JALDIN-FINCATI; CHIABRANDO, 2007).

Sendo assim, para realizar essa avaliação comparamos os valores basais de fluorescência das células não marcadas com a intensidade de fluorescência após a marcação com anticorpos de interesse em diferentes concentrações, a fim de encontrar a concentração mais adequada para utilização neste trabalho (dados não mostrados). Os resultados apresentados a seguir foram obtidos com a utilização dos volumes de anticorpos descritos na metodologia, que foram os de melhor relação custo-benefício entre a quantidade de anticorpo utilizado e a qualidade de visualização dos resultados.

Inicialmente testamos os anticorpos contra os RE $\alpha$  e RP nas células da linhagem MCF-7, que tem como característica a expressão desses receptores hormonais. Como esperado, a adição dos anticorpos causou um aumento na intensidade de fluorescência observada para ambos os marcadores de interesse quando comparados ao controle (células não marcadas). Células MCF-7 marcadas com 3 $\mu$ l de anticorpos anti-RE $\alpha$  (0,5 mg/ml) apresentaram uma intensidade de fluorescência média (IFM) mais de doze vezes maior do que células MCF-7 não-marcadas (Tabela 3). Esse resultado pode ser observado pelo deslocamento da população celular marcada na Figura 7 (Painéis A e B). A avaliação da expressão dos RP obteve resultados similares,

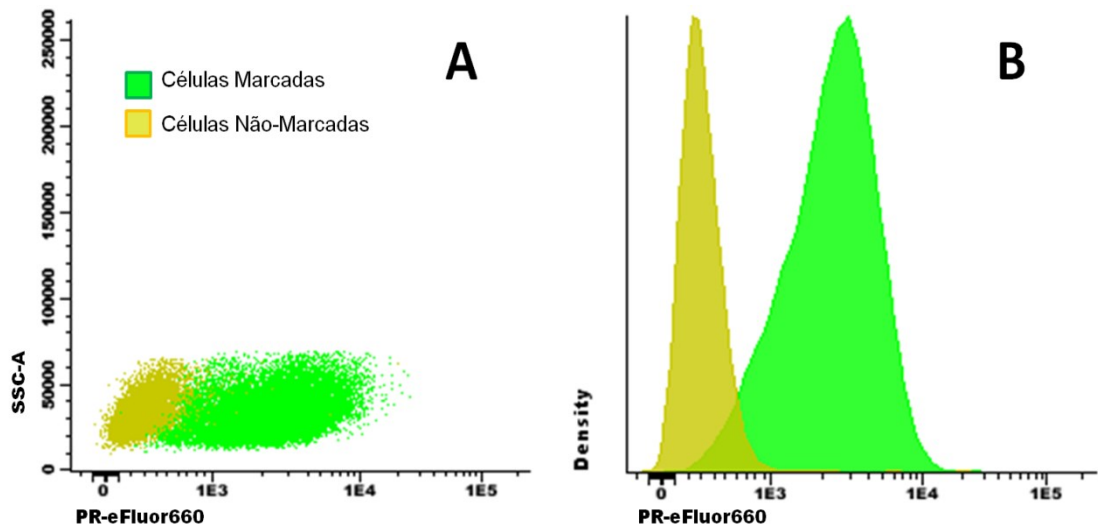
visto que as células marcadas com 7 $\mu$ l de anticorpos contra receptores de RP na concentração de 0,2 mg/ml, apresentaram um aumento de quase nove vezes na IFM (Tabela 3) quando comparadas com as células MCF-7 não-marcadas (Figura 8, Painéis A e B).

**Figura 7.** Comparação entre células MCF-7 marcadas com anticorpos anti-RE $\alpha$  e células MCF-7 não-marcadas



Painel A: “*Dot Plot*” mostrando a distribuição das populações quanto à sua complexidade estrutural (eixo y) e sua intensidade de fluorescência (eixo x). Painel B: histograma evidenciando a densidade populacional (eixo y) e a intensidade de fluorescência. **Fonte:** O autor.

**Figura 8.** Comparação entre células MCF-7 marcadas com anticorpos anti-RP e células MCF-7 não-marcadas

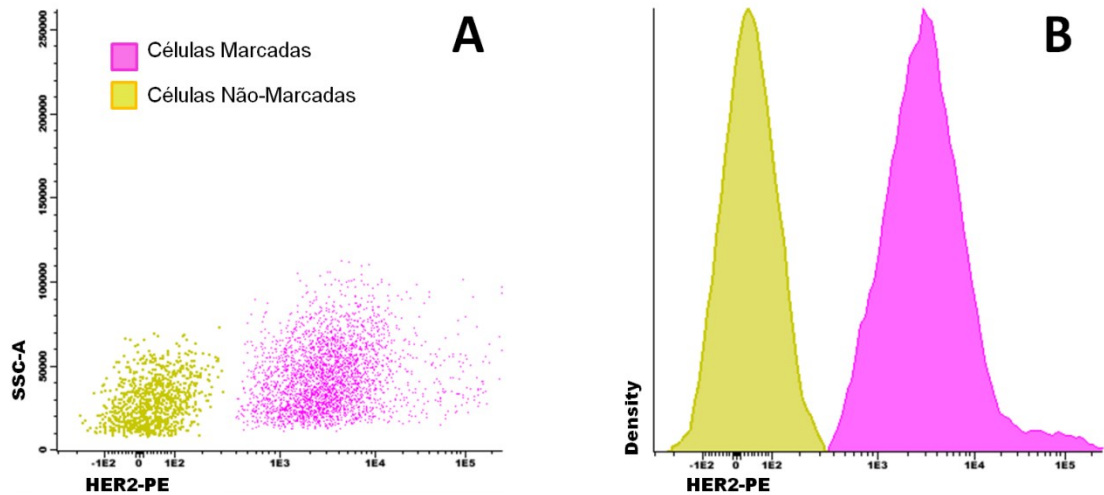


Painel A: “Dot Plot” evidenciando a complexidade estrutural (eixo y) e a intensidade de fluorescência (eixo x) das populações celulares. Painel B: histograma com os dados de densidade populacional (eixo y) versus intensidade de fluorescência (eixo x). **Fonte:** O autor.

Pode-se observar que tanto nos “Dot Plots” quanto nos histogramas, o deslocamento da população de células marcadas no eixo x, o que evidencia a capacidade dos anticorpos em detectar os RE $\alpha$  e RP presentes nas células.

O próximo passo foi realizar a padronização da marcação do receptor HER2 nas células da linhagem SKBR3, pois essas células expressam esse receptor. Assim como no experimento anterior, a citometria de fluxo foi capaz de discriminar as células SKBR3 marcadas com 15 $\mu$ l de anticorpos anti-HER2 (5  $\mu$ g/ml) das células não-marcadas. Pode-se observar o deslocamento à direita da população de células marcadas tanto no “Dot Plot” quanto no histograma (Figura 9, Painéis A e B), onde foi observado um aumento de aproximadamente cinco vezes na intensidade de fluorescência média dessas células quando comparadas com as células não-marcadas (Tabela 3).

**Figura 9.** Comparação entre células SKBR3 marcadas com anticorpos anti-HER2 e células SKBR3 não-marcadas



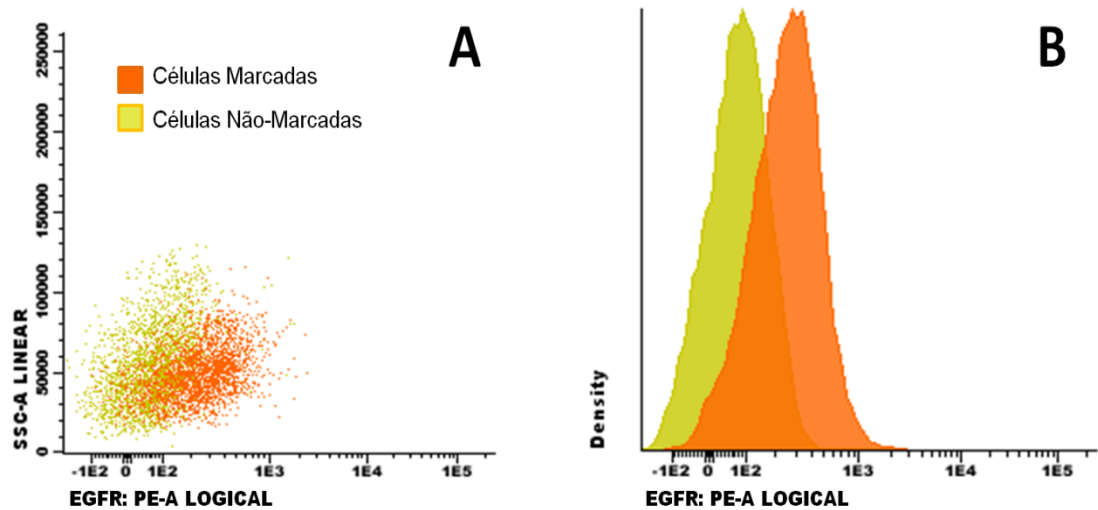
O eixo x do “Dot Plot” (Painel A) e do histograma (Painel B) indicam a intensidade de fluorescência para o receptor HER2. O eixo y do gráfico do Painel A mostra a complexidade celular (“Dot Plot”) e no Painel B a densidade populacional (histograma). **Fonte:** O Autor.

Pode-se observar que o anticorpo anti-HER2 foi capaz de detectar a presença dos receptores HER2 nas células, o qual é evidenciado pelo deslocamento da população celular marcada no “Dot Plot” e no histograma acima.

Posteriormente, foi efetuada a titulação do anticorpo anti-EGFR em células da linhagem MDA-MB-231, a qual é caracterizada por não possuir receptores hormonais nem receptores HER2, sendo assim, pode ser relacionada ao subtipo “triplo negativo” do câncer de mama. Novamente, os anticorpos contra os receptores EGFR (20  $\mu$ l) foram capazes de detectar a presença desses receptores nas células MDA-MB-231 (Figura 10), embora com uma intensidade bastante inferior aos outros anticorpos testados nas outras linhagens celulares, o que pode ser evidenciado pela diferença entre os valores de imunofluorescência média entre células marcadas e não-marcadas (Tabela 3). Além disso, os resultados observados nesses experimentos corroboram aqueles observados por Lostumbo e colaboradores (2006), cujos resultados mostraram um perfil de expressão similar para todas as linhagens analisadas, inclusive a linhagem MDA-MB-231.



