

GILZA SOFIA BRITO GONÇALVES

**Caracterização do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide:
Perfil Clínico-Patológico, Resposta Imune (Estroma Linfóide e
Expressão de PD-L1), Infecção pelo Vírus de Epstein-Barr e
Instabilidade de Microssatélites**



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS E MEDICINA**

2016

GILZA SOFIA BRITO GONÇALVES

**Caracterização do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide:
Perfil Clínico-Patológico, Resposta Imune (Estroma Linfóide e
Expressão de PD-L1), Infecção pelo Vírus de Epstein-Barr e
Instabilidade de Microssatélites**

Mestrado em Oncobiologia e Mecanismos Moleculares do Cancro

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professora Doutora Fátima Carneiro

Professor Doutor Álvaro Tavares



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS E MEDICINA

2016

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Eu, Gilza Sofia Brito Gonçalves, declaro ser a autora da dissertação intitulada, **“Caracterização do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide: Perfil Clínico-Patológico, Resposta Imune (Estroma linfóide e Expressão de PD-L1), Infecção pelo Vírus de Epstein-Barr e Instabilidade de Microssatélites”** que é original e inédita. Os autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Assinatura do Autor:

Gilza Sofia Brito Gonçalves

©Copyright

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

Aos meus pais e ao meu irmão

“A essência do conhecimento consiste em aplica-lo, uma vez possuído”

CONFÚCIO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Fátima Carneiro, orientadora desta dissertação, por me ter concedido a oportunidade de integrar deste projeto e desenvolver a minha dissertação. Agradeço o apoio, a partilha de conhecimentos, a disponibilidade, o profissionalismo e o rigor científico demonstrado ao longo da elaboração deste trabalho, uma vez que sem a sua valiosa contribuição nada disto seria possível.

Em segundo lugar, agradeço ao Professor Doutor Álvaro Tavares, pela orientação, motivação e aprendizagem transmitida.

Agradeço à Dra. Irene Gullo pelo apoio, acompanhamento e supervisão em todas as fases deste trabalho.

Agradeço à Doutora Carla Oliveira, à Doutora Gabriela Almeida e à Dra. Marta Pinto pelo apoio, disponibilidade e orientação na aprendizagem das técnicas de PCR, e imunofluorescência no I3S.

Agradeço à Dra. Maria de Lurdes Simões o contributo na análise estatística dos dados.

Ao Técnico Rui Correia, pela partilha de conhecimento na aprendizagem e aperfeiçoamento das técnicas laboratoriais.

A todos os médicos, técnicos e colaboradores do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João do Porto pelo acolhimento e bom ambiente de trabalho.

A todos os professores da Universidade do Algarve.

Agradeço a todos os meus amigos, colegas e familiares que sempre me aconselharam, apoiaram e incentivaram para nunca desistir.

Acima de tudo, sou muito grata aos meus pais, Ondina Brito e Jorge Gonçalves, e ao meu irmão Eldrick Gonçalves que apesar de não estarem presente no país, deram-me sempre o apoio emocional e financeiro para o meu bem-estar durante este período académico. Agradeço pelo incentivo, amor e atenção sem reservas nos momentos difíceis durante a minha vida académica.

Não deixo de agradecer o meu namorado Walter, pelo apoio emocional, companheirismo e pela escuta dos meus desabafos ao longo deste trabalho.

O meu profundo e sentido obrigado a todas as pessoas que contribuíram, para a concretização desta etapa académica, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

RESUMO

O cancro gástrico (CG) é uma doença heterogénea, fato que se reflete nas características macroscópicas, histológicas e moleculares. O carcinoma gástrico com estroma linfóide (CGEL), é um subtipo histológico de CG, caracterizado por abundante infiltrado linfocitário intratumoral, constituído maioritariamente por linfócitos T, que desempenham funções anti e pro-tumorais. O PD-L1 é um ligando que inibe as funções dos linfócitos T. A expressão aumentada de PD-L1 no CG sugere a possibilidade de utilização de agentes inibidores do *checkpoint* imunológico como terapia de precisão.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o CGEL, relativamente ao perfil clínico-patológico e molecular, resposta imunológica (estroma linfóide e expressão de PD-L1), infecção por EBV, instabilidade de microssatélites e co-localização de PD-L1 nas células neoplásicas e estromais.

O estudo foi realizado numa amostra de 24 casos de CGEL, em que se avaliaram os seguintes parâmetros: características clínico-patológicas; infecção por EBV através de *HIS* e *PCR*; instabilidade de microssatélites por *PCR* e eletroforese capilar; expressão de pan-citoqueratina (AE1/AE3), CD8, CD3 e PD-L1 por imuno-histoquímica; co-localização de PD-L1/CD68 e PD-L1/citoqueratina por imunofluorescência com dupla marcação. Os linfócitos T CD8+ e CD3+ foram quantificados no centro e na periferia do tumor.

Os principais resultados mostraram: infecção por EBV em 66,7% dos casos; presença de IMS-A em 16,7% dos casos; expressão de PD-L1 ($\geq 50\%$ de células neoplásicas e estromais) em 4 casos com infecção por EBV e em 2 casos com IMS-A. Verificou-se também uma maior densidade de linfócitos T CD3+ e CD8+ nos casos com infecção por EBV e na periferia dos tumores.

Conclui-se que o CGEL se caracteriza por um perfil clínico-patológico particular, elevada taxa de infecção por EBV e sobreexpressão de PD-L1. Os resultados deste estudo contribuem para consolidar o conceito de que o CGEL associado a infecção por EBV é um alvo potencial para imunoterapia dirigida ao *checkpoint* imunológico.

Palavras-chave: Carcinoma gástrico com estroma linfóide; EBV; instabilidade de microssatélites; PD-L1; resposta imunológica.

ABSTRACT

GC is a heterogeneous disease, reflected in the macroscopic, histological and molecular features. The gastric carcinoma with lymphoid stroma (GCLS) is a histologic subtype of GC, characterized by abundant intratumoral lymphocytic infiltration, consisting mainly in T lymphocytes, which play pro and anti-tumor roles. PD-L1 is a ligand that inhibits the functions of T lymphocytes. Increased expression of PD-L1 in GC suggests the possibility of using *checkpoint* inhibitors as tools for targeted therapy.

This study aimed at characterizing GCLS in terms of clinicopathological and molecular profile, immune response (lymphoid stroma and PD-L1 expression), EBV infection, microsatellite instability and co-localization of PD-L1 in tumour and stroma cells.

The study evaluated, in a sample of 24 cases of GCLS, the following parameters: clinical and pathological features; EBV infection by ISH and PCR; microsatellite instability by PCR and capillary electrophoresis; expression of pan-cytokeratin (AE1/AE3), CD8, CD3 and PD-L1 by immunohistochemistry; co-localization of PD-L1/cytokeratin and PD-L1/CD68 by immunofluorescence double staining. The CD8 + and CD3+ T lymphocytes were quantified in the centre and at the periphery of the tumour.

The main results showed: EBV infection in 66.7% of the cases; presence of IMS-A in 16.7% of the cases; PD-L1 expression ($\geq 50\%$ of neoplastic and stromal cells) in 4 cases with EBV infection and 2 cases with microsatellite instability high (MSI-H). There was also a higher density of CD3 + and CD8 + T lymphocytes in cases with EBV infection and at the periphery of the tumours.

In conclusion, GCLS is characterized by a particular clinicopathological profile, high rate of EBV infection and overexpression of PD-L1. The results of this study contribute to consolidate the concept that GCLS associated with EBV infection is a potential target for immune *checkpoint* therapy.

Keywords: *Gastric cancer with lymphoid stroma; EBV; microsatellite instability, PD-L1; immune response.*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia e etiologia do CG.....	2
1.2. Classificação morfológica do CG	5
1.3. Classificação molecular do CG.....	6
1.4. Características do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide (CGEL).....	8
1.5. EBV.....	9
1.5.1. EBV associado ao CGEL	12
1.5.2. Métodos de detecção de EBV	13
1.6. Instabilidade de microssatélites (IMS).....	13
1.6.1. Instabilidade de microssatélites no CG	14
1.6.2. Métodos de detecção de instabilidade de microssatélites	14
1.7. Microambiente tumoral.....	14
1.7.1. Infiltrado linfocitário intratumoral (ILI) no CG	15
1.7.2. Imuno-modulação no cancro	15
1.7.3. Moléculas do <i>checkpoint</i> imunológico.....	16
1.7.3.1. PD-1.....	16
1.7.3.2. PD-L1	16
1.8. Expressão de PD-L1 no CG.....	18
1.9. Expressão de PD-L1 e infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) no CG.....	18
1.10. Imunoterapia - Inibidores do <i>checkpoint</i> imunológico	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivos gerais e específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Amostras	24
3.2. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE).....	25
3.3. Imuno-histoquímica (IHQ)	25
3.3.1. Imuno-histoquímica realizado em sistema automático (Ventana Ultra)	27
3.3.2. Protocolo Imuno-histoquímico.....	28
3.4. Imunofluorescência (IF) – Dupla marcação	33
3.5. Extração de DNA	35
3.6. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	35
3.7. Instabilidade de microssatélites (IMS).....	37
3.8. <i>Nested</i> PCR	40
3.8.1. <i>Nested</i> PCR para detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV).....	40
3.9. Hibridização <i>in situ</i> (HIS)	42
3.10. Avaliação da expressão de PD-L1	45
3.11. Avaliação da expressão de CD8 e CD3 no estroma linfóide	46
3.11.1. Método de quantificação dos linfócitos T CD3+ e CD8+ no software ImageJ.....	46
3.12. Análise estatística.....	48