**Figura 10.** Comparação entre células MDA-MB-231 marcadas com anticorpos anti-EGFR e células MDA-MB-231 não-marcadas



Painel A: “Dot Plot” evidenciando a complexidade estrutural (eixo y) e a intensidade de fluorescência (eixo x) das populações celulares. Painel B: histograma com os dados de densidade populacional (eixo y) versus intensidade de fluorescência (eixo x). **Fonte:** O Autor.

Tabela 3 – Comparação dos valores de intensidade de fluorescência média (IFM) de células marcadas e não-marcadas

Marcadores	Células Marcadas	Células Não-Marcadas
<b>Anti-RE<math>\alpha</math></b>	10.710,53 UA	840,73 UA
<b>Anti-RP</b>	2.729,50 UA	307,33 UA
<b>Anti-HER2</b>	7.091,59 UA	1302,59 UA
<b>Anti-EGFR</b>	283,97 UA	83,74 UA

UA: Unidades Arbitrárias

Com a confirmação de que os anticorpos selecionados podiam identificar o fenótipo das células neoplásicas e que as separavam do controle negativo, além da definição dos volumes adequados de cada um dos anticorpos, procedeu-se à análise das amostras oriundas das cirurgias de mama.

## 5.2. Perfil dos Pacientes Participantes do Estudo

Conforme citado anteriormente, ao final do trabalho 70 pacientes aceitaram participar do estudo, dos quais 18 foram excluídos por se enquadrarem em algum dos critérios de exclusão utilizados no desenho experimental. Dos pacientes analisados 51 eram do sexo feminino e 1 do sexo masculino, no entanto, em virtude de problemas técnicos ou metodológicos (falta de reagentes ou impossibilidade de comparação com a metodologia de referência), alguns marcadores não puderam ser avaliados em uma pequena parte das amostras. A mediana de idade dos pacientes foi de 55 anos. A Tabela 4 abaixo detalha o perfil dos pacientes participantes do estudo.

Tabela 4 – Perfil dos pacientes participantes do estudo

	Luminal A	Luminal B HER2-	Luminal B HER2+	HER2+	Triplo Negativo
<b>Total de Casos</b>	12 (23,1%)	20 (38,5%)	8 (15,4%)	1 (2%)	11 (21%)
<b>Mediana Idade (Anos)</b>	59	56	46	79	59
<b>Grau Histológico 1</b>	7	1	0	1	2
<b>Grau Histológico 2</b>	4	11	5	0	2
<b>Grau Histológico 3</b>	0	8	3	0	7
<b>Tumor &lt;2 cm</b>	5	7	2	1	1
<b>Tumor &gt;2 cm e &lt;5 cm</b>	4	9	5	0	8
<b>Tumor &gt;5 cm</b>	3	4	1	0	2

## 5.3. Comparação entre Imuno-histoquímica e Citometria de Fluxo na Análise da Expressão de Receptores Celulares

Para a implantação de uma nova metodologia analítica é necessário que esta seja comparada com a metodologia de referência e seu

desempenho seja avaliado quanto a indicadores de qualidade, como a sensibilidade e a especificidade (NCCLS, 2002).

Os principais desafios para estabelecer a comparação mais adequada entre as duas metodologias, citometria de fluxo e imuno-histoquímica (padrão ouro) consistiram, primeiramente, na caracterização do perfil das amostras de mama quando analisadas por meio da citometria de fluxo; pois diferentemente de uma amostra de sangue periférico, cujo perfil é amplamente conhecido, não há trabalhos anteriores analisando o fenótipo das células de mama por essa metodologia. Depois, discriminar as células tumorais das células mamárias saudáveis que também expressam receptores hormonais, o que pode levar a uma interpretação errônea acerca do subtipo tumoral da amostra em questão. Além do mais, o protocolo de desagregação celular utilizado faz uso apenas de processos mecânicos para a obtenção da suspensão celular e foi selecionado para evitar potenciais alterações no padrão de expressão das células, já que existem evidências de que os processos de desagregação enzimáticos podem acarretar em mudanças no imunofenótipo das células (AUTENGRUBER et al., 2012).

Visando minimizar esse tipo de interferência com relação ao padrão de expressão tumoral e para garantir que todas as amostras se tratavam de espécimes estritamente tumorais, foram confeccionadas lâminas de microscopia para avaliação morfológica de cada uma das amostras analisadas (Figura 11). A confirmação da presença das células tumorais, bem como de seu tamanho ante aos linfócitos infiltrados – para auxiliar na análise por citometria de fluxo – foi realizada por patologistas da UAP do HU-UFSC/EBSERH.

A presença dos linfócitos infiltrados também foi útil como base de comparação para a determinação do perfil de expressão das células tumorais. Primeiramente, devido ao fato dos infiltrados linfocitários serem bastante comuns em tumores de mama e possuem um perfil amplamente conhecido na citometria de fluxo (RUFFELL et al., 2011; DUSHYANTHEN et al., 2015); associado ao fato de que as células de câncer de mama não expressarem CD45 (HU et al., 2010), faz com que seja fácil detectar e distinguir as duas populações celulares. Ademais, linfócitos infiltrados não expressam os RP

nem os RE $\alpha$  (SHIM et al., 2006), funcionando assim como uma espécie de “controle negativo” na análise desses receptores.

Outra questão relevante é o discernimento entre o que seria um padrão de expressão fisiológico e um padrão patológico para o receptor HER2, pois a doença é caracterizada por superexpressão desse receptor e não apenas por sua presença (WOLFF et al., 2013). Essa distinção entre a expressão fisiológica e patológica só foi possível após a análise de um número suficiente de amostras e a comparação entre os resultados obtidos por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica. A análise do receptor HER2 não pôde ser realizada usando os linfócitos como base de comparação, pois esse tipo celular não apresenta expressão desse receptor, impossibilitando a diferenciação entre células tumorais com expressão fisiológica e patológica de HER2, já que em qualquer um dos casos as células tumorais seriam consideradas positivas se comparadas aos linfócitos.

**Figura 11.** Verificação da presença das células tumorais nas amostras

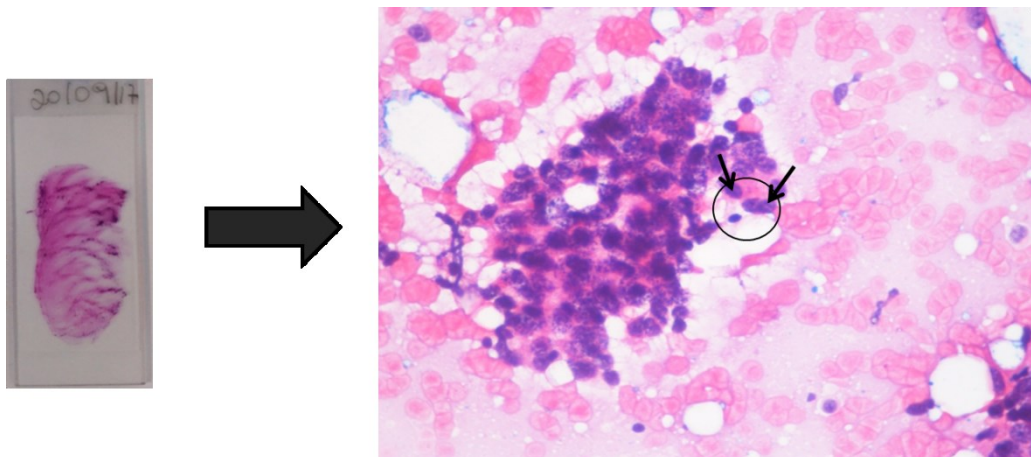


Imagem ilustrativa do controle da coleta de uma amostra. Em destaque o tamanho do linfócito (menor e na parte inferior do círculo) ante as células tumorais (setas) logo acima. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Ampliação 200x. **Fonte:** O Autor.

Como a análise dos receptores EGFR não é realizada como padrão na imuno-histoquímica e nenhuma das amostras testadas apresentou positividade para este receptor, a comparação entre as duas metodologias foi restrita aos RE, RP e HER2.

### 5.3.1. Análise da Expressão de Receptores de Estrógeno

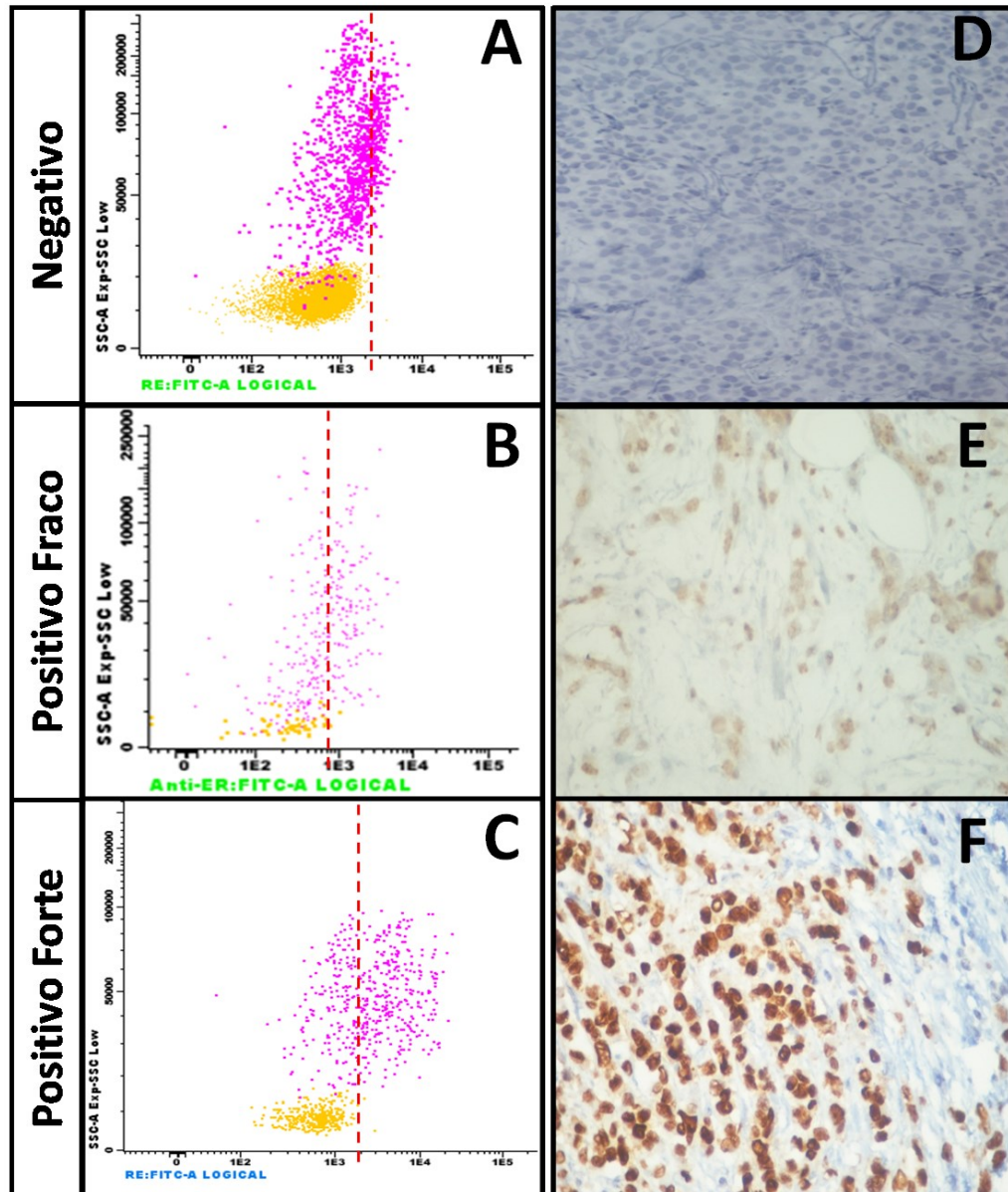
A determinação do perfil de expressão tumoral é de fundamental importância para a adequação do tratamento contra o câncer de mama, pois o desenvolvimento do tumor está relacionado ao tipo de receptor expresso por ele. Medicamentos que inibem a produção de estrógeno, como o Anastrozol, ou que bloqueiam seus receptores, como o Tamoxifeno, são as principais alternativas terapêuticas para tumores que expressam receptores hormonais (UNTCH; THOMSEN, 2010). Considerando que 80% dos tumores de mama apresentam expressão de RE $\alpha$  (KOHLENER et al., 2015), é essencial que a imunofenotipagem por citometria de fluxo, como uma metodologia proposta para auxiliar no diagnóstico desse tipo de neoplasia, detecte de forma confiável a presença desses receptores.

Para tanto, os fenótipos das células neoplásicas avaliados por citometria de fluxo foram comparados com aqueles da imuno-histoquímica (padrão-ouro). Como pode ser observado na Figura 12, o aumento na intensidade de expressão de RE $\alpha$  desloca a população de células tumorais (em rosa) sobre o eixo x no "Dot Plot" (Painéis A-C), a qual é proporcional à intensidade de coloração nas lâminas de imuno-histoquímica (Painéis D-F), o que indica os graus de positividade ou negatividade da amostra.

Embora seja possível reconhecer quando uma amostra possui grau de expressão mais intenso do que outra e haja um sistema de escores na imuno-histoquímica capaz de classificar a expressão dos receptores em negativa, baixa, intermediária e alta (ALLRED et al., 1998); optou-se por classificar as amostras apenas como positivas ou negativas para determinado marcador. A escolha se deu levando-se em consideração o fato de que o tratamento só é alterado em caso de ausência de expressão dos receptores hormonais (HAMMOND et al., 2010) e de que a subdivisão em mais grupos comprometeria o poder estatístico dos testes utilizados, bem como dificultaria a interpretação dos resultados obtidos.

Por fim, esses dados foram analisados pelos diagramas de contenção, pelos quais foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).

**Figura 12.** Comparação dos perfis de expressão de receptores de estrógeno por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica em amostras de câncer de mama



Painéis A, B e C mostram, respectivamente, os “dot-plots” de amostras cuja expressão de RE é ausente, fraca ou forte. Nota-se que conforme a expressão de RE aumenta, a população de células tumorais (rosa) desloca-se à direita, ultrapassando a linha de corte posicionada junto aos últimos linfócitos (amarelo). Os Painéis D, E e F contêm imagens representativas dos resultados da Imuno-histoquímica das amostras destacadas nos Painéis A, B e C, respectivamente. Coloração de Hematoxilina seguida de DAB (diaminobenzidina)-peroxidase. Ampliação 200x. **Fonte:** O Autor.

A positividade para o RE $\alpha$  por citometria de fluxo foi determinada pelo deslocamento da população de células tumorais, em rosa, intensidade de fluorescência acima dos linfócitos, em amarelo, quando avaliadas as intensidades de fluorescência das populações no eixo “X.” Do mesmo modo, quando as populações apresentaram intensidade de fluorescência semelhante, a amostra foi considerada negativa para expressão de RE. Esses resultados foram comparados com os resultados da análise imuno-histoquímica e dispostos no quadro abaixo.

**Quadro 1.** Diagrama de Contenção para Cálculo de Sensibilidade e Especificidade – Receptores de Estrógeno.

	<b>Positivos (+)</b> <b>IHQ</b>	<b>Negativos (-)</b> <b>IHQ</b>
<b>Positivos (+)</b> <b>Citometria</b>	30	1
<b>Negativos (-)</b> <b>Citometria</b>	10	9

Como pode ser observado no Quadro 1, a imunofenotipagem por citometria de fluxo quando comparada a imuno-histoquímica (padrão-ouro), de 50 amostras analisadas, 30 foram considerados resultados “verdadeiro positivo”, uma “falso-positivo”, dez “falso negativo” e nove “verdadeiro negativo”. O que resultou em uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 90%. Os VPP, VPN foram de 96,7% e 47,3%, respectivamente. A concordância entre os testes foi considerada “moderada”, com valor de *kappa* de 0,486.

A maior vantagem da citometria de fluxo quando comparada com a imuno-histoquímica é a agilidade na obtenção dos resultados, o que pode

trazer grandes benefícios aos pacientes, especialmente aqueles com subtipos mais agressivos de câncer de mama (GAGLIATO et al., 2014). No entanto, a imunofenotipagem por citometria de fluxo ainda tem que superar algumas limitações, além da impossibilidade de observação da morfologia das células tumorais, que é útil para avaliação da estrutura do tecido e classificação do tumor.

A proporção relativamente alta de resultados falso-negativos, que pode ser observada tanto no diagrama de contenção quanto pelo VPN, pode ser justificada por uma dificuldade na identificação de amostras com um baixo escore de proporção e um alto escore de intensidade de expressão de acordo com a classificação de Allred (ALLRED et al., 1998). Essa classificação estabelece um escore de 0 a 8 para avaliar a expressão de receptores hormonais em tumores de mama, desses, três pontos são atribuídos à intensidade de expressão (fraca, moderada ou forte) e os outros cinco à proporção de células positivas para RE $\alpha$  ou RP. Como a comparação entre os linfócitos e as células tumorais foi realizada baseando-se nas posições relativas entre as populações celulares identificadas, quando somente uma pequena parte da população de células tumorais apresentou alta intensidade de expressão de RE, muitas vezes essa pequena parte da população não foi detectada e acabou sendo negligenciada nas análises. Outro fator que pode explicar parcialmente a sensibilidade e o VPN encontrado é a expressão de diferentes isoformas do RE $\alpha$ , visto que esse receptor tem uma isoforma de 46 kDa e outra de 66 kDa (PIERDOMINICI et al., 2010).

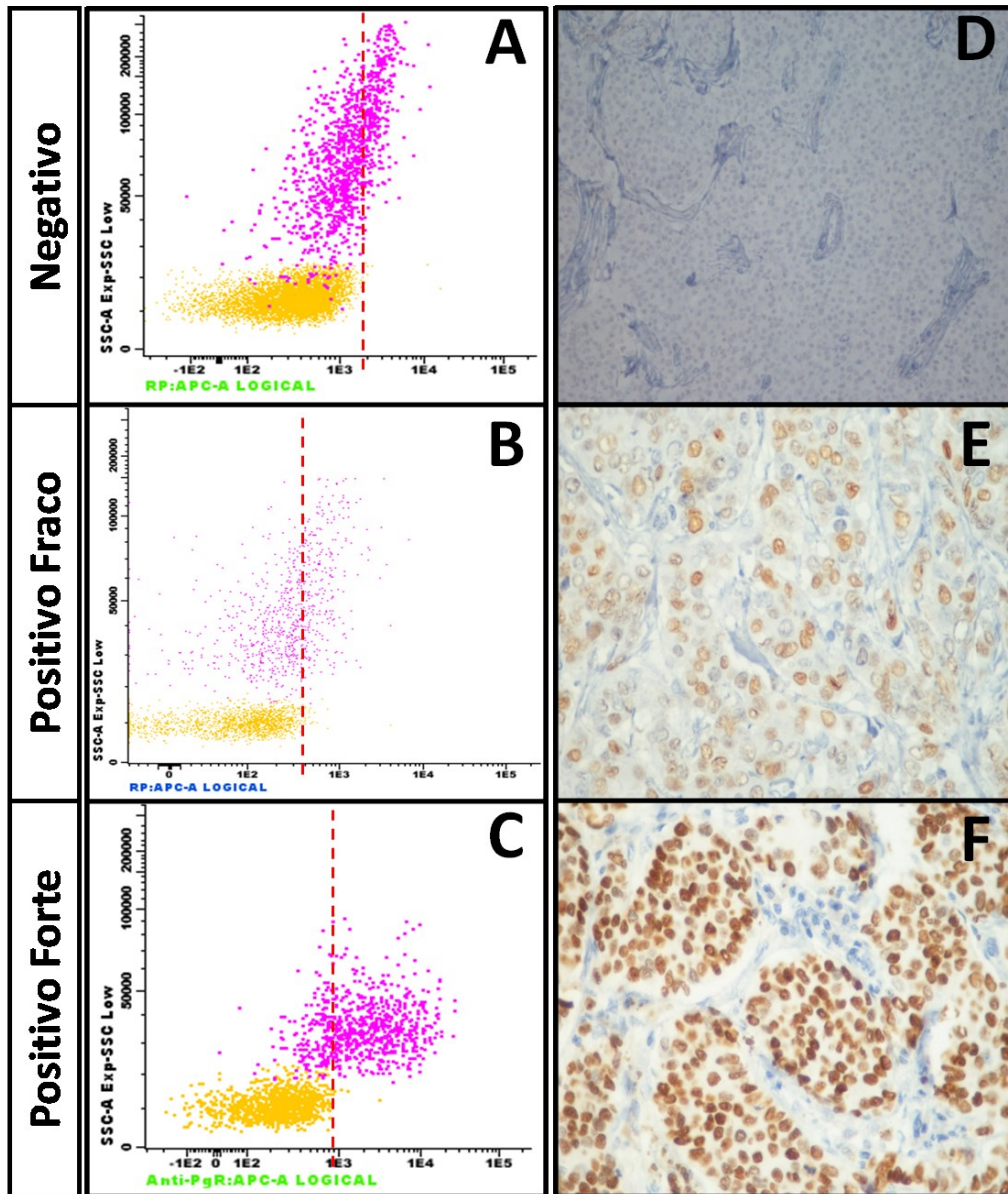


### 5.3.2. Análise da Expressão dos Receptores de Progesterona

Embora os tratamentos antitumorais dirigidos aos receptores de progesterona ainda estejam passando por ensaios clínicos (LIM; PALMIERI; TILLEY, 2016), e não haja nenhum medicamento aprovado para esse fim, a determinação da expressão desses receptores no tecido tumoral se faz importante por auxiliar na correta classificação do subtipo molecular do câncer de mama, que é importante para a decisão terapêutica (PRAT; PEROU, 2010).