4. RESULTADOS	49
4.1. Características clínico-patológicas do CGEL	50
4.2. Caracterização morfológica do CGEL.....	51
4.3. Expressão de CD3 e CD8 no microambiente tumoral	54
4.4. Infecção por EBV no CGEL.....	55
4.5. Comparação das técnicas de deteção da infecção por EBV	58
4.6. Comparação de infecção por EBV com a presença de linfócitos CD3+ e CD8+ no centro e na periferia do tumor	58
4.7. Instabilidade de microssatélites no CGEL.....	59
4.8. Associação entre infecção por EBV e IMS no CGEL.....	60
4.9. Avaliação da expressão de PD-L1 no CGEL.....	61
4.10. Padrão morfológico de expressão de PD-L1 nas células neoplásicas e células estromais	61
4.11. Comparação entre a expressão de PD-L1 e o infiltrado linfocitário intratumoral ...	63
4.12. Avaliação da dupla marcação por imunofluorescência	64
4.13. Comparação entre a expressão de PD-L1, infecção por EBV e IMS	65
4.14. Expressão de PD-L1 no CGEL e sobrevida dos doentes.....	67
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES FINAIS	75
7. PERSPETIVAS FUTURAS	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9. ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Taxa de incidência e mortalidade dos tipos de cancro mais frequentes. Adaptado da ref. (2).	2
Figura 1.2- Incidência mundial do cancro do estômago. Adaptado da ref. (2).	3
Figura 1.3- Incidência e mortalidade do cancro gástrico em Portugal. Adaptado da ref.(2).....	3
Figura 1.4- Percentagem (do nº total de casos) dos tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em Portugal no ano de 2010. Adaptado da ref. (4).	4
Figura 1.5- Esquema representativo da classificação molecular do CG proposta por “ <i>The Cancer Genome Atlas</i> ”. Este esquema descreve as principais características dos quatro sub-tipos moleculares de carcinoma gástrico. Adaptado da ref. (13). EBV-Epstein-Barr Virus; IMS-Instabilidade de microssatélites; EG- Estabilidade genómica; IC- Instabilidade cromossómica.	7
Figura 1.6- Fotografia microscópica dos CGEL. Histologicamente, identifica-se um infiltrado inflamatório abundante no estroma com a presença de estruturas tubulares e glandulares (400X).	8
Figura 1.7- Fotografia macroscópica de um carcinoma gástrico com estroma linfóide. Macroscopicamente, identifica-se uma neoplasia vegetante na parede anterior da transição cárdia/ corpo.	9
Figura 1.8- Esquema ilustrativo da oncogénese viral em CGaEBV. Adaptado da (26). A infeção por <i>H. pylori</i> e fatores ambientais induzem a uma inflamação crónica, e consequentemente resulta um denso infiltrado de linfócitos, incluído células B infetadas com EBV. As células B infetadas e reativadas têm a capacidade de infecta as células epiteliais do estômago. Uma vez estabelecida a infeção latente, o EBV utiliza mecanismos celulares do hospedeiro para: manutenção do genoma viral, hipermetilação do DNA do genoma viral e do hospedeiro, alteração da expressão de miRNA e secreção de exossomas, resultando no desenvolvimento e progressão do CGaEBV.	11
Figura 1.9- Esquema representativo do mecanismo de evasão à vigilância imunológica. Adaptado da ref. (80).....	17
Figura 1.10- Esquema representativo do bloqueio do mecanismo de <i>checkpoint</i> imunológico, através da utilização de anticorpos anti-PD-L1 e anti-PD-1. Adaptado das ref. (88, 89).....	19
Figura 3.1- Esquema dos dois sistemas de IHQ: Método Direto – É realizado em apenas uma etapa, em que o anticorpo primário (verde) está ligado a uma enzima ou fluorocromo; Método Indireto- é realizado	

em duas etapas, sendo utilizado um anticorpo secundário ligado a uma enzima para reconhecer o anticorpo primário ligado ao antígeno do tecido. Adaptado da ref. (92).....	26
Figura 3.2- Polímero dextrano acoplado com vários anticorpos secundários e enzimas (Peroxidases HRP). Adaptado da ref. (92).	26
Figura 3.3 - Equipamento BenchMark ULTRA (Ventana).....	28
Figura 3.4- Kit de detecção <i>Optiview</i> DAB. Adaptado da ref. (93).....	31
Figura 3.5- Esquema representativo do kit de detecção <i>optiview</i> juntamente com o kit de amplificação. Adaptado da ref (93).....	32
Figura 3.6- Esquema ilustrativo das 3 etapas principais da reação de PCR. Adaptado da ref.(96).....	37
Figura 3.7- No PCR multiplex, são utilizados múltiplos pares de primers, para amplificar múltiplos alvos de interesse, numa única reação de PCR. Adaptado da ref.(97).	38
Figura 3.8- Esquema demonstrativo do princípio básico do <i>Nested</i> PCR. Adaptado da ref. (97).	40
Figura 3.9- Esquema ilustrativo do <i>Nested</i> PCR na detecção do EBV nos CGEL.	41
Figura 3.10- Esquema ilustrativo do princípio básico do kit de detecção de hibridização <i>in situ</i> . Adaptado da ref. (103).	44
Figura 4.1- Expressão de AE1/AE3 pelas células neoplásicas do CGEL: A- Estrutura glandular (cribriforme); B- Estrutura cordonal; C- Estrutura micro-glandular; D- Estrutura de células pouco-coesas (IHQ, 400x).	51
Figura 4.2- Padrão morfológico dos CGEL através das técnicas de HE e Imuno-histoquímica. A- Pela coloração H&E verifica-se um infiltrado linfóide proeminente no estroma e o padrão morfológico das células neoplásicas pouco nítida; B- Imuno-histoquímica com o anticorpo AE1/AE3, para a identificação das células neoplásica e melhor demonstração do padrão morfológico; Identificação do arranjo das células neoplásicas: em túbulos (C), em glândulas (D), em cordões e trabéculas (E) e células isoladas (400x).	52
Figura 4.3- Expressão de CD3 e CD8 em carcinomas gástricos com estroma linfóide: A- Expressão de CD3 no centro do tumor; B-Expressão de CD3 na periferia do tumor; C- Expressão de CD8 no centro do tumor; D- Expressão de CD8 na periferia do tumor (IHQ, 400x).....	55
Figura 4.4- Hibridização <i>in situ</i> para detecção de infecção por EBV no CGEL. O sinal de hibridização localiza-se apenas no núcleo das células neoplásicas, representado por uma cor azul (HIS, 100x).	57
Figura 4.5- <i>Nested</i> PCR para detecção de DNA do vírus de EBV: A- O produto de amplificação de 300 bp corresponde ao gene <i>EBNA2</i> -EBV tipo 1 (casos assinalados com uma seta branca). B- Não se verificou amplificação do gene <i>EBNA2</i> -EBV tipo 2 em qualquer dos casos. M-marcador de peso	

molecular; 1-15 – casos em estudo; 16- controlo negativo; 17- controlo positivo para o EBNA2- EBV tipo 2 (linha celular IPA); 18- controlo positivo para o EBNA2- EBV tipo1 (linha celular GP). 57

Figura 4.6- Eletroferograma representativo de instabilidade microssatélites de alto grau. As setas demonstram picos extras nas regiões microssatélites identificadas pelos marcadores NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26, respetivamente. 60

Figura 4.7- Eletroferograma representativo de instabilidade microssatélites estáveis, ou seja, não se verifica picos extras em nenhum os marcadores. 60

Figura 4.8 - Coloração Imuno-histoquímica com o anticorpo AE1/AE3 (A) e PD-L1 (B): A- Expressão de AE1/AE3, realçando as células epiteliais neoplásicas (IHQ, 100x); B- Expressão de PD-L1 membrana e citoplasmático nas células neoplásicas e estromais (IHQ, 200x)..... 62

Figura 4.9- Coloração Imuno-histoquímica com o anticorpo PD-L1. Expressão aumentada de PD-L1 >50% identificada nas células epiteliais neoplásicas e estromais. As células epiteliais neoplásicas apresentam uma expressão membranar, citoplasmática de PD-L1 (200x)..... 62

Figura 4.10- Coloração Imuno-histoquímica com o anticorpo PD-L1. Expressão de PD-L1 <50% identificada principalmente nas células estromais (200x)..... 63

Figura 4.11- Co-localização de expressão de PD-L1 em células epiteliais neoplásicas (AE1/AE3) e em macrófagos (CD68): A- Expressão de AE1/AE3 em células epiteliais neoplásicas (verde); B- Expressão de PD-L1 em células epiteliais neoplásicas (vermelho); C- Co-expressão de PD-L1 e AE1/AE3 em células epiteliais neoplásicas (amarelo); D- Expressão de CD68 em macrófagos (verde); E- Expressão de PD-L1 em macrófagos (vermelho); F- Co-expressão de PD-L1 e CD68 em macrófagos (amarelo) (Imunofluorescência, 400x)..... 65

Figura 4.12- Comparação da expressão de PD-L1, infecção por EBV e IMS-A nos 6 casos com expressão de PD-L1 $\geq 50\%$: infecção por EBV (n=4); IMS-A (n=2). 66

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1- Os dois sistemas de classificação do cancro gástrico. Adaptado da ref. (1).....	6
Tabela 1.2- Características do CGEL. Adaptado da ref (17).....	8
Tabela 1.3 –Tipo de latência em tumores malignos associados ao EBV. Adaptado da ref. (24).	10
Tabela 1.4 - Características Clínico-patológicas dos CGaEBV. Adaptado da ref. (24).....	12
Tabela 1.5- Inibidores do <i>checkpoint</i> imunológico utilizados em ensaios clínicos nos doentes com CG avançado. Adaptado das ref. (52, 61, 88).....	20
Tabela 3.1- Características clínico-patológicas dos doentes com CGEL	24
Tabela 3.2- Anticorpos primários e condições otimizadas da IHQ utilizada neste estudo.....	29
Tabela 3.3- Anticorpos primários e anticorpos secundários conjugados com corante fluorescente	33
Tabela 3.4- Sequências de primers para análise de IMS.	39
Tabela 3.5- Sequências de primers do 1º PCR e do Nested PCR. Adaptado da ref. (23).....	41
Tabela 3.6- Sistema de Score de imunoreactividade da expressão de PD-L1. Adaptado da (104).	46
Tabela 4.1- Características clínico-patológicas de 24 casos de CGEL	50
Tabela 4.2- Características morfológicas dos CGEL	53
Tabela 4.3- Comparação da expressão de CD8 e CD3 no centro e na periferia do tumor	54
Tabela 4.4- Detecção de infecção por EBV através de técnica de hibridização <i>in situ</i>	56
Tabela 4.5- Detecção de infecção por EBV através da técnica de PCR	56
Tabela 4.6- Comparação das técnicas de HIS e PCR na detecção de infecção por EBV	58
Tabela 4.7- Comparação da infecção por EBV e a presença de linfócitos CD8+ e CD3+ no centro e na periferia do tumor	59
Tabela 4.8- Instabilidade de microssatélites no CGEL	59
Tabela 4.9- Associação entre infecção por EBV e IMS-A.....	61
Tabela 4.10- Expressão de PD-L1 no CGEL	61
Tabela 4.11- Comparação entre a expressão de PD-L1, infecção por EBV e IMS.....	66
Tabela 4.12- Expressão de PD-L1 e a sobrevida geral (Meses)	67