Sendo assim, a análise do perfil de expressão desse receptor foi realizada da mesma forma que a análise dos RE, inclusive utilizando a mesma forma de comparação: simplificando o sistema de escore de Allred – que classifica a intensidade de expressão em negativa, positiva fraca, positiva intermediária e positiva forte – e classificando as amostras em positivas e negativas. Como mostra a Figura 13, as alterações na intensidade de expressão do RP (Painéis D-F) deslocam a população de células tumorais (Painéis A-C) o que permite a discriminação entre amostras positivas e negativas para este receptor. Esses resultados também foram analisados pelo diagrama para determinar a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da análise dos RP por citometria de fluxo.

**Figura 13.** Comparação dos perfis de expressão de receptores de progesterona por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica em amostras de câncer de mama



Os Painéis A, B e C mostram, respectivamente, os “dot-plots” de amostras cuja expressão de RP é ausente, fraca ou forte. Observa-se que conforme a expressão de RP aumenta, a população de células tumorais (rosa) desloca-se à direita, ultrapassando a linha de corte posicionada junto aos últimos linfócitos (amarelo). Os Painéis D, E e F contém imagens representativas dos resultados da imuno-histoquímica das amostras destacadas nos Painéis A, B e C, respectivamente. Coloração de Hematoxilina seguida de DAB-peroxidase. Ampliação 200x. **Fonte:** O Autor.

Como ocorrido com os RE, o aumento da expressão de RP também desloca a população de células tumorais (rosa) intensidade de fluorescência acima dos linfócitos (amarelo) indicando positividade para este receptor. Esses resultados também foram comparados com os obtidos na análise imuno-histoquímica.

**Quadro 2.** Diagrama de Contenção para Cálculo de Sensibilidade e Especificidade – Receptores de Progesterona.

	<b>Positivos (+)</b> <b>IHQ</b>	<b>Negativos (-)</b> <b>IHQ</b>
<b>Positivos (+)</b> <b>Citometria</b>	23	6
<b>Negativos (-)</b> <b>Citometria</b>	9	14

Como mostra o Quadro 2, a imunofenotipagem por citometria de fluxo de 52 amostras analisadas, 23 resultados foram considerados “verdadeiro positivo”, nove “falso negativo”, seis “falso positivo” e 14 “verdadeiro negativo”, o que resultou em uma sensibilidade de 71,9% e uma especificidade de 70%. Os VPP e VPN foram de, respectivamente, 79,3 e 60,9%. A concordância entre as metodologias na avaliação dos RP foi considerada “moderada” com *kappa* de 0,407.

Da mesma forma que a análise dos RE, a avaliação do padrão de expressão dos RP também acabou com uma proporção relativamente alta de resultados falso-negativos. Tendo em vista que a metodologia de análise de ambos os receptores foi a mesma tanto na imuno-histoquímica quanto na citometria de fluxo, a justificativa mais provável para os resultados obtidos foi

a dificuldade em detectar as células tumorais positivas para esse receptor quando estas eram a minoria das células que compunham aquela população.

Mesmo assim, os resultados obtidos com a análise dos RE e RP por citometria de fluxo obtiveram uma concordância moderada com os resultados da análise imuno-histoquímica das amostras com um ganho de agilidade considerável pela utilização da citometria de fluxo. Uma possibilidade para contornar a questão da identificação das amostras onde apenas uma pequena parte da população tem uma expressão intensa de algum dos receptores hormonais, é aumentar o número de amostras analisadas e estratificá-las de acordo com citometria de fluxo entre positivo forte, moderado e fraco, aproximando-se do modelo da classificação de Allred.

### **5.3.3. Análise da Expressão dos Receptores HER2**

O HER2 é um receptor do tipo tirosina-cinase pertencente à família dos receptores de fatores de crescimento epidérmicos para o qual não se conhece um ligante endógeno específico. Para exercer seu efeito sobre as cascatas de sinalização que resultam no aumento da proliferação celular, ele tende a se dimerizar com outros membros de sua família de receptores (AHMED; SAMI; XIANG, 2015).

É relevante salientar que os efeitos desse receptor sobre a replicação celular advêm da sua superexpressão, ou seja, apresentar expressão desse receptor até certo grau, não configura um aumento de risco aos pacientes (IGNATIADIS et al., 2009)

Aproximadamente 20% de todos os tumores de mama apresentam superexpressão do receptor HER2, e, embora esteja associado a um pior prognóstico, existem medicamentos capazes de bloquear a sua ativação, como o Trastuzumab (AHMED; SAMI; XIANG, 2015).

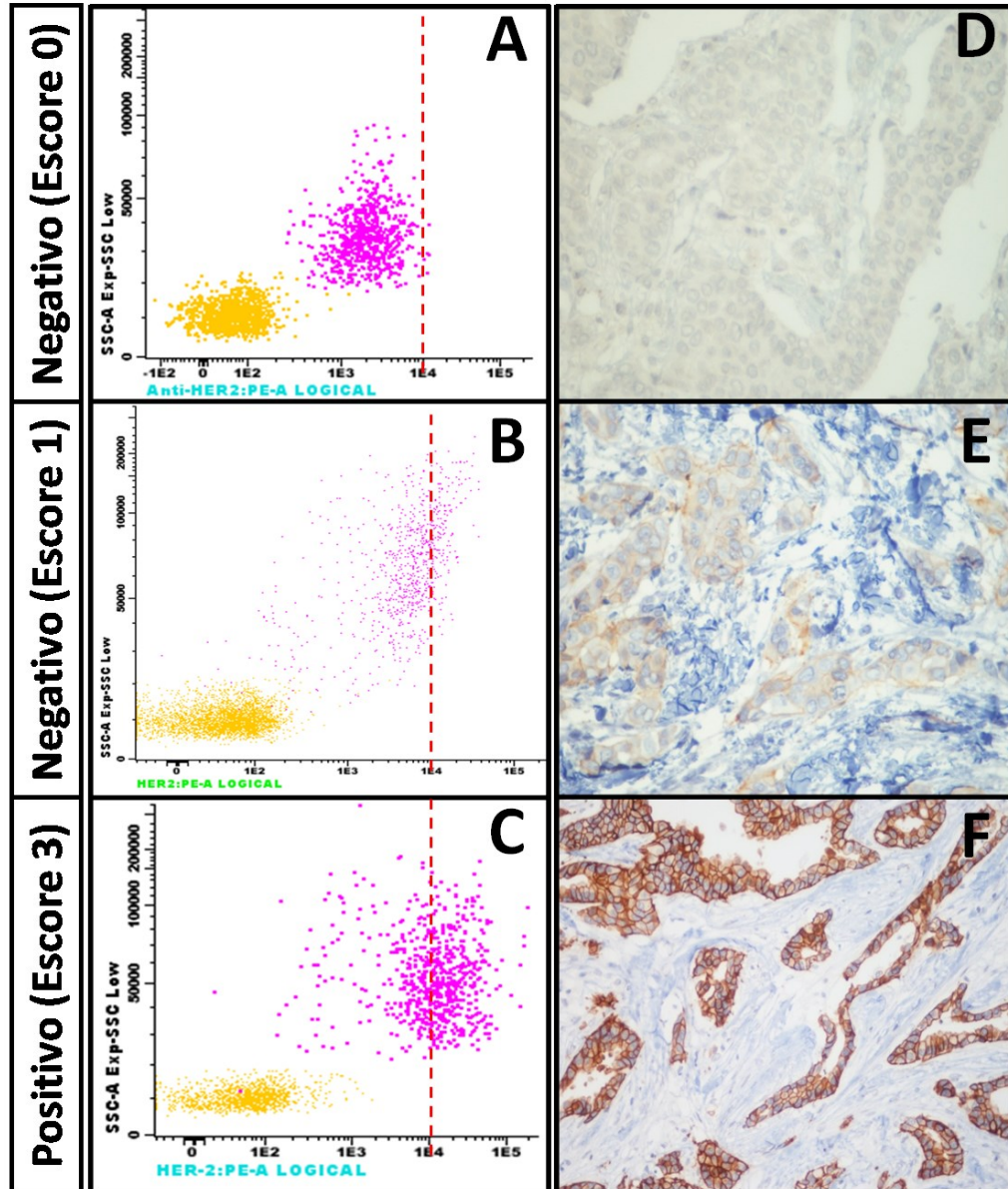
Nesse sentido, ao considerarmos os riscos associados à manifestação de um subtipo tumoral mais agressivo devido à superexpressão dos receptores HER2 e ao fato de que esses receptores também são alvos

farmacológicos, é essencial que a detecção desse receptor seja realizada da forma mais rápida e segura possível.

O sistema de classificação dos resultados para HER2 por imunohistoquímica difere daqueles utilizados na avaliação dos receptores hormonais (LI et al., 2018). Para o HER2 as amostras são classificadas de acordo com escores que variam de 0 a três cruces. Assim, os resultados entre 0 a uma cruz são considerados negativos; duas cruces, indeterminado e três cruces, positivo. A amostra recebe um escore de três cruces quando mais de 10% das células tumorais mostram reatividade circular, completa e intensa para esse receptor. Resultados considerados indeterminados devem ser confirmados por técnicas moleculares ou de hibridização *in situ* e ocorrem quando há reatividade fraca ou moderada em mais de 10% das células analisadas ou forte em menos de 10% das células (WOLFF et al., 2013). Para a análise por citometria de fluxo das amostras cujo resultado foi considerado indeterminado pela imunohistoquímica, a comparação foi feita utilizando os ensaios moleculares como metodologia de referência.

A metodologia de comparação utilizada foi similar àquelas realizadas para os outros receptores, a única diferença foi o reposicionamento do ponto de corte para diferenciar amostras com expressão normal das com superexpressão do receptor HER2.

Figura 14. Comparação dos perfis de expressão de receptores HER2 por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica em amostras de câncer de mama



Painéis A, B e C mostram, respectivamente, os “*dot-plot*” de uma amostra onde não há expressão de HER2, “*dot-plot*” de amostra com expressão normal de HER2 e “*dot-plot*” de amostra com superexpressão desse receptor. Nota-se que conforme a expressão de HER2 aumenta, a população de células tumorais (rosa) desloca-se à direita, ultrapassando a linha de corte estabelecida. Os Painéis D, E e F contém imagens representativas dos resultados da imuno-histoquímica das amostras destacadas nos Painéis A, B e C, respectivamente. Coloração de Hematoxilina seguida de DAB-peroxidase. Ampliação 200x. **Fonte:** O Autor.

Da mesma forma que ocorreu com outros marcadores, o aumento da expressão do receptor analisado causou um deslocamento da população de células tumorais (rosa), entretanto, como certos níveis de expressão são considerados fisiológicos, a comparação com os linfócitos (amarelo) é limitada. Sendo assim, foram necessárias comparações entre as próprias populações tumorais dos pacientes para determinar o ponto de corte entre a intensidade de fluorescência negativa e positiva, localizado aproximadamente em 1E4 no eixo x do “*Dot Plot*”.

**Quadro 3.** Diagrama para Cálculo de Sensibilidade e Especificidade – Receptores HER2.

	<b>Positivos (+) IHQ</b>	<b>Negativos (-) IHQ</b>
<b>Positivos (+) Citometria</b>	8	4
<b>Negativos (-) Citometria</b>	2	37

Após a análise e comparação das 51 amostras coletadas, a análise imunofenotípica por citometria de fluxo mostrou oito resultados considerados “verdadeiro positivo”, quatro “falso positivo”, dois “falso negativo” e 37 “verdadeiro negativo”, o que resultou numa sensibilidade de 80% e especificidade de 90,2%. Os VPP e VPN foram de, respectivamente, 66,7% e 94,9%. O grau de concordância avaliado pelo teste *kappa* foi de 0,653; considerado “bom”.

Dentre os três receptores estudados no diagnóstico molecular de câncer de mama, RE; RP e HER2, o último foi o que teve o melhor resultado numa análise geral, sendo que após a determinação do ponto de corte, ficou claro o

perfil de expressão das populações de células tumorais no *Dot Plot*. O que pode ser atestado pelo maior grau de concordância entre as metodologias quando avaliadas pelo teste *kappa* de Cohen. No entanto, a análise da expressão dos receptores HER2 por citometria de fluxo teve o pior VPP quando comparado aos demais receptores. Mesmo assim, o baixo VPP não pode ser simplesmente entendido como um indicador de um desempenho inferior da citometria de fluxo ante a imuno-histoquímica, visto que das quatro amostras falsamente consideradas positivas, três delas foram consideradas “indeterminadas” pela imuno-histoquímica e precisaram ser confirmadas como “negativas” por ensaios moleculares. Portanto a dificuldade em classificar essas amostras como positivas ou não, ocorreu tanto na análise imuno-histoquímica quanto na citometria de fluxo e representou uma limitação para ambas as metodologias. Com a diferença de que os resultados da citometria de fluxo foram obtidos de maneira mais ágil se comparados aos da imuno-histoquímica, o que por si só mostra uma vantagem no uso da imunofenotipagem por citometria de fluxo como metodologia complementar a imuno-histoquímica.

#### **5.4. Comparação entre Imuno-histoquímica e Citometria de Fluxo na Análise da Expressão do Marcador de Proliferação Celular Ki67**

A Ki67 é uma proteína nuclear expressa tanto na interfase quanto no momento da mitose, e, é encontrada somente em células em estado proliferativo, por isso, é considerada como um marcador de proliferação celular (YANG et al., 2018). Assim, a utilização desse marcador na análise de neoplasias de mama está mais relacionada a avaliação do prognóstico do paciente do que propriamente ao diagnóstico molecular do tumor em questão. Seu papel na parte diagnóstica é auxiliar na diferenciação entre tumores dos tipos “Luminal A” e “Luminal B” (PRAT; PEROU, 2010).

A porcentagem de positividade para o Ki67 também é bastante relevante na conduta clínica utilizada, visto que valores elevados desse marcador

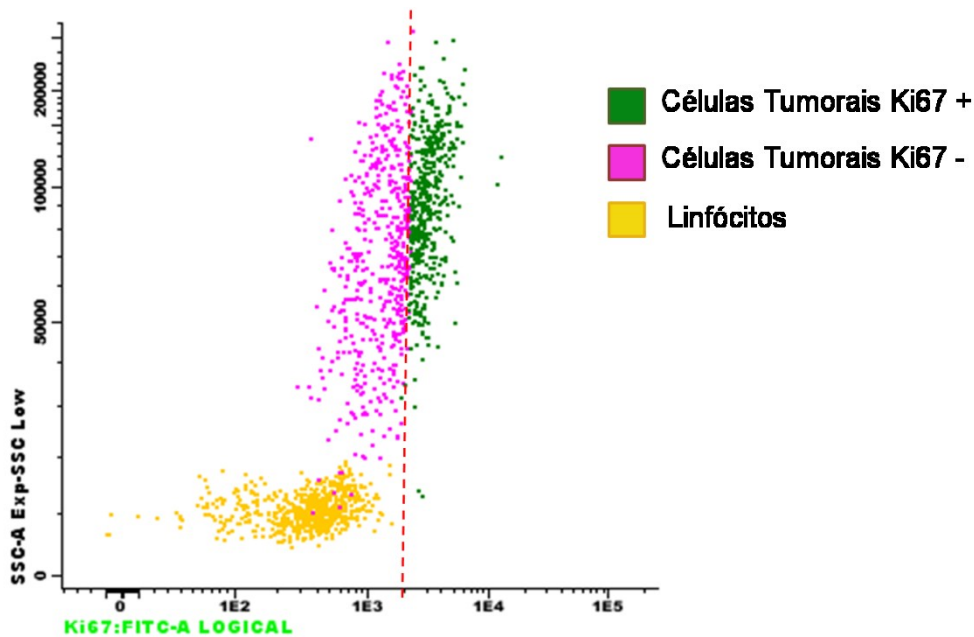


indicam maior agressividade tumoral, e, portanto, necessidade da utilização de tratamento quimioterápico diferenciado (FOCKE, et al., 2017).

Para efetuar uma comparação adequada entre a intensidade de expressão da proteína Ki67 por imuno-histoquímica (determinada por porcentagem de células reagentes na lâmina) e por citometria de fluxo, foi necessário desenvolver uma forma de avaliar percentualmente as células analisadas por esta última metodologia.

Para tal, os linfócitos foram novamente utilizados como base de comparação. Como os linfócitos são células maduras, seu grau de expressão de Ki67 é irrelevante, e, assim foi considerado igual à zero. Posteriormente, a intensidade de expressão do Ki67 nas populações de células tumorais e nos linfócitos foi comparada. Assim, foi determinado que nas amostras em que as células tumorais tivessem intensidade de fluorescência para Ki67 superior àquela observada nos linfócitos, eram consideradas positivas. Por fim, a porcentagem dessas células positivas foi calculada para a população de interesse com auxílio do *software* Infinicity (Cytognos, Salamanca, Espanha), como demonstrado na Figura 15.

**Figura 15.** Determinação da Expressão do Marcador de Proliferação Ki67 em Células de Tumores de Mama por Citometria de Fluxo



“Dot Plot” representativo da análise da expressão de Ki67 em células tumorais (verde e rosa). O eixo y indica a complexidade celular e o eixo x indica a intensidade de fluorescência para o Ki67. As células tumorais cuja intensidade de fluorescência para esse marcador foi mais elevada que a da população linfocitária (amarelo), foram consideradas positivas (verde) para esse marcador. **Fonte:** O Autor.

Como a porcentagem de reatividade de Ki67 nas amostras se trata de uma variável contínua, a comparação entre as duas metodologias foi realizada por meio da análise de Bland-Altman. O objetivo dessa análise foi construir um gráfico de dispersão para verificar se as medidas observadas eram comparáveis entre si e o viés entre as metodologias utilizadas.

Para a construção desse gráfico primeiramente foi efetuado um teste t de uma amostra, com o objetivo de verificar se a média do viés entre as metodologias testadas era estatisticamente igual à zero (concordância perfeita). Posteriormente, o viés para cada amostra foi plotado num gráfico de dispersão para verificar se os resultados estão dentro do intervalo de confiança estabelecido. A Figura 16 mostra o viés encontrado entre a imunohistoquímica e a citometria de fluxo na análise de cada uma das 44 amostras testadas para Ki67. Dessas, apenas três amostras apresentaram viés entre as metodologias superior ao intervalo de confiança estabelecido. O viés médio

encontrado foi de aproximadamente 2,1%, com  $p = 0,62$ , sem diferença estatisticamente significativa para o viés médio perfeito (0%), o que mostra, portanto, que os resultados observados para o marcador de proliferação celular Ki67 são equivalentes, independentemente da metodologia utilizada.

**Figura 16.** Gráfico de Dispersão de Bland-Altman

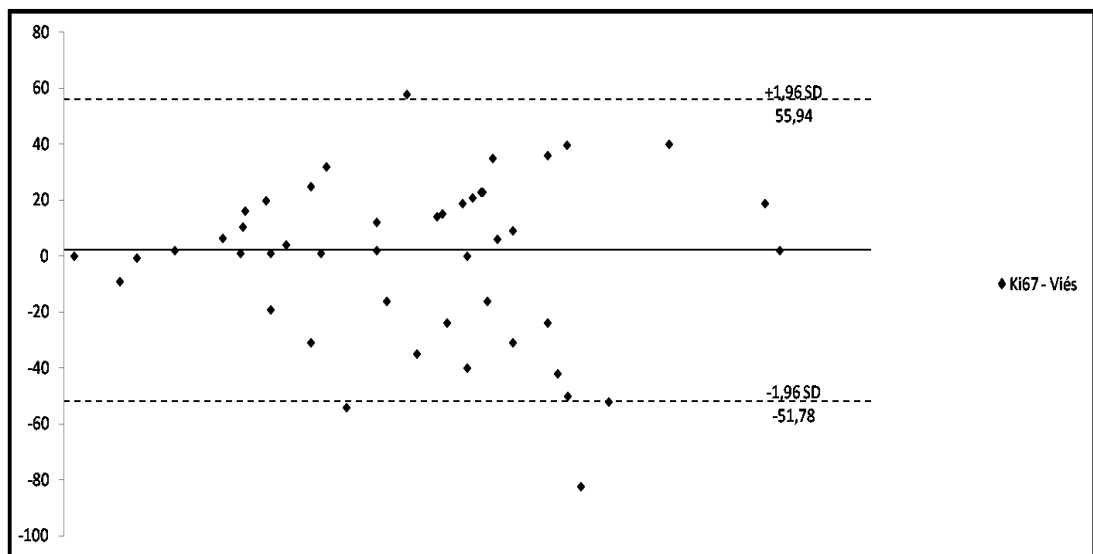


Gráfico de dispersão do viés encontrado entre a citometria de fluxo e a imunohistoquímica para cada análise da expressão de Ki67. O eixo y é a escala dos valores de viés, compreendendo valores negativos e positivos; a reta contínua é o viés médio e as linhas tracejadas, os limites inferior e superior, considerando-se um intervalo de confiança de 95%. Nota-se que apenas três das 44 amostras analisadas apresentaram um viés fora do intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** O Autor.