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 9.1- Protocolo de IHQ para o anticorpo AE1/AE3.....	91
Anexo 9.2- Protocolo de IHQ para o anticorpo PD-L1.....	92
Anexo 9.3- Protocolo de IHQ para o anticorpo CD8.....	93
Anexo 9.4- Protocolo de IHQ para o anticorpo CD3.....	94
Anexo 9.5- Protocolo de recuperação antigénica para a técnica de imunofluorescência-dupla marcação.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

ATC	Anticorpo
ARHGAP	<i>Rho GTPase activiting proteins</i>
BARTs	<i>Bam -HI-A region rightward transcripts</i>
BCIP	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
CC1	<i>Cell Conditional 1</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CCNE1	<i>Cyclin E1</i>
CDK6	<i>Cyclin Dependent Kinase 6</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2</i>
CG	Cancro gástrico
CGaEBV	Carcinoma gástrico associado à infeção por EBV
CGEL	Carcinoma gástrico com estroma linfóide
CLDN18	<i>Claudin 18</i>
CTLA-4	<i>CytotoxicT- lymphocyte antigen-4</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
EBER	<i>Epstein-Barr Virus (EBV)-encodem small RNAs</i>
EBNA2	<i>Epstein Barr antigen nuclear 2</i>
EBNA1	<i>Epstein Barr antigen nuclear 1</i>
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EG	<i>Estabilidade genómica</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
bp	<i>Base pair</i>
EPCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
EPOS	<i>Enhancer Polymer one Step Staining</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HNPCC	<i>Hereditárias nonpolyposis colorectal cancer</i>

HRP	Peroxidase <i>horseradish</i>
IF	Imunofluorescência
IHQ	Imuno-histoquímica
ILI	Infiltrado linfocitário intratumoral
IC	Instabilidade cromossômica
IMS	Instabilidade de microssatélites
IMS-A	Instabilidade de microssatélites de alto grau
IPATIMUP	Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto
<i>JAK2</i>	<i>Janus kinase 2</i>
<i>LMP</i>	<i>Latent membrane protein</i>
<i>MLH1</i>	<i>MutL Homolog 1</i>
<i>MMR</i>	<i>Mismatch Repair</i>
<i>MSH2</i>	<i>MutS Homolog 2</i>
<i>MSH6</i>	<i>MutS Homolog 6</i>
MSS	<i>Microsatellite stable</i>
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
<i>PMS2</i>	<i>PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component</i>
RA	Recuperação antigénica
RNA	Ácido Ribonucleico
SCC	<i>Sodium salt citrate</i>
TA	Temperatura ambiente
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<i>VEGFR</i>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
OMS	Organização mundial de saúde

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia e etiologia do CG

O Cancro Gástrico (CG) é uma neoplasia epitelial maligna que afeta a mucosa do estômago (1). O CG é considerado a quinta neoplasia maligna mais frequente a nível mundial (Figura 1.1) (2). Dados da Globocan indicam que o CG constitui a terceira causa de morte mundial por neoplasia maligna (Figura 1.1) (2). Para além disso, em 2012, aproximadamente 723.100 doentes morreram por CG, e 951,600 casos foram diagnosticados de novo (2).

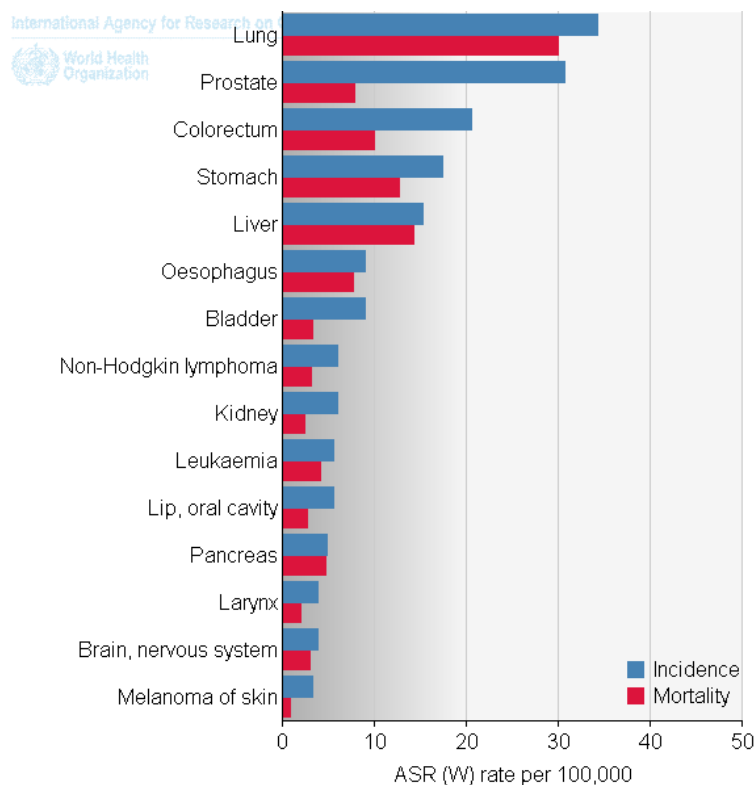


Figura 1.1- Taxa de incidência e mortalidade dos tipos de cancro mais frequentes. Adaptado da ref. (2).

A incidência do CG varia com a geografia, sendo mais elevada nos países da Ásia Oriental (Japão, China, Coreia), Europa Central e Oriental e na América do Sul (Figura 1.2) (3). Os países da América do Norte, Europa do Norte e África apresentam uma baixa taxa de incidência (3). A incidência do CG também varia com o sexo, sendo predominante nos homens (Figura 1.2) (1, 2).

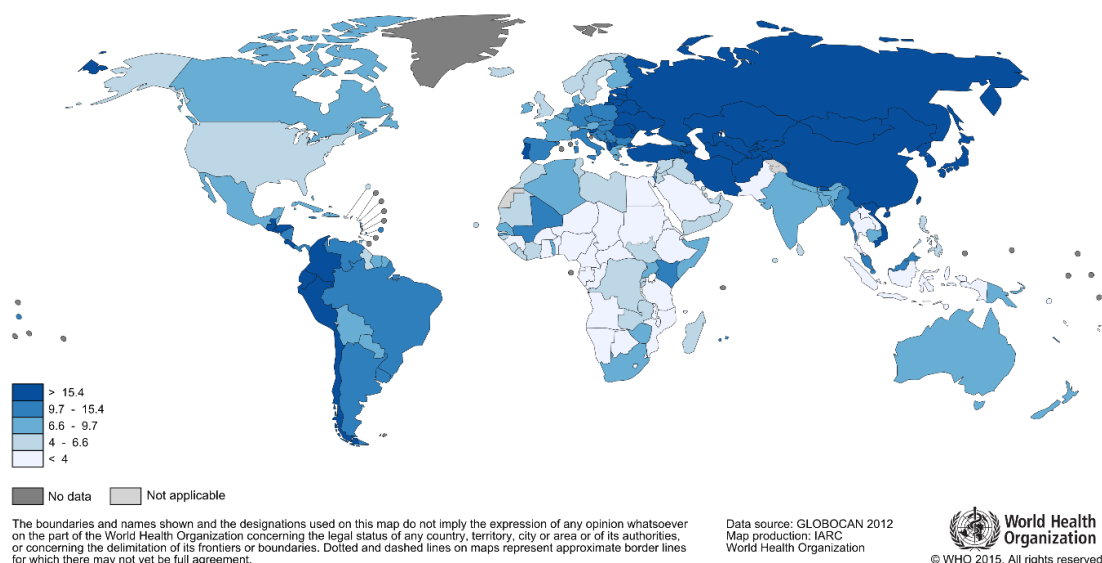


Figura 1.2- Incidência mundial do cancro do estômago. Adaptado da ref. (2).

Em Portugal, segundo dados da Glococan, o cancro gástrico é a quinta neoplasia mais frequente e a quarta causa de morte por neoplasia maligna (Figura1.3) (2). Em Portugal, esta neoplasia tem uma incidência de 3018 casos e uma mortalidade de 2285 casos por ano (2). A prevalência de 5 anos destes doentes é de 3,7% (2).

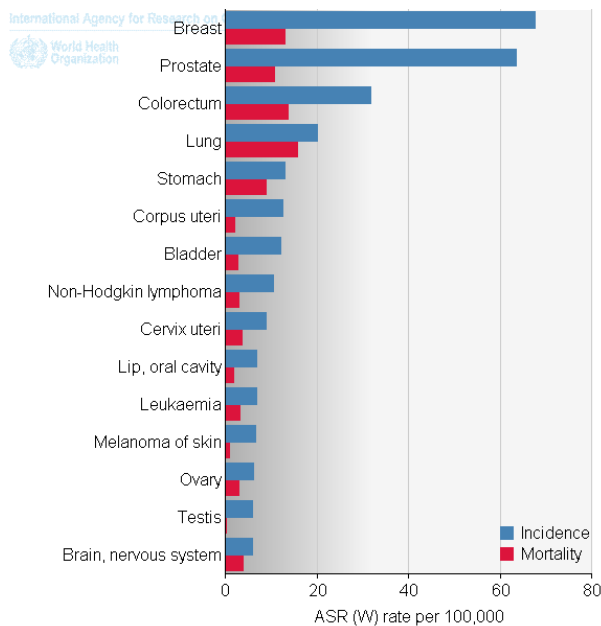


Figura 1.3- Incidência e mortalidade do cancro gástrico em Portugal. Adaptado da ref.(2).

Dados do Registo Oncológico Regional do Norte (RORENO), relativamente ao ano de 2010, apontam que em Portugal o CG é a quarta neoplasia mais frequente, representando 8,5% dos tumores no sexo masculino e 7,1% dos tumores no sexo feminino (Figura 1.4) (4).