A reprodutibilidade inter laboratorial da análise da expressão do Ki67 tem sido alvo de uma série de estudos visando o seu aprimoramento (POLLEY et al., 2015; GUDLAUGSSON et al., 2012; MENGEL et al., 2002), inclusive com a utilização de *softwares* de imagem com a capacidade de efetuar tal quantificação (STÅLHAMMAR et al., 2016). Em estudo recente Focke e colaboradores (2017), avaliaram a reprodutibilidade da análise de expressão de Ki67 de 70 amostras de tecido tumoral em 30 laboratórios de patologia europeus. Em 49 dessas amostras, os resultados de Ki67 chegaram

a divergir em mais de 25% entre os laboratórios. Os autores atribuem essa divergência à utilização de diferentes tipos de anticorpos e ao viés observacional entre os laboratórios.

O maior problema da divergência na avaliação da expressão de Ki67 em tecidos tumorais é que o seu grau de expressão é fundamental para o conhecimento do prognóstico do paciente (PETRELLI et al., 2015). Uma expressão elevada de Ki67 nas células tumorais favorece o surgimento de recidivas da doença e reduz a sobrevida dos pacientes (BURCOMBE et al., 2004). Além disso, discrepâncias dessa magnitude entre os resultados para esse marcador podem significar a diferença entre um tumor do tipo luminal A (menos agressivo) para um luminal B (mais agressivo), visto que o *cut-off* de Ki-67 que diferencia os dois subtipos vai de 14 a 25% de expressão, dependendo da referência utilizada (PETRELLI et al., 2015; FOCKE et al., 2017). Portanto, interpretações errôneas desse marcador impactam diretamente na conduta do tratamento e podem acarretar em prejuízo para a evolução dos pacientes, que podem ter sua neoplasia subestimada ou prejuízos aos sistemas de saúde, com gastos desnecessários nos casos onde a expressão de Ki67 é superestimada (GUDLAUGSSON et al., 2012).

Sendo o viés observacional um dos maiores obstáculos à qualidade da determinação da expressão de Ki67, a imunofenotipagem por citometria de fluxo apresenta-se como uma forma de contornar essa característica da análise imuno-histoquímica, já que não possui viés observacional devido ao fato da análise ser realizada com o auxílio de um *software*. Além disso, a análise é realizada em um número maior de células, o que permite uma avaliação mais ampla do padrão de expressão da população de células tumorais. Considerando os resultados obtidos, é possível afirmar que a citometria de fluxo fornece resultados equivalentes aos da imuno-histoquímica para a expressão desse marcador, com a vantagem de estar isenta do viés observacional. Ademais, a metodologia utilizada para a avaliação da expressão de Ki67 no presente trabalho pode, potencialmente, ser aplicada em outros tipos de neoplasias já que a análise do Ki67 não se restringe aos tumores de mama (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

### **5.5. Análise do Perfil da População de Linfócitos Intratumorais e sua Relação com o Subtipo Tumoral e o Grau Histológico do Tumor**

Os linfócitos presentes no microambiente tumoral são importantes na resposta ao desenvolvimento da neoplasia, seja por formarem uma primeira linha de defesa composta por linfócitos T *helper* 1 e linfócitos T CD8 citotóxicos, cuja função consiste em eliminar as células tumorais; quanto na fase de escape, onde o tumor deixa de ser reconhecido pelo sistema imune do organismo devido ao recrutamento de linfócitos T *helper* 2, regulatórios, pelas células neoplásicas (DUNN et al., 2002). Entretanto, esses infiltrados de linfócitos intratumorais também possuem papel ativo na resposta aos tratamentos e podem prever a eficácia da resposta patológica tecidual (KUROZUMI et al., 2017; SEO et al., 2013). Além disso, os infiltrados de linfócitos intratumorais também vêm sendo estudados como fatores de prognóstico para os tumores de mama (DUSHYANTHEN et al., 2015).

De maneira geral, tanto o melhor prognóstico quanto as melhores respostas ao tratamento são atingidas quando há uma prevalência de linfócitos T CD8+ sobre os linfócitos T CD4+, especialmente quando esses últimos também expressam a proteína FOXP3, os quais são caracterizados como linfócitos T regulatórios, e tendem a reduzir a resposta imunológica do indivíduo (ASANO et al., 2016).

Para avaliar se o perfil da população de linfócitos intratumorais guardava relação com subtipos de tumores de mama com maior ou menor agressividade, comparamos a razão entre os percentuais encontrados de linfócitos T CD4+ e T CD8+ com o grau histológico do tumor e seu subtipo molecular. O grau histológico do tumor é uma medida do grau de diferenciação dos tumores cuja escala vai de 1 a 3. Quanto menor o valor encontrado, mais bem diferenciado, e, portanto, menos agressivo é o tumor em questão (A RAKHA et al., 2010).

A opção por utilizar apenas os valores percentuais relativos, e não a quantidade absoluta de linfócitos encontrados foi no intuito de evitar que

diferenças no tamanho entre as amostras tumorais, ou que resíduos de sangue periférico dos pacientes pudessem vir a causar interferência nos resultados encontrados.

Após análise estatística comparando a relação CD4/CD8 com a presença ou não de receptores hormonais e receptores HER2, não foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre a relação CD4/CD8 e a expressão de qualquer desses receptores. O valor de p encontrado na correlação entre a razão CD4/CD8 e a expressão ou não receptores hormonais foi de 0,51 (Quadro 4); enquanto o valor de p encontrado na correlação entre a razão CD4/CD8 versus a expressão ou não de receptores HER2 foi de 0,56 (Quadro 5).

**Quadro 4.** Distribuição das amostras considerando a expressão de receptores hormonais e Razão CD4/CD8

	<b>Razão CD4/CD8 &lt;1</b>	<b>Razão CD4/CD8 &gt;1</b>
<b>Presença de Receptores Hormonais</b>	13	21
<b>Ausência de Receptores Hormonais</b>	5	5

**Quadro 5.** Distribuição das amostras considerando a expressão de receptores HER2 e Razão CD4/CD8

	<b>Razão CD4/CD8 &lt;1</b>	<b>Razão CD4/CD8 &gt;1</b>
<b>Presença de HER2</b>	4	4
<b>Ausência de HER2</b>	14	22

Em relação à correlação entre a razão CD4/CD8 e o grau histológico do tumor, como pode ser observado no Quadro 4, um número maior de amostras com grau histológico 2 e 3 apresentou razões acima de 1, o que caracteriza predomínio de linfócitos T CD4+, contudo, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a razão CD4/CD8 e o grau histológico do tumor ( $p = 0,10$ ).

**Quadro 6.** Distribuição das amostras por Grau Histológico e Razão CD4/CD8.

	<b>Razão CD4/CD8 &lt;1</b>	<b>Razão CD4/CD8 &gt;1</b>
<b>Grau Histológico 1</b>	7	3
<b>Grau Histológico 2</b>	8	13
<b>Grau Histológico 3</b>	6	12

Os resultados obtidos para a correlação entre a razão CD4/CD8 e a presença ou não de receptores hormonais e HER2, estão de acordo com os dados presentes na literatura, que demonstram que o subtipo molecular do tumor não tem correlação com a quantidade e a distribuição de linfócitos infiltrados no microambiente tumoral (DUSHYANTHEN et al., 2015; ASANO et al., 2016). Inclusive, nos subtipos mais agressivos de tumores a presença de infiltrados de linfócitos indica uma melhor resposta ao tratamento quimioterápico. (ASANO et al., 2016; RAVELLI et al., 2017).

Já os resultados encontrados para a correlação entre o grau histológico e a razão CD4/CD8, não condizem com os relatados na literatura, já que estes associam a prevalência de linfócitos T CD8+ ante aos linfócitos T CD4+ a uma maior resposta terapêutica e a um prognóstico melhor (ASANO et al., 2016; SEO et al., 2013), o que não foi observado nos resultados obtidos no presente trabalho. O fato de não ter sido observada uma correlação estatisticamente significativa neste estudo pode ser justificado pela utilização



da contagem relativa de todos os linfócitos T CD4+, desconsiderando o fato de que uma parte desses podem estar diferenciados em linfócitos T *helper* 1, que associados aos linfócitos T CD8+ também indicam um prognóstico mais favorável ao paciente (DUSHYANTHEN et al., 2015). Talvez a utilização de outro marcador que caracterize a presença de linfócitos T regulatórios, como a proteína FOXP3, possa auxiliar na diferenciação entre os subtipos de linfócitos T CD4+ associados a prognósticos menos favoráveis, ou mesmo a adoção de uma razão entre o percentual de células expressando FOXP3 e CD8, como utilizado por Asano e colaboradores (2016). Outra justificativa para a ausência de diferença estatística entre os grupos é o fenômeno de exaustão dos linfócitos T CD8+. Nesse fenômeno há a perda de funcionalidade dessas células, com aumento da expressão de receptores inibitórios e redução na produção de citocinas (EGELSTON et al., 2018; WHERRY; KURACHI, 2015); portanto não se pode descartar a possibilidade de que alguns dos pacientes com tumores de grau histológico 2 e 3 possam ter uma prevalência de linfócitos T CD8+, mas essas células serem disfuncionais. Outro fator que pode ter contribuído para a ausência de uma correlação estatisticamente significativa, é o número de amostras, já que o “N” amostral foi calculado baseando-se na necessidade dos testes qualitativos aplicados aos receptores hormonais e ao HER2.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a análise imunofenotípica dos receptores de hormônios e receptores HER2 por citometria de fluxo é capaz de distinguir os subtipos tumorais, mesmo os “triplo negativo”. Ainda assim, são necessários aperfeiçoamentos na análise da expressão de receptores hormonais em alguns subtipos de tumores.