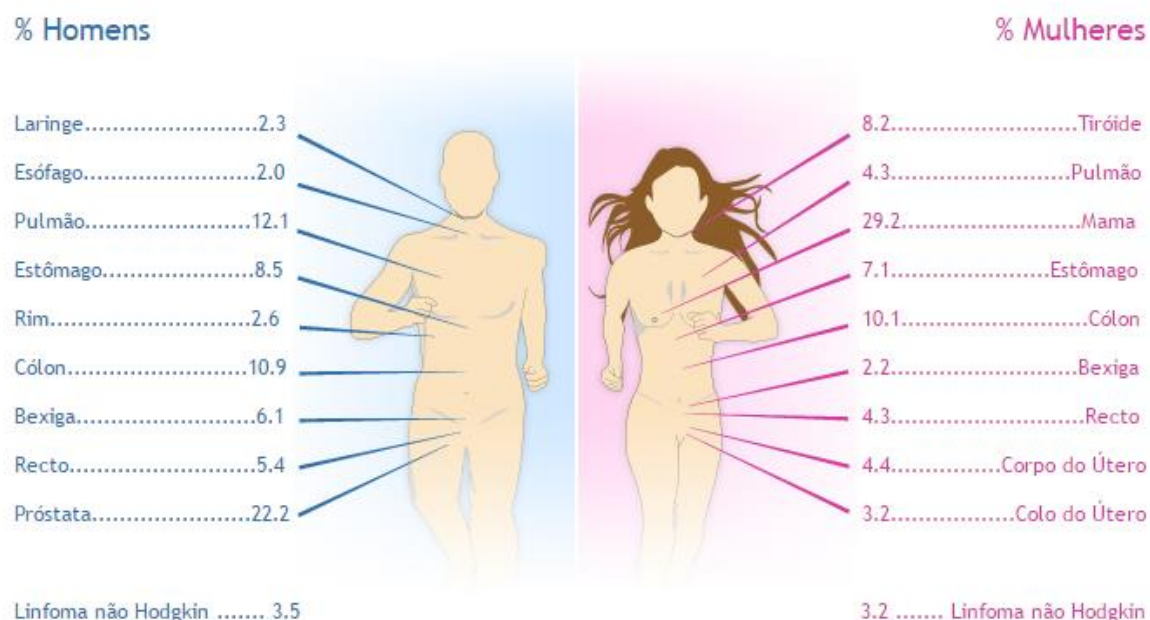


Figura 1.4- Percentagem (do nº total de casos) dos tumores mais frequentes no sexo masculino e feminino em Portugal no ano de 2010. Adaptado da ref. (4).

O CG é uma doença multifatorial, relacionada com vários fatores de risco: infecção por *Helicobacter pylori*; infecção pelo *Epstein-Barr Virus* (EBV), tabagismo, obesidade, maus hábitos alimentares (consumo de alimentos fumados, salgados e contaminados por nitratos/nitritos), raça (ser da raça negra), idade (ter mais de 65 anos), entre outros (5).

Para além destes fatores ambientais, há fatores de suscetibilidade genética que condicionam aumento de risco de desenvolvimento de GC, como por exemplo o Síndrome de Cancro Gástrico Hereditário de Tipo Difuso, a Síndrome de Lynch, e a Polipose Adenomatosa Familiar (3).

Nos últimos anos, a incidência do CG tem vindo a diminuir devido aos avanços na prevenção, nos meios de diagnóstico precoce e nos tratamentos personalizados (6). Contudo, o CG continua a constituir um problema de saúde pública mundial, devido ao prognóstico reservado, especialmente quando diagnosticado em estadios avançados, tendo como consequência a limitação nas opções de tratamento (6). Por exemplo, nos Estados Unidos, a taxa de sobrevivência aos 5 anos, para os doentes com CG, ronda os 29% (7).

Deste modo, a investigação tem-se concentrado na caracterização morfológica e molecular do CG, assim como na identificação de biomarcadores de diagnóstico, de prognóstico e preditivos da resposta terapêutica dirigida a alvos moleculares (8).

1.2. Classificação morfológica do CG

O CG é uma doença heterogênea, fato que se reflete nas características macroscópicas, histológicas e moleculares (1). Apesar da heterogeneidade morfológica do CG, existem dois sistemas principais de classificação histológica do CG: a classificação de Lauren (9), e a classificação da Organização mundial de saúde (OMS) (1). Estas classificações sub-dividem o CG, de acordo com o perfil histológico, o grau de diferenciação, o padrão de crescimento e a histogênese (1). Cerca de 90% dos CGs são adenocarcinomas que correspondem a vários sub-tipos histológicos (1).

De acordo com a classificação de Lauren, identificam-se dois tipos principais de CG: o tipo intestinal e o tipo difuso. O CG tipo intestinal é caracterizado pela formação de estruturas glandulares com diferentes graus de diferenciação. No CG tipo difuso observa-se perda de adesão das células tumorais que, por isso são denominadas pouco-coesas, com capacidade de infiltrar a parede gástrica de forma difusa. Nesta classificação de CG reconhecem-se ainda dois sub-tipos morfológicos: o “não classificado” ou “indeterminado” e o tipo misto, na qual se verifica coexistência dos dois tipos principais (intestinal e difuso) (9-12).

A classificação da OMS sub-divide os adenocarcinomas gástricos em cinco sub-tipos principais, de acordo com o padrão morfológico: carcinoma tubular, papilar, mucinoso, carcinoma de células pouco-coesas e carcinoma misto (1). Além destes, existem outras variantes histológicas raras, que representam apenas 5% de todos os CG, compreendendo, entre outros, carcinoma adenoescamoso, carcinoma hepatóide, e carcinoma gástrico com estroma linfóide (1).

Tabela 1.1- Os dois sistemas de classificação do cancro gástrico. Adaptado da ref. (1).

Classificação de Lauren	Classificação de WHO
Tipo Intestinal	Carcinoma Tubular
Tipo Difuso	Carcinoma Papilar
Tipo Misto	Carcinoma Mucinoso
Tipo “Não Classificado”	Carcinoma de Células Pouco Coesas
	Carcinoma Misto
	Variantes raras: Carcinoma gástrico com estroma linfóide, carcinoma adenoescamoso, entre outros.

1.3. Classificação molecular do CG

De acordo com “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA), o CG pode ser classificado em 4 sub-tipos moleculares: (1) CG associado à infeção por EBV; (2) CG com instabilidade de microssatélites; (3) CG com estabilidade genómica; e (4) CG com instabilidade cromossómica (13) (Figura 1.5). Esta classificação baseia-se no estudo de vias de sinalização, na identificação de mutações determinantes (*driver mutations*), assim como em alterações epigenéticas (13).

Os tumores associados à infeção por EBV, apresentam mutação no gene *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA)*, hipermetilação do gene *Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2 (CDKN2A)* (p16), amplificação do gene *Janus kinase 2 (JAK2)*, alteração de genes responsáveis pela resposta imune (*CD274*), amplificação/sobreexpressão dos genes *PD-L1* e *PD-L2*. O CG deste tipo apresenta estroma linfóide abundante (13).

Os tumores com instabilidade de microssatélites apresentam hipermetilação do *Deoxyribonucleic acid* (DNA) e silenciamento epigenético do gene *MutL Homolog 1 (MLH1)*, assim como hipermutação de vários genes, nomeadamente os que codificam os fatores da classe 1 do sistema HLA (13).

Os tumores com estabilidade genómica são caracterizados pela fusão ou mutação dos genes *RHOA* e *Rho GTPase activating proteins (ARHGAP)* e mutação somática do gene *CDHI* (gene que codifica a caderina – E). O CG deste tipo corresponde geralmente ao sub-tipo histológico de tipo difuso (13).

Por último, os tumores com instabilidade cromossómica, caracterizam-se por mutações do gene *TP53*, ativação de recetores com atividade tinosina-cinase, assim como amplificação de genes que codificam fatores de crescimento (*Epidermal growth factor receptor (EGFR)*, *Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)*) e amplificação de genes reguladores do ciclo celular, *Cyclin D1 (CCND1)*, *Cyclin E1 (CCNE1)* e *Cyclin Dependent Kinase 6 (CDK6)*.

A heterogeneidade morfológica e molecular do carcinoma gástrico reflete-se na dificuldade em identificar terapêuticas eficazes e “alvos terapêuticos” com relevância clínica na era da chamada “medicina de precisão” (14, 15).

No entanto, ainda é desconhecido o impacto da classificação molecular relativamente aos benefícios clínicos, nomeadamente no que se refere ao desenvolvimento de ensaios clínicos (8, 13). Torna-se urgente a validação das recentes classificações moleculares em ensaios clínicos para validação de novas terapêuticas na prática clínica (13, 16).

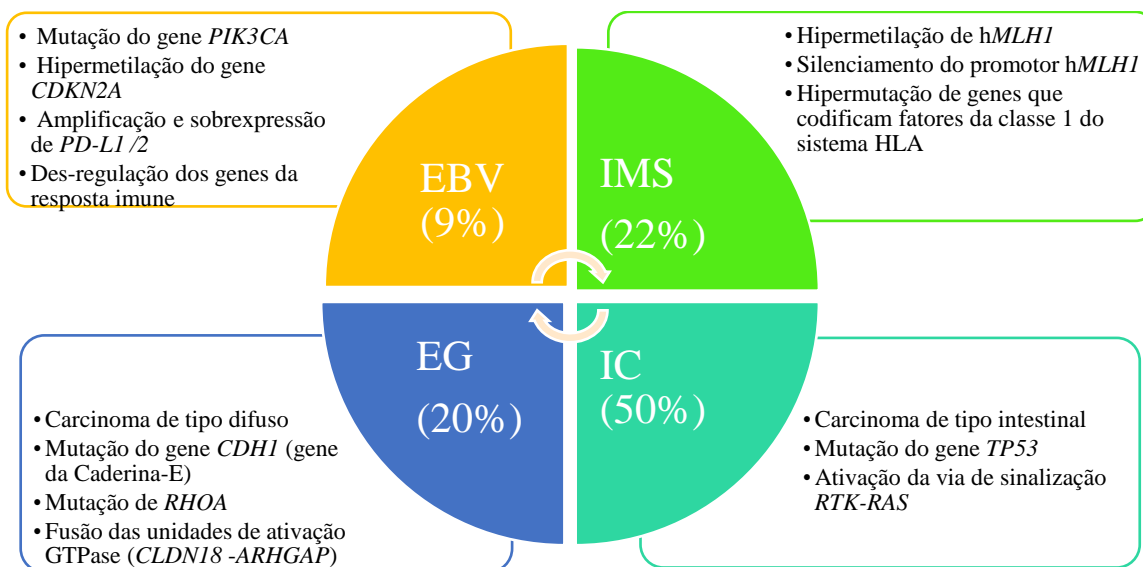


Figura 1.5- Esquema representativo da classificação molecular do CG proposta por “*The Cancer Genome Atlas*”. Este esquema descreve as principais características dos quatro sub-tipos moleculares de carcinoma gástrico. Adaptado da ref. (13). EBV-Epstein-Barr Virus; IMS-Instabilidade de microssatélites; EG- Estabilidade genómica; IC- Instabilidade cromossómica.

1.4. Características do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide (CGEL)

Em 1975, Watanabe *et al* caracterizaram pela primeira vez o carcinoma gástrico com estroma linfóide (CGEL) (Tabela 1.2) (17).

Tabela 1.2- Características do CGEL. Adaptado da ref (17).

Características do carcinoma gástrico com estroma linfóide	Aspetos macroscópicos <ul style="list-style-type: none">- Tumor bem delimitado, com um padrão de crescimento expansivo;- Umbilicação central.
	Aspetos histológicos <ul style="list-style-type: none">- Células neoplásicas dispostas em ninhos, trabéculas, e/ou (micro) glândulas;- Infiltrado denso de células linfóides no estroma (com plasmócitos e formação de folículos linfóides);- Distribuição uniforme e difusa do infiltrado linfóide.
	Taxa de sobrevida: Elevada

O CGEL, tal como os restantes CG, ocorre predominantemente em homens e localiza-se preferencialmente no estômago proximal (18). Este tipo de CG possui bom prognóstico, quando comparado com o CG sem estroma linfóide (17, 18).

Histologicamente, o CGEL caracteriza-se por apresentar estroma denso, rico em linfócitos e as células neoplásicas dispõem-se em ninhos, trabéculas e/ou (micro) glândulas (Figura 1.6) (17).

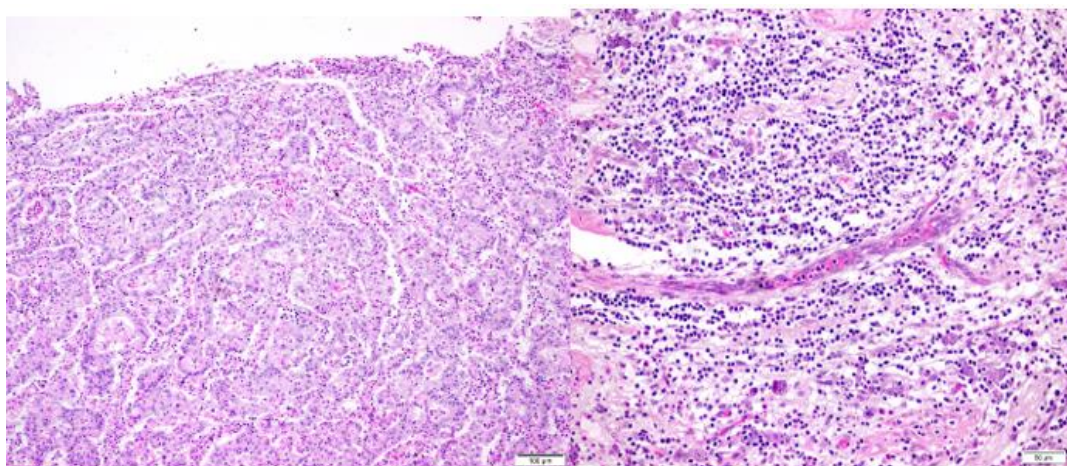


Figura 1.6- Fotografia microscópica dos CGEL. Histologicamente, identifica-se um infiltrado inflamatório abundante no estroma com a presença de estruturas tubulares e glandulares (400X).

Estes tumores são, macroscopicamente, bem delimitados, com umbilicação central e localizam-se no estômago proximal (Figura 1.7). A frequência relativa do CGEL no Japão é de 1-4% no universo do CG (17).



Figura 1.7- Fotografia macroscópica de um carcinoma gástrico com estroma linfóide. Macroscopicamente, identifica-se uma neoplasia vegetante na parede anterior da transição cárdia/corpo.

1.5.EBV

O *Epstein-Barr Virus* (EBV) é um vírus ubiquitário que pertence à família do *Herpesvírus*, afetando mais de 90% da população mundial (19). Vários estudos têm demonstrado o papel oncogênico do EBV no desenvolvimento de diversas doenças malignas, incluindo o linfoma endêmico de Burkitt, o linfopitelioma nasofaríngeo, o linfoma de Hodgkin e o carcinoma gástrico (19-22). Existem dois tipos de vírus de EBV, tipo 1 e tipo 2, que contribuem para 80% e 20% da infecção em linfomas não Hodgkin, respectivamente (23).

A infecção por EBV latente pode ser encontrada em 3 formas distintas de latências, sendo determinadas pelo padrão de expressão de genes latentes:

Em todas as fases de latência (I/II/III) são expressos: *Epstein-Barr Virus* (EBV)-*encoded small RNAs* (EBER) 1 e 2, *Epstein Barr antigen nuclear 1* (EBNA-1), *Bam -HI-A region rightward transcripts* (BARTs) e *BART*-microRNAs. Na fase de latência II são expressos- *Latent membrane protein* (LMP) -1, 2A ou 2B e na fase de latência III são expressos- EBNA-2, 3A, 3C (24).

Os diversos tumores malignos com infecção por (linfoma endêmico de Burkitt, o linfopitelioma nasofaríngeo, o linfoma de Hodgkin, entre outros) apresentam o vírus em diferentes fases de latência e com expressão de determinados genes de latentes (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 –Tipo de latência em tumores malignos associados ao EBV. Adaptado da ref. (24).

	Latência I		Latência II	Latência III
EBERs	+		+	+
EBNA-1	+		+	+
EBNA-2,3A-C, LP	-		-	+
LMP-1	-		+	+
LMP-2A, B	-		+	+
BARTs	+		+	+
BAR miRNAs	+		+	+
Malignidades associadas		Carcinoma gástrico Carcinoma Nasofaríngeo Linfoma de células NK/T	Linfoma de Hodgkin	Linfoma associado a imunodeficiência

A infecção por EBV associada ao carcinoma gástrico pertence ao tipo de latência I ou II, na qual são expressos os genes latentes: *EBER 1 e 2* e *EBNA-1*, *BARTs* e *BART*-microRNAs, (*LMP*) -1, 2A e 2B (24) (Tabela1.3). Em fases de latência I e II no cancro gástrico, o *EBER* é identificado em elevados níveis nas células individualmente infetadas, sendo possível identificar 10 milhões de cópias do vírus por célula (24). Contudo, mecanismo ação deste vírus na carcinogénese gástrica ainda não se encontra bem estabelecido (24).

Pressupõe-se que a oncogénese do CG associada ao EBV, se inicia com a infecção dos linfócitos B, através do recetor CD21, sendo que a infecção por EBV ocorre com maior eficiência nos linfócitos B do que células epiteliais gástricas. Ao estabelecer a infecção nos linfócitos B, o vírus é reativado, e tem a capacidade de infetar as células epiteliais gástricas (25).

Ao estabelecer a infecção nas células epiteliais gástricas, o vírus utiliza os mecanismos do hospedeiro para a sua manutenção, sobrevivência, proliferação e desenvolvimento tumoral (26) (Figura 1.8).

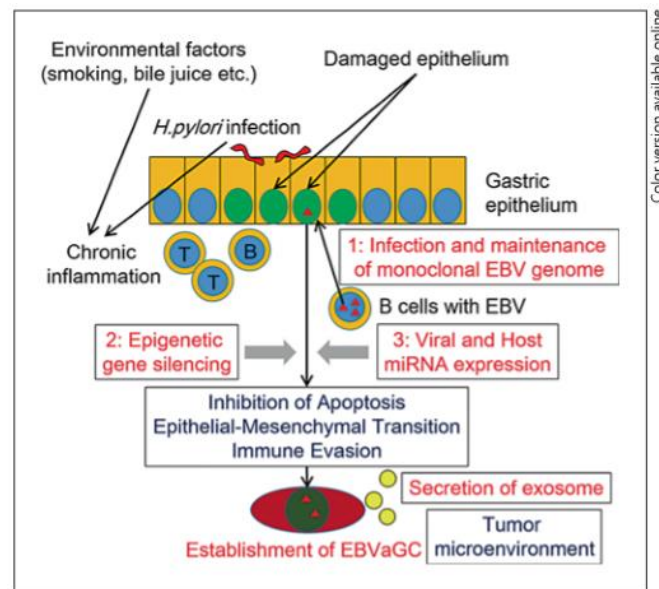


Figura 1.8- Esquema ilustrativo da oncogênese viral em CGaEBV. Adaptado da (26). A infecção por *H. pylori* e fatores ambientais induzem a uma inflamação crônica, e conseqüentemente resulta um denso infiltrado de linfócitos, incluído células B infetadas com EBV. As células B infetadas e reativadas têm a capacidade de infecta as células epiteliais do estômago. Uma vez estabelecida a infecção latente, o EBV utiliza mecanismos celulares do hospedeiro para: manutenção do genoma viral, hipermetilação do DNA do genoma viral e do hospedeiro, alteração da expressão de miRNA e secreção de exossomas, resultando no desenvolvimento e progressão do CGaEBV.

1.5.1. EBV associado ao CGEL

O EBV associado ao carcinoma gástrico representa 10% de todos dos cânceros gástricos (22, 27). A primeira evidência da infecção por EBV no carcinoma gástrico foi documentada em 1990, por Burke *et al*, com identificação de EBV pelo método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (28). Posteriormente, em 1991, Shibata *et al* identificaram sequências de EBV no interior do núcleo das células epiteliais gástricas em CGEL, através do método de Hibridização *in situ* (HIS) (29). Além disso, demonstrou-se também a presença de EBV em lesões de displasia adjacentes ao CGEL e a sua ausência na mucosa gástrica normal (29, 30).

No carcinoma gástrico associado à infecção por EBV (CGaEBV) há um crescimento monoclonal de células epiteliais do estômago infetadas por EBV (31). O CGaEBV apresenta características histológicas e clínico-patológicas semelhantes às do CGEL (32) (Tabela 1.4), o que sugere que o CGEL seja um sub-tipo especial do CGaEBV (33, 34).

Tabela 1.4 - Características Clínico-patológicas dos CGaEBV. Adaptado da ref. (24)

Características	
Incidência	Aproximadamente 10% dos carcinomas gástricos
Idade (média)	60 anos
Gênero	Masculino: feminino = 2:1
Localização	Estômago proximal (cárdia e fundo)
Características Macroscópicas	Massa ulcerada Parede gástrica com espessamento marcado Lesões múltiplas síncronos e metácronos
Características Microscópicas	Carcinoma gástrico com estroma linfóide (CGEL) Carcinoma de tipo linfoepitelial Carcinoma com Doença de Crohn com reação linfóide Infiltrado inflamatório proeminente Linfócitos, Plasmócitos, histiócitos, neutrófilos
Comportamento	Baixa taxa de metástases em gânglios linfáticos Prognóstico favorável

1.5.2. Métodos de detecção de EBV

Ao longo de várias décadas, a presença de EBV no CG tem sido detetada por PCR e HIS, sendo que ambos os métodos identificam a infecção por EBV nas células epiteliais malignas (22, 28, 35).

A principal diferença entre as duas técnicas é que o PCR identifica a presença do genoma do vírus de EBV através dos genes latentes expressos (por exemplo: *Epstein Barr antigen nuclear (EBNA-1, EBNA-2)*; *Latent membrane protein (LMPs)*; BamHI-W fragment do EBV (*BamHI-W*)), enquanto a HIS permite verificar a localização do *Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded small RNAs (EBER)* nas células neoplásicas (26, 29, 33).