A avaliação da expressão do marcador Ki67 por citometria de fluxo mostrou-se uma alternativa promissora na caracterização das amostras, especialmente por estar isenta do viés observacional, se comparada a imunohistoquímica.

A análise dos infiltrados de linfócitos intratumorais mostrou-se plenamente factível com o auxílio da citometria de fluxo, embora não tenham sido observadas correlações entre as variáveis estudadas. Sendo assim, é possível afirmar que a citometria de fluxo consegue sobrepor algumas das limitações da análise imuno-histoquímica, e, em conjunto com esta proporcionar resultados fidedignos de maneira mais rápida e eficiente.

Evidentemente há a necessidade de aprimoramento dessa metodologia para a análise de tumores de mama, buscando a determinação de pontos de corte que possibilitem uma comparação mais próxima ao escore de Allred e a avaliação de outros anticorpos contra os receptores hormonais, visando um aumento de sensibilidade e especificidade da metodologia. Outra perspectiva futura é a realização da diferenciação entre os linfócitos T CD4+ que expressam FOXP3 dos que não expressam essa proteína para avaliar se há uma relação mais clara com o prognóstico do paciente.

## 7. REFERÊNCIAS

ACS (American Cancer Society). **The History of Cancer, 2014**. Disponível em <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/cancer-causes-theories-throughout-history.html>. Acesso em 24/01/2019.

AHMED, Shahid; SAMI, Amer; XIANG, Jim. HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer**, v. 22, n. 2, p.101-116, 30 jan. 2015.

ALLRED, D.C., HARVEY, J. M., BERARDO, M. CLARK, G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Modern Pathology**. v. 11, n. 2, p. 155-168, 1998.

APARICIO, T., BAER, R., GAUTIER, J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. **DNA Repair (Amst.)**, n. 19, p. 169-175, 2014.

A RAKHA, Emad et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p.1-12, 30 jul. 2010.

ASANO, Y. et al. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. **British Journal Of Surgery**, v. 103, n. 7, p.845-854, 8 mar. 2016.

AUTENGRUBER, A. et al. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. **European Journal Of Microbiology And Immunology**, v. 2, n. 2, p.112-120, jun. 2012.

BANKS, W. M. A brief history of the operations practised for cancer of the breast. **British Journal of Medicine**, v. 1, n. 2140, p. 5-10, 1902.

BARNARD, N.J., et al. Proliferative Index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. **J Pathol**, v. 4, n. 152, p. 287-95, 1987.

BATISTON, A. P. **Detecção Precoce do câncer de mama: conhecimento e prática de mulheres e profissionais da estratégia de saúde da família em Dourados/MS**. 128 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2009.

BEATSON, G. T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. **Lancet**, n. 2, p. 104-107, 1896.

BETHEA, Traci N et al. A case–control analysis of oral contraceptive use and breast cancer subtypes in the African American Breast Cancer Epidemiology and Risk Consortium. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p.1-13, 21 fev. 2015.

BOUCHARD, J. Radiation therapy in the carcinoma of the breast. **Canadian Medical Association Journal**, v. 5, n. 49, p. 382-387, 1943.

BOURDON, Jean-christophe; SURGET, Sylvanie; KHOURY, Marie P.. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. **Oncotargets And Therapy**, p.57-67, dez. 2013.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p.394-424, 12 set. 2018.

BUISSERET, Laurence et al. Tumor-infiltrating lymphocyte composition, organization and PD-1/ PD-L1 expression are linked in breast cancer. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 1, p.1-13, 14 dez. 2016.

BULLWINKEL, J., et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferative cells. **J Cell Physiol**, v. 3, n. 206, p. 624-635, 2006.

BURCOMBE, R J et al. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. **British Journal Of Cancer**, v. 92, n. 1, p.147-155, 21 dez. 2004.

BURGESS, M., PUHALLA, S. BRCA 1/2-Mutation Related and Sporadic Breast and Ovarian Cancers: More Alike than Different. **Front Oncol**, 2014.

CAREY, Lisa A. et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. **Jama**, v. 295, n. 21, p.2492-2502, 7 jun. 2006.

CARTER, S. M. et al. Screening for Cervical, Prostate and Breast Cancer. Interpreting the Evidence. **Am J Prev Med**, 2015.

CIMINO-MATHEWS, A., FOOTE, J. B., EMENS, L. A. Immune Targeting in Breast Cancer. **Oncology**, v. 29, n. 5, p. 375-385, 2015.

CINTRA, Jane Rocha Duarte et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 2, p.178-187, mar. 2012.

CHANG, Q., HEDLEY, D. Emerging applications of flow cytometry in solid tumor biology. **Methods**, v. 3, n. 57, p. 359-67, 2012.

CHLEBOWSKI, Rowan T. et al. Breast Cancer after Use of Estrogen plus Progestin in Postmenopausal Women. **New England Journal Of Medicine**, v. 360, n. 6, p.573-587, 5 fev. 2009.

COLLINO, Cesar J. G.; JALDIN-FINCATI, Javier R.; CHIABRANDO, Gustavo A.. Statistical criteria to establish optimal antibody dilution in flow cytometry analysis. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 72, n. 3, p.223-226, 2007.

COUSSENS, L et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. **Science**, v. 230, n. 4730, p.1132-1139, 6 dez. 1985.

DUNN, Gavin P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p.991-998, nov. 2002.

DUSHYANTHEN, Sathana et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Bmc Medicine**, v. 13, n. 1, p.1-13, 24 ago. 2015.

EGELSTON, Colt A. et al. Human breast tumor-infiltrating CD8+ T cells retain polyfunctionality despite PD-1 expression. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p.1-11, 16 out. 2018.

EWERS, Sven-börje; BALDETORP, Evalångström; KILLANDER, Dick. Flow-Cytometric DNA analysis in primary breast carcinomas and clinicopathological correlations. **Cytometry**, v. 5, n. 4, p.408-419, jul. 1984.

FERREIRA-FACIO, Cristiane S. et al. Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. **Plos One**, v. 8, n. 3, p.1-10, 5 mar. 2013.

FOCKE, Cornelia M. et al. Interlaboratory variability of Ki67 staining in breast cancer. **European Journal Of Cancer**, v. 84, p.219-227, out. 2017.

FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; VERMA, I. M.. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. **Embo Reports**, v. 15, n. 3, p.244-253, 14 fev. 2014.

GAGLIATO, Debora de Melo et al. Clinical Impact of Delaying Initiation of Adjuvant Chemotherapy in Patients With Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 32, n. 8, p.735-744, 10 mar. 2014.

GARAUD, Soizic et al. A Simple and Rapid Protocol to Non-enzymatically Dissociate Fresh Human Tissues for the Analysis of Infiltrating Lymphocytes. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 94, p.1-9, 6 dez. 2014.

GARCÍA-TEIJIDO, Paula et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 101, p.31-39, jan. 2016.

GARRISON, Louis P. et al. The Lifetime Economic Burden of Inaccurate HER2 Testing: Estimating the Costs of False-Positive and False-Negative HER2 Test

Results in US Patients with Early-Stage Breast Cancer. **Value In Health**, v. 18, n. 4, p.541-546, jun. 2015.

GIORDANO, Livia et al. Mammographic Screening Programmes in Europe: Organization, Coverage and Participation. **Journal Of Medical Screening**, v. 19, n. 1, p.72-82, set. 2012.

GOYAL, R. et al. Histological and immunohistochemical study of estrogen and progesterone receptors in normal human breast tissue in adult age groups vulnerable to malignancy. **Clinical Anatomy**, v. 29, n. 6, p.729-737, 29 abr. 2016.

GUDLAUGSSON, Einar et al. Comparison of the effect of different techniques for measurement of Ki67 proliferation on reproducibility and prognosis prediction accuracy in breast cancer. **Histopathology**, v. 61, n. 6, p.1134-1144, 11 set. 2012.

HAJDU, Steven I.. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, v. 117, n. 5, p.1097-1102, 19 out. 2010a.

HAJDU, Steven I.. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 2. **Cancer**, v. 117, n. 12, p.2811-2820, 29 dez. 2010b.

HAJDU, Steven I.. A note from history: Landmarks in history of cancer, part 3. **Cancer**, v. 118, n. 4, p.1155-1168, 12 jul. 2011.

HAMAJIMA, Nobuyuki et al. Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. **British Journal Of Cancer**, v. 87, n. 11, p.1234-1245, nov. 2002.

HAMMOND, M. Elizabeth H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p.2784-2795, jun. 2010. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

HIATT, Robert A.; BRODY, Julia Green. Environmental Determinants of Breast Cancer. **Annual Review Of Public Health**, v. 39, n. 1, p.1-21, 12 jan. 2018. Annual Reviews.

HOLLIDAY, Deborah L; SPEIRS, Valerie. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p.1-7, ago. 2011.

HORTON, Janet K. et al. Breast Cancer Biology: Clinical Implications for Breast Radiation Therapy. **International Journal Of Radiation Oncology\*biology\*physics**, v. 100, n. 1, p.23-37, jan. 2018.

HU, Yanjie et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer patients utilizing multiparameter flow cytometry and assessment of the prognosis of patients in different CTCs levels. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 3, p.213-219, mar. 2010.

HULLEY, S.B., CUMMINGS, S.R. **Designing clinical research**. Williams & Wilkins Baltimore, 1988.

HUNTER, D. J. et al. Oral Contraceptive Use and Breast Cancer: A Prospective Study of Young Women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 10, p.2496-2502, 27 ago. 2010.

IGNATIADIS, M., DESMEDT, C., SOTIRIOU, C., DE-AZAMBUJA, E., PICCART, M., HER-2 as a Target for Breast Cancer Therapy. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 15, p 1848-52, 2009.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Controle do Câncer de Mama - Tratamento**. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos\\_programas/site/home/nobrasil/programa\\_controle\\_cancer\\_mama/tratamento](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoos_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento). Acesso em 10/02/18. INCA, 2016.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

ISLAMI, Farhad et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p.31-54, 21 nov. 2017.

JENSEN, E. V.; JORDAN, V. C. The estrogen receptor: A model for molecular medicine. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 1980-1989, 2003.