1.6. Instabilidade de microssatélites (IMS)

A instabilidade de microssatélites é uma forma de instabilidade que consiste na alteração do número de sequências repetitivas simples, também designadas microssatélites, causada por uma deficiência no sistema de reparação do DNA designado por *Mismatch Repair (MMR)* (36, 37).

O sistema de reparação MMR é um dos mecanismos de reparação do DNA, responsável pelo reconhecimento e reparação de erros de emparelhamento ocorridos durante a replicação do DNA (38). Os defeitos no sistema MMR têm sido identificados na carcinogénese e na progressão tumoral de diversos cancros humanos, esporádicos e hereditários (38, 39).

A IMS foi descrita, pela primeira vez, *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)* e em alguns cancros esporádicos, tais como: carcinoma do colon, endométrio e estômago (40, 41). O fenótipo de IMS pode resultar de mutações germinativas ou da inativação epigenética de diversos genes constituintes do sistema MMR, designadamente: *hMLH1*, *MutS Homolog 2 (hMSH2)*, *MutS Homolog 6 (hMSH6)*, *PMS1 Homolog 2, Mismatch Repair System Component (PMS2)*, assim como do gene *Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM)* (42). Vários estudos demonstram que a maioria dos cancros esporádicos com o fenótipo de IMS resultam da inativação epigenética do gene *hMLH1*, através da hipermetilação do promotor (42, 43).

1.6.1. Instabilidade de microssatélites no CG

A IMS é observada em 13-44% dos carcinomas gástricos esporádicos, sendo causada pelo silenciamento epigenético do gene *hMLH1* (44, 45). Este fenómeno ocorre devido à hipermetilação do promotor do gene *hMLH1*, que se associa à perda de expressão da proteína hMLH1 e, conseqüentemente, condiciona defeito no sistema MMR (42).

Em casos raros, verifica-se a ocorrência de mutações somáticas nos genes MMR em carcinomas gástricos esporádicos (42). O CG com o fenótipo de IMS de alto grau (IMS-A) apresenta características clínico-patológicas particulares nomeadamente, maior frequência em doentes idosos, localização na porção distal do estômago, padrão de crescimento expansivo, sub-tipo histológico intestinal, abundante infiltrado linfóide, e baixa incidência de metástases ganglionares (46, 47).

O CG com IMS-A caracteriza-se ainda por ter um prognóstico favorável, mesmo em estadios avançados da doença (47, 48).

1.6.2. Métodos de deteção de instabilidade de microssatélites

A PCR é o procedimento de eleição para a deteção de IMS (40). Este método baseia-se na amplificação de regiões específicas de microssatélites, utilizando 5 marcadores mononucleotídicos quasi-monomórficos (que são pares de *primers* que identificam repetições mononucleotídicas específicas) (49). A análise destas regiões microssatélites é efetuada através da eletroforese capilar (49).

A IMS pode também ser pesquisada por estudo imuno-histoquímico através de pesquisa de expressão das proteínas codificadas pelo sistema MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) (48).

1.7. Microambiente tumoral

O processo de transformação neoplásica é complexo, nele participando também o microambiente tumoral (50). Este é composto por diversos elementos, tais como: matriz extracelular, endotélio vascular, fibroblastos e células do sistema imune. As principais funções do microambiente tumoral são: suporte estrutural que facilita o acesso dos fatores de crescimento às células neoplásicas, desenvolvimento de vascularização e modulação imunológica (50).

O infiltrado de células imunes no microambiente tumoral compreende linfócitos T, cuja função é a de reconhecer agentes exógenos e células tumorais (51). O mecanismo de reconhecimento e eliminação das células tumorais, designa-se por vigilância imunológica (52, 53).

1.7.1. Infiltrado linfocitário intratumoral (ILI) no CG

O infiltrado linfocitário intratumoral (ILI) é constituído por linfócitos T e células “natural killer” (54). Os linfócitos T citotóxicos são responsáveis pela resposta imunológica adaptativa e participam na vigilância imunológica (55). Vários estudos demonstram que neoplasias com infiltrado linfocitário intratumoral têm melhor prognóstico, nomeadamente, melanoma, carcinoma colorretal, carcinoma esofágico, carcinoma do ovário, carcinoma cervical e carcinoma urotelial (55-57).

No CG o ILI está associado a melhor prognóstico (58). Tem sido evidenciado que doentes com elevada densidade de linfócitos intratumorais de tipo CD3+ e CD8+ têm melhor sobrevida em relação aos doentes com baixa densidade destes linfócitos (58, 59). Pressupõe-se que o infiltrado linfocitário intratumoral no CG, tenha um papel muito importante em termos de vigilância imunológica e no combate à evasão das células tumorais (17, 60). Estudos demonstram que os CG em estadios iniciais apresentam maior densidade do ILI em relação aos em estadios avançados, isto devido à perda de imunogenicidade das células neoplásicas durante a progressão tumoral (61, 62). No doentes com CG, a presença de ILI tem sido significativamente correlacionada com a baixa ocorrência de metástases ganglionares, baixa recorrência da doença e elevada taxa de sobrevida (63).

No seu conjunto, a evidência existente aponta para o papel de modulação imunológica no comportamento das neoplasias e prognóstico dos doentes com CG.

1.7.2. Imuno-modulação no cancro

Um fenómeno muito importante na modulação da resposta imunológica tem sido designado como “*Immunoediting*” (64). O “*Immunoediting*” consiste num processo que envolve 3 fases: (1) fase inicial de eliminação das células neoplásicas pelo sistema imune; (2) fase de equilíbrio entre o sistema imune do hospedeiro e as células tumorais; (3) fase final em que ocorre a evasão das células neoplásicas à vigilância imunológica, através de múltiplos mecanismos imuno-inibitórios (65, 66).

Os mecanismos utilizados pelas células neoplásicas para atingirem a fase de evasão à vigilância imunológica são: perda de antígenos tumorais (redução do reconhecimento imunológico), alteração dos recetores de morte celular, perda de anticorpos ou de linfócitos T, exaustão dos linfócitos T, ativação das células T reguladoras e monócitos intratumorais, que lhes permitem escapar à morte (67).

1.7.3. Moléculas do *checkpoint* imunológico

O *checkpoint* imunológico é um processo que regula a ativação/inativação de linfócitos T e que desempenha um papel muito importante na modulação da resposta imunológica (68, 69).

A via de sinalização do *checkpoint* imunológico envolve várias moléculas da família B7, nomeadamente: *Programmed cell death protein ligand-1* (PD-L1), *Programmed cell death protein-1* (PD-1), *Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4). Estas encontram-se expressas na superfície das células, cuja função é inibir a atividade imunológica dos linfócitos T (54, 70) ou induzir a apoptose dos linfócitos T (68).

1.7.3.1. PD-1

O PD-1 (*Programmed cell death protein-1*) é um recetor co-inibitório transmembranar, pertencente à família das proteínas CD28, expresso na superfície dos linfócitos T ativados (CD4+ e CD8+), células B, células “natural killer” e monócitos ativados (71, 72). Este recetor regula negativamente as funções das células T, levando à sua inativação, quando interage com os seus ligandos PD-L1 ou PD-L2 (68).

Em condições fisiológicas, o PD-1 desempenha um papel muito importante na manutenção da homeostasia das células T e na preservação da tolerância imunológica periférica (73).

Quando ocorre algum defeito nestes recetores, podem ocorrer alterações de auto-imunidade e perturbações da vigilância imunológica (73). A expressão de PD-1 ativa a expressão do fator de transcrição Foxp3 (74). A expressão de PD-1, juntamente com a sobreexpressão de PD-L1 e da proteína Foxp3, associam-se a pior prognóstico no CG (70).

1.7.3.2. PD-L1

O PD-L1 (*Programmed cell death protein ligand-1*) (CD274 ou B7-H1) é um dos ligandos do recetor PD-1, membro da superfamília B7 das moléculas co-estimulatórias. O PD-L1 é expresso por células T, células B, células dendríticas e macrófagos, entre outros (70, 75).

A ligação de PD-L1 a PD-1 e/ou B7.1 (CD80) tem um efeito inibitório sobre os linfócitos T (68). Em condições fisiológicas, o PD-L1 é expresso pelas células endoteliais e células estaminais (do mesotélio, do coração e da placenta).

No entanto, a expressão de PD-L1 tem sido identificada em diversos tumores sólidos, nomeadamente, no carcinoma do pulmão, carcinoma da mama, glioblastoma e carcinoma pavimentoso da cabeça e do pescoço, assim como no carcinoma gástrico (76-78). Também tem sido demonstrado o papel da expressão de PD-L1 na evasão imunológica das células tumorais (78).

Nos tumores, a sobreexpressão de PD-L1 conduz à inativação das células T ativadas, particularmente os linfócitos T citotóxicos, levando à desregulação do mecanismo de resposta imune e, subsequentemente, à promoção da progressão tumoral (71, 78).

O mecanismo de evasão à vigilância imunológica consiste na interação entre o PD-1 e os seus ligandos PD-L1 e PD-L2, desencadeando um sinal inibitório sobre as células T ativadas que leva, conseqüentemente, à diminuição da produção de citocinas (ex: IFN- γ), aumento da apoptose das células T, redução da proliferação das células T efetoras, e inibição da resposta imune (Figura 1.9) (68, 79).

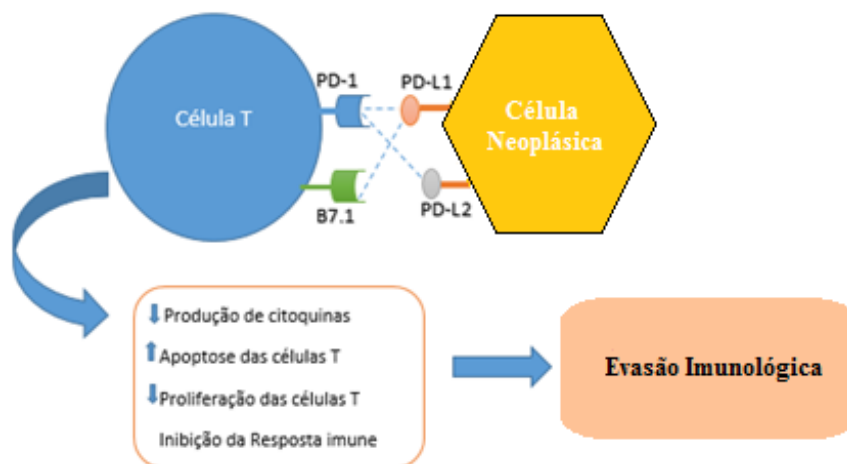


Figura 1.9- Esquema representativo do mecanismo de evasão à vigilância imunológica. Adaptado da ref. (80).

1.8. Expressão de PD-L1 no CG

A sobreexpressão de PD-L1 em células neoplásicas tem sido estudada através do perfil imunohistoquímico (81). A imunomarcagem da PD-L1 nas células neoplásicas é muito característica e localiza-se predominantemente na membrana celular (82).

A sobreexpressão de PD-L1 tem sido frequentemente observada no CG (82). Estudos recentes demonstraram que cerca de 40% dos carcinomas gástricos têm uma sobreexpressão de PD-L1 (82). Nestes casos, verifica-se expressão de PD-L1 nas células neoplásicas do CG, sendo rara nas células epiteliais gástricas normais (81, 82). Vários estudos demonstraram uma associação significativa entre a expressão do PD-L1 e a invasão tumoral, as metástases ganglionares, e o aumento do tamanho do tumor no CG (81, 83).

A maior parte dos estudos que avaliaram a expressão de PD-L1 no CG revelaram que a sobreexpressão de PD-L1 se relaciona com pior prognóstico e baixa sobrevida dos doentes (81). Não obstante, tem-se verificado expressão de PD-L1 majoritariamente nos doentes com CG em estádios II e III (81, 82). Deste modo, a sobreexpressão de PD-L1 constitui um fator prognóstico e é também um biomarcador preditivo de resposta à imunoterapia em doentes com CG em estádios avançados (81, 83). Tanto quanto é do nosso conhecimento, não há na literatura estudos de expressão de PD-L1 no CGEL.

1.9. Expressão de PD-L1 e infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) no CG

De acordo com a nova classificação molecular do CG proposta pelo TCGA, o carcinoma gástrico associado à infecção por EBV (CGaEBV), é considerado como um sub-tipo independente (13). No CGaEBV observa-se frequentemente amplificação dos genes que codificam *PD-L1* e *PD-L2* (13). A expressão de PD-L1 e PD-L2 condiciona evasão à resposta imunológica, através da ativação de um mecanismo de imunotolerância (83). Vários estudos mostraram uma forte correlação entre o CGaEBV e a expressão membranar de PD-L1 nas células neoplásicas (84-86). Assim sendo, o aumento da expressão de PD-L1 no CGaEBV sugere a possibilidade de utilização de agentes inibidores do *checkpoint* imunológico como terapia de precisão (26).

1.10. Imunoterapia - Inibidores do *checkpoint* imunológico

Recentemente, a imunoterapia tem sido utilizada como uma das armas terapêuticas no CG avançado, com resultados satisfatórios desta estratégia terapêutica, à semelhança da sua utilização noutros tumores, nomeadamente no melanoma, cancro do pulmão de não pequenas células e carcinoma renal, entre outros (87).

A imunoterapia consiste na utilização de anticorpos monoclonais, anti-PD-L1 ou anti-PD-1, também conhecidos por inibidores do *checkpoint* imunológico, com o objetivo de restaurar a atividade das células T inibidas pelo PD-L1 expresso nas células neoplásicas que, desta forma escapam à vigilância imunológica (Figura 1.10) (88).

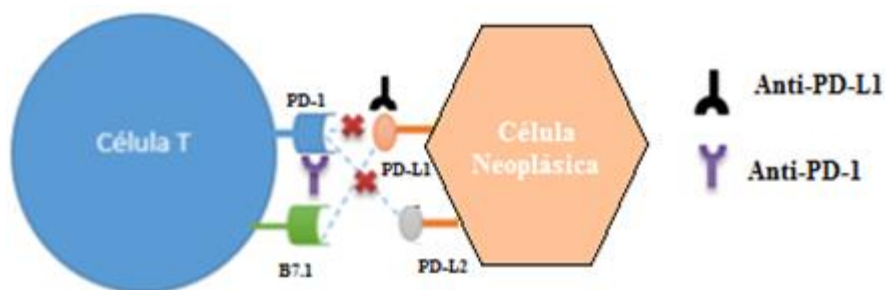


Figura 1.10- Esquema representativo do bloqueio do mecanismo de *checkpoint* imunológico, através da utilização de anticorpos anti-PD-L1 e anti-PD-1. Adaptado das ref. (88, 89).

Os inibidores *checkpoint* imunológico mais conhecidos são os anticorpos monoclonais anti-PD-L1 (MPDL3280A, MEDI4736), anti-CTLA-4 (Ipilimumab) e anti-PD-1 (Nivolumab/Pembrolizumab), que aumentam a resposta imunológica adaptativa, através da reabilitação da função das células T citotóxicas efetoras (88, 90). Na Tabela 1.5 apresentam-se alguns inibidores *checkpoint* imunológico que têm sido utilizados em ensaios clínicos em doentes com CG avançado.

Tabela 1.5- Inibidores do *checkpoint* imunológico utilizados em ensaios clínicos nos doentes com CG avançado. Adaptado das ref. (52, 61, 88).

Nome dos inibidores do <i>checkpoint</i> imunológico	Alvo terapêutico	Descrição do anticorpo	Fase de ensaio clínico
Nivolumab	PD-1	Anticorpo monoclonal totalmente humanizado IgG4	III
Pidilizumab		Anticorpo monoclonal humanizado IgG1	II
Pembrolizumab		Anticorpo monoclonal humanizado IgG4	I
AMP-224		Proteína de Fusão B7-DC/IgG1	I
BMS-936559	PD-L1	Anticorpo monoclonal totalmente humanizado IgG4	I
MPDL3280A		Anticorpo monoclonal humanizado IgG1	I
MEDI4736		Anticorpo monoclonal humanizado IgG1	I
Ipilimumab	CTLA-4	Anticorpo monoclonal humanizado	II

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais e específicos

O objetivo geral do presente estudo foi caracterizar o carcinoma gástrico com estroma linfóide (CGEL), com ênfase no perfil clínico-patológico e molecular para melhor esclarecimento da patogénese deste tipo de cancro do estômago.

Constituíram objetivos específicos os seguintes:

- ✓ Analisar as características clínico-patológicas;
- ✓ Analisar as características morfológicas do CGEL;
- ✓ Caracterizar o microambiente tumoral do CGEL
- ✓ Analisar a associação entre infecção por EBV, IMS e a expressão de PD-L1;
- ✓ Comparar as técnicas de deteção da infecção por EBV: PCR e HIS;
- ✓ Analisar a co-localização de PD-L1 e de uma pan-citoqueratina (AE1/AE3) em células neoplásicas e a expressão de PD-L1 em células do microambiente tumoral;
- ✓ Comparar a expressão de linfócitos T de tipo CD8⁺ e CD3⁺ no centro e na periferia do tumor.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras

Para este estudo foram utilizadas amostras de 24 casos de carcinoma gástrico com estroma linfóide, subsequentemente classificados, de acordo com a classificação da OMS (1) e a classificação de Lauren (9). As amostras (fixadas em formol e incluídas em parafina) foram selecionadas, retrospectivamente, do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica, do Centro Hospitalar de São João, no período de 2003-2011. Foram avaliadas as seguintes características clínico-patológicas: idade; género; localização do tumor; tipo de cirurgia realizada; sobrevida dos doentes; estadió pTNM, descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Características clínico-patológicas dos doentes com CGEL

Características	N
‣ Idade de diagnóstico	
<65 Anos	9
>65 Anos	15
‣ Género	
Masculino	17
Feminino	7
‣ Localização	
Terço inferior	9
Terço médio/superior	15
‣ Tipos de cirurgias realizadas	
Gastrectomia distal	8
Gastrectomia total	16
‣ Sobrevida do doente (meses)	67,1 ± 41,5
‣ Estádios pTNM	
IA e IB	6
IIA e IIB	12
IIIA e IIIB	5
IV	1

3.2. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

O diagnóstico histopatológico de CGEL foi realizado através da avaliação morfológica dos tecidos previamente corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Esta técnica permite evidenciar os principais elementos tecidulares, núcleo, citoplasma e colagénio e as alterações morfológicas subjacentes.

A técnica foi realizada em seções de tecido parafinado de 3 µm, utilizando a Hematoxilina de Gill, um corante nuclear básico, que cora os núcleos das células de azul, pelo método progressivo, e a Eosina, um corante citoplasmático ácido, que cora o citoplasma em rosa, pelo método regressivo. A sobrecoloração do citoplasma pelo método regressivo é retirada através de um diferenciador, o etanol absoluto.

3.3. Imuno-histoquímica (IHQ)

A imuno-histoquímica é uma técnica que abrange diversos métodos, na qual utiliza anticorpos dirigidos a um determinado antigénio, também conhecido por constituintes celulares ou tecidulares de interesse, e um sistema de deteção que permite identificar a interação antigénio-anticorpo (91). A técnica de IHQ tem uma potencialidade no auxílio ao diagnóstico, prognóstico e preditivo das doenças neoplásicas, doenças infecciosas e degenerativas (91).

Existem dois métodos básicos de IHQ, o método direto e o método indireto de acordo com a Figura 3.1. O método direto baseia-se na utilização de um anticorpo primário conjugado diretamente com um marcador (fluorocromo ou enzima). O método indireto utiliza dois ou mais passos, onde o anticorpo primário dirigido ao antigénio de interesse é reconhecido por anticorpos secundários, que amplificam o sinal. A utilização dos anticorpos secundários depende do método utilizado para deteção do anticorpo alvo, por exemplo: método imunoenzimático (peroxidase-anti-peroxidase, fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina), método avidina-biotina, e os métodos do polímero (EPOS- *Enhancer Polymer one Step Staining* e Envision- *Dextran Polymer conjugate Two step visualization System*) (91).

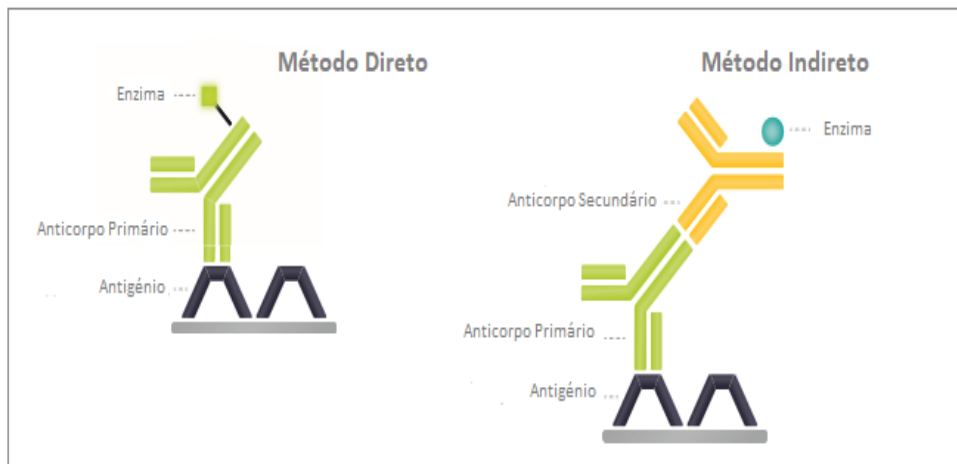


Figura 3.1- Esquema dos dois sistemas de IHQ: Método Direto – É realizado em apenas uma etapa, em que o anticorpo primário (verde) está ligado a uma enzima ou fluorocromo; Método Indireto- é realizado em duas etapas, sendo utilizado um anticorpo secundário ligado a uma enzima para reconhecer o anticorpo primário ligado ao antígeno do tecido. Adaptado da ref. (92).