JOHNSON, K. C. et al. Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009). **Tobacco Control**, v. 20, n. 1, p.1-6, 8 dez. 2010.

KARPOZILOS, A.; PAVLIDIS, N.. The treatment of cancer in Greek antiquity. **European Journal Of Cancer**, v. 40, n. 14, p.2033-2040, set. 2004.

KERSHAW, Erin E.; FLIER, Jeffrey S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p.2548-2556, jun. 2004.

KOHLER, Betsy A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 6, p.1-25, 30 mar. 2015.

KOMURO, Hiroaki et al. Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines. **Journal Of Pediatric Surgery**, v. 42, n. 12, p.2040-2045, dez. 2007.

KUROZUMI, Sasagu et al. Significance of evaluating tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) expression in breast cancer. **Medical Molecular Morphology**, v. 50, n. 4, p.185-194, 21 set. 2017.

LI, Xiaoxian et al. Validation of the newly proposed American Joint Committee on Cancer (AJCC) breast cancer prognostic staging group and proposing a new staging system using the National Cancer Database. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 171, n. 2, p.303-313, 15 jun. 2018.

LIGHTOWLERS, S.v. et al. Preoperative breast radiation therapy: Indications and perspectives. **European Journal Of Cancer**, v. 82, p.184-192, set. 2017.

LIM, Elgene; PALMIERI, Carlo; TILLEY, Wayne D. Renewed interest in the progesterone receptor in breast cancer. **British Journal Of Cancer**, v. 115, n. 8, p.909-911, 22 set. 2016.

LOPES, Tiara Cristina Romeiro et al. Delay in Diagnosis and Treatment of Breast Cancer among Women Attending a Reference Service in Brazil. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**, v. 18, n. 11, p.3017-3023, nov. 2017.

LOSTUMBO, A. et al. Flow cytometry: A new approach for the molecular profiling of breast cancer. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 80, n. 1, p.46-53, fev. 2006.

LUFF, A. P., et al. The incidence of the cancer of the breast, and his history after treatment. **British Medical Journal**, v. 1, p. 897-903, 14 mai. 1932.

MACIAS, Hector; HINCK, Lindsay. Mammary gland development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p.533-557, 4 abr. 2012.

MENGEL, Michael et al. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. **The Journal Of Pathology**, v. 198, n. 3, p.292-299, 27 ago. 2002.

MOSS, R. W. **Galen on Cancer – How Ancient Physicians Viewed Malignant Disease**. 1989.

NIKIFOROVA, Marina N.; NIKIFOROV, Yuri E. Molecular Anatomic Pathology: Principles, Techniques, and Application to Immunohistologic Diagnosis. In: DABBS, D. J. **Diagnostic Immunohistochemistry**. 4ª Edição. Filadélfia, Elsevier, 2014.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline**. EUA, 2002.

O'DONNELL, E. A., ERNST, D. N., HINGORANI, R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. **Immune Netw**, v. 2., n. 13, p. 43-54, 2013.

O'DONOVAN, P. J.; LIVINGSTON, D. M. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 6, p.961-967, abr. 2010.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Cancer Fact Sheet, 2017**. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 18/01/2018.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Press Release n° 263, 2018**. Disponível em <https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf>. Acesso em 01/07/2019.

PARK, Seho et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. **The Breast**, v. 21, n. 1, p.50-57, fev. 2012.

PARKES, Amanda; ARUN, Banu K.; LITTON, Jennifer K.. Systemic Treatment Strategies for Patients with Hereditary Breast Cancer Syndromes. **The Oncologist**, v. 22, n. 6, p.655-666, 3 maio 2017.

PAULA, Arnaud da Cruz et al. Molecular characterization of CD44+/CD24-/Ck+/CD45- cells in benign and malignant breast lesions. **Virchows Archiv**, v. 470, n. 3, p.311-322, 23 jan. 2017.

PEDREIRA, C. E., et al. Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. **Trends Biotechnol**, v. 7, n. 31, p. 415-25, 2013.

PETRELLI, Fausto et al. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 153, n. 3, p.477-491, 4 set. 2015.

PICON-RUIZ, Manuel et al. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 5, p.378-397, 1 ago. 2017.

POLLEY, Mei-yin C et al. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. **Modern Pathology**, v. 28, n. 6, p.778-786, 20 fev. 2015.

PRAT, Aleix; PEROU, Charles M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p.5-23, 24 nov. 2010.

RAVELLI, Andrea et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: Beyond the prognostic and predictive utility. **Tumor Biology**, v. 39, n. 4, p.1-8, abr. 2017.

RODRIGUEZ, Gabriela Vazquez et al. Estradiol Promotes Breast Cancer Cell Migration via Recruitment and Activation of Neutrophils. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 3, p.234-247, 3 fev. 2017.

ROSSOUW, J. E. et al. Writing Group For The Women's Health Initiative. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. **Jama: The Journal of the American Medical Association**, v. 288, n. 3, p.321-333, 17 jul. 2002.

RUFFELL, B. et al. Leukocyte composition of human breast cancer. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 109, n. 8, p.2796-2801, 8 ago. 2011.

SCHOLZEN, Thomas; GERDES, Johannes. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p.311-322, mar. 2000.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J.. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p.1565-1570, 24 mar. 2011.

SENKUS, E. et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 5, p.8-30, 26 ago. 2015.

SEO, A N et al. Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. **British Journal Of Cancer**, v. 109, n. 10, p.2705-2713, 15 out. 2013.

SHAPIRA, Niva. The potential contribution of dietary factors to breast cancer prevention. **European Journal Of Cancer Prevention**, v. 26, n. 5, p.385-395, set. 2017.

SHIM, Gil-jin et al. Differential expression of oestrogen receptors in human secondary lymphoid tissues. **The Journal Of Pathology**, v. 208, n. 3, p.408-414, 2006.

SINGH, Deependra et al. Association of symptoms and breast cancer in population-based mammography screening in Finland. **International Journal Of Cancer**, v. 136, n. 6, p.630-637, 4 set. 2014.

SLAMON, D.J., et al. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with the amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, n. 235, p. 177-82, 1987.

STÅLHAMMAR, Gustav et al. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. **Modern Pathology**, v. 29, n. 4, p.318-329, 26 fev. 2016.

SUN, Yi-sheng et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal Of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p.1387-1397, 2017.

TAMIMI, Rulla M et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 4, p.1-9, ago. 2008.

TAVASSOLI F.A., DEVILEE P. World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. IARC Press: Lyon 2003.

UNTCH, Michael; THOMSEN, Christoph. Clinical Practice Decisions in Endocrine Therapy. **Cancer Investigation**, v. 28, n. 1, p.4-13, jul. 2010.

VIEIRA, D. S. C. **Desempenho dos marcadores EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

WHERRY, E. John; KURACHI, Makoto. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p.486-499, 24 jul. 2015.

WOLFF, Antonio C. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p.3997-4013, nov. 2013.

YIN, Guanghao et al. Molecular markers' progress of breast cancer treatment efficacy. **Journal Of Cancer Research And Therapeutics**, v. 11, n. 5, p.11-15, 2015.

YANG, Xiaohong R. et al. Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Association Consortium

Studies. **Jnci**: Journal of the National Cancer Institute, v. 103, n. 3, p.250-263, 29 dez. 2010.

YANG, C. et al. Ki67 targeted strategies for cancer therapy. **Clinical And Translational Oncology**, v. 20, n. 5, p.570-575, 20 mai. 2018.

YIANNAKOPOULOU, E. Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. **Cell Oncol (Dordr)**, v.1, n. 37, p. 1-8, 2014.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Departamento de Análises Clínicas**  
**Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil**  
**Tel: (48) 3721 8146**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**TÍTULO DA PESQUISA:**

**Investigação de Novos Alvos Imunofenotípicos Aplicados ao Diagnóstico e ao Prognóstico de Neoplasias Hematológicas e Não Hematológicas**

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas nos itens IV. 3 da Resolução CNS nº466/12.

#### **QUAL OBJETIVO DESTE ESTUDO?**

O estudo acima refere-se a uma pesquisa que visa investigar novos marcadores que sirvam como alvos para o diagnóstico e para o prognóstico de neoplasias de células linfoides B maduras (linfomas) e não hematológicas (câncer de mama). Após a coleta do material biológico e realização dos exames laboratoriais solicitados pelo médico do senhor(a), a amostra biológica restante será encaminhada para a pesquisa. Dessa forma, seus exames não serão alterados ou prejudicados pela realização da pesquisa.

#### **EU TENHO QUE PARTICIPAR?**

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

#### **EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?**

Não, pois não haverá duas coletas, aproveitaremos o mesmo material biológico colhido para os exames laboratoriais, dessa forma não há nenhum desconforto adicional. Entretanto, existe um pequeno risco de que o senhor(a) possa sentir algum mal-estar durante ou logo após a coleta porém, caso o senhor (a) sinta algo estará bem assistido pelos funcionários do setor de coleta.

#### **QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE?**

Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.

#### **TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR? TENHO DIREITO A RESSARCIMENTO?**

Não, por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração ou ressarcimento. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque a participação do(a) senhor(a) será apenas com a doação da amostra biológica colhida para a realização dos exames laboratoriais.

#### **EU POSSUO ALGUM DIREITO À INDENIZAÇÃO?**

Caso o senhor(a) tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da

pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada em juízo.

### **MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?**

Informamos que não haverá nenhuma avaliação física ou entrevistas efetuadas pelos pesquisadores, sendo assim, os dados do seu prontuário serão consultados e essas informações serão mantidas sob sigilo absoluto e privado. Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para a manutenção do sigilo, no entanto, existe a remota possibilidade da quebra do sigilo involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão e as informações divulgadas no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma, pelos contatos informados no final deste documento.

### **COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?**

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

#### **Coordenadora do Projeto:**

Maria Cláudia Santos da Silva

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: [maria.claudia.silva@ufsc.br](mailto:maria.claudia.silva@ufsc.br)

#### **Pesquisadores:**

- Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: [renatarudolf@gmail.com](mailto:renatarudolf@gmail.com)

- Mariangeles Auat

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: [mariauat@gmail.com](mailto:mariauat@gmail.com)

- Sandro Wopereis

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: [swopereis@gmail.com](mailto:swopereis@gmail.com)

#### **Comitê de Ética em Pesquisa (local):**

Eu, \_\_\_\_\_ confirmo que:

1. Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;
2. Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar



deste estudo;

3. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4. Concordo em participar deste estudo.

<p>_____</p> <p>Assinatura do participante</p>	<p>_____</p> <p>Nome do participante    Data: ____/____/____</p>
--	--