O método do polímero, indireto de dois passos (Envision, DAKO), baseia-se na utilização de uma macromolécula sintética, o polímero de dextrano, conjugado com vários anticorpos secundários e enzimas (peroxidases *horseradish* (HRP)) que se ligam ao anticorpo primário dirigido ao antígeno, aumentando a amplificação de sinal (Figura 3.2). Cada cadeia de dextrano possui aproximadamente 70 moléculas de enzima (HRP) e 10 moléculas de anticorpos secundários acoplados (92).

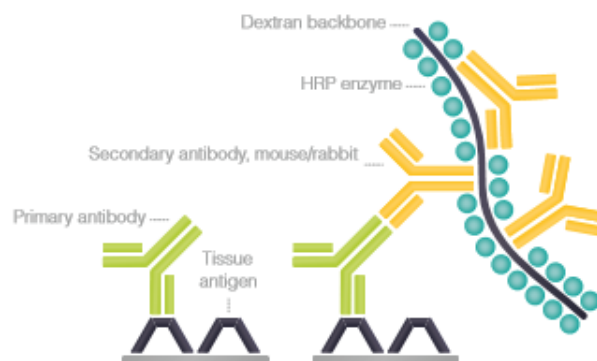


Figura 3.2- Polímero dextrano acoplado com vários anticorpos secundários e enzimas (Peroxidases HRP). Adaptado da ref. (92).

A técnica de imuno-histoquímica pode ser realizada manualmente ou em sistemas automáticos que se encontram disponíveis no mercado, por exemplo: o Cadenza da Shandon, Dako Techmate, LabVision Autostainer, Ventana Nexes, Ventana Ultra e Leica Bond III. Atualmente os sistemas automáticos aplicam tecnologias de alta gama, permitindo padronizar a qualidade da imunomarcação através da realização da desparafinação, hidratação e recuperação antigénica no interior da plataforma. Atualmente, os equipamentos que se destacam e que se encontram disponíveis em diversos laboratórios são: o Ventana Ultra e o Leica Bond III (91).

Em qualquer técnica IHQ é importante utilizar controlos tecidulares positivos e negativos de forma a garantir a sensibilidade e especificidade da mesma, devido à eventuais marcações inespecíficas e reações cruzadas que podem ocorrer (91) .

3.3.1. Imuno-histoquímica realizado em sistema automático (Ventana Ultra)

O sistema BenchMark ULTRA (Figura 3.3), é um equipamento de coloração automático, que permite realizar vários protocolos de diversas técnicas em simultâneo, tais como IHQ, Hibridização *in situ* (HIS), e técnicas de imunofluorescência. O sistema está válido para as diversas técnicas e tem demonstrado resultados reprodutíveis e um controlo de qualidade eficaz no auxílio ao diagnóstico de doenças neoplásicas. Além disso, a implementação deste sistema no laboratório, permite maior flexibilidade laboral, rentabiliza o tempo dos utilizadores e melhora o fluxo de trabalho.

O equipamento é composto por 30 gavetas de lâminas, que funcionam de forma independente, e na parte superior interna apresenta um suporte que tem a capacidade para 35 reagentes, sendo possível processar 60 lâminas em 8 horas e/ou 90 lâminas com uma corrida durante a noite. A parte inferior do equipamento é composta por 8 reservatórios de reagentes volumosos e 2 reservatórios de resíduos (Figura 3.3).



Figura 3.3 - Equipamento BenchMark ULTRA (Ventana).

3.3.2. Protocolo Imuno-histoquímico

A IHQ foi realizada em secções de tecido parafinado de 3 μ m de espessura, aderidos em lâminas adesivadas *superfrost*TM. A técnica foi realizada em todas as 24 amostras. Em todas as lâminas, assim como para todos os anticorpos estudados, foram utilizados controlo positivos, aderidos na mesma lâmina, designadamente: placenta para o PD-L1, amígdala para CD3 e CD8 e fêo para AE1/AE3. Antes do processamento no equipamento, as secções de tecido foram colocadas na estufa durante 1h, a 60°C, para melhor adesão do corte a lâmina.

O estudo imuno-histoquímico foi utilizado para avaliar a expressão de:

- 1) AE1/AE3: uma pan-citoqueratina que permite identificar as células epiteliais tumorais;
- 2) CD3 e CD8: marcadores de linfócitos T presentes no infiltrado linfocitário intra e peritumoral;
- 3) PD-L1: avaliado nas células epiteliais neoplásicas e nas células imunes do microambiente tumoral.

As secções de tecido foram processadas no equipamento automático de coloração BenchMark ULTRA System (Ventana Medical Systems), usando os anticorpos Anti- AE1/AE3, Anti-PD-L1, Anti-CD8 e Anti-CD3, com os respetivos protocolos (Anexos 9.1, 9.2, 9.3, 9.4). Cada anticorpo foi otimizado de acordo com as respetivas brochuras, e teve-se em conta os seguintes parâmetros: o tipo, o tempo e a temperatura de recuperação antigénica, a diluição do anticorpo, o tempo de incubação com o anticorpo e o tempo de exposição ao kit de amplificação, para o caso do anti-PD-L1, que se encontram descritos detalhadamente na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Anticorpos primários e condições otimizadas da IHQ utilizada neste estudo

Anticorpo Primários	Clones	Recuperação Antigénica	Diluições	Tempo de Incubação	Tipo de marcação	Controlo Positivo	Origem dos Anticorpos
Anti-AE1/AE3	PCK-26	Protease 3 4 min; CC1: 4 min a 100°C	Pré-diluído	8 min	Citoplasmática	Óleo	Ventana, Roche
Anti-PD-L1	E1L3N	CC1 - 64 min a 100°C	1:1000	32 min	Membranar	Placenta	Cell Signaling
Anti-CD8	SP57	CC1- 56 min a 100°C	Pré-diluído	24 min	Membranar	Amígdala	Ventana, Roche
Anti-CD3	SP7	CC1- 32 min a 100°C	1:150	23 min	Citoplasmática e membranar	Amígdala	NeoMarker

No equipamento BenchMark ULTRA, cada lâmina foi processada individualmente, começando pelo aquecimento das lâminas até 72°C, seguido de desparafinação com a solução tampão EZprep (Ventana), que é uma solução desparafinante e de lavagem, com pH 7, utilizado para remover a parafina das lâminas. O LCS é um óleo que tem como função evitar a evaporação dos reagentes e manter a lâmina sempre húmida em todas as fases do processamento, sendo designada lamela líquida.

De seguida, procedeu-se à recuperação antigénica (RA) utilizando a solução tampão *Cell Conditional 1* (CC1), constituído por Tris/Borato e *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA), com pH 8,4, cuja função é remover as pontes metilénicas estabelecidas entre o formol e os epítomos do antigénio, de forma a “desmascarar” os epítomos para maior interação com os anticorpos. A RA com a solução tampão CC1 só resultada em condições de altas temperaturas.

Para a maioria dos anticorpos foi realizada uma RA por aquecimento com a solução tampão CC1 a 100°C, tendo em conta os respetivos tempos otimizados (Tabela 3.2). Exceto o anticorpo pan-citoqueratina (AE1/AE3), que requer a combinação da recuperação por aquecimento e a digestão enzimática com uma enzima. A digestão enzimática foi realizada com a protéase 3, uma enzima endopeptídase, que atua a 37°C, cuja função é clivar as proteínas e “desmascarar” os epítomos do antigénio na secção de tecido.

Posteriormente, as secções de tecido foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena. A peroxidase endógena é encontrada em diversos tecidos, nomeadamente: glóbulos vermelhos, baço, rim, fígado, medula óssea e em áreas de necrose, sendo necessário realizar a inibição destes. A inibição da peroxidase endógena foi realizada com uma solução comercial de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 0,04% em solução tampão de fosfato (Ventana), que por excesso leva à saturação da atividade enzimática.

Seguidamente, as secções de tecidos foram incubadas com o anticorpo primário respetivo, nas condições de otimização adequadas (Tabela 3.2). O anticorpo anti-AE1/AE3 (clone PCK-26) foi incubado durante 8 minutos, o anti-PD-L1 (clone E1L3N) durante 32 minutos, o Anti-CD8 (SP57) durante 24 minutos e por último o anti-CD3 (SP7) durante 23 minutos.

Posteriormente, foram feitas lavagens com o tampão *reaction buffer* (Ventana), uma solução tampão de lavagem, com pH 7,6, utilizado para as lavagens entre as diversas etapas do processamento.

Seguidamente, as secções de tecido foram incubadas com o Kit de deteção *Optiview Universal Diaminobenzidine Tetrahydrochloride* (DAB) (Ventana). O kit de deteção *Optiview Universal DAB* (Ventana) é um kit da geração do multimer que utiliza um conjunto de moléculas sintéticas, para detetar a interação antigénio-anticorpo. Este sistema é composto por 6 reagentes: *optiview peroxidase inhibitor*, *optiview HQ universal linker*, *optiview HRP multimer*, *optiview H₂O₂* e o *optiview Copper* (93).

O kit utiliza, primeiramente, o *optiview HQ universal linker*, um cocktail de anticorpos secundários (anti-rato e anti-coelho) conjugado com haptenos sintéticos, que estabelece ligação com o anticorpo primário previamente ligado ao antígeno. Seguidamente, é utilizado o *optiview HRP multimer*, um anticorpo terciário, também designado multímero, conjugado com uma enzima peroxidase HRP que reconhece o anticorpo secundário através dos haptenos. As enzimas HRP acoplados ao multímero reagem com o substrato peróxido de hidrogénio (*optiview H₂O₂*), e com o *optiview Copper*, oxidam o cromogénio *optiview DAB*, dando origem a um precipitado de cor castanha (Figura 3.4) (93).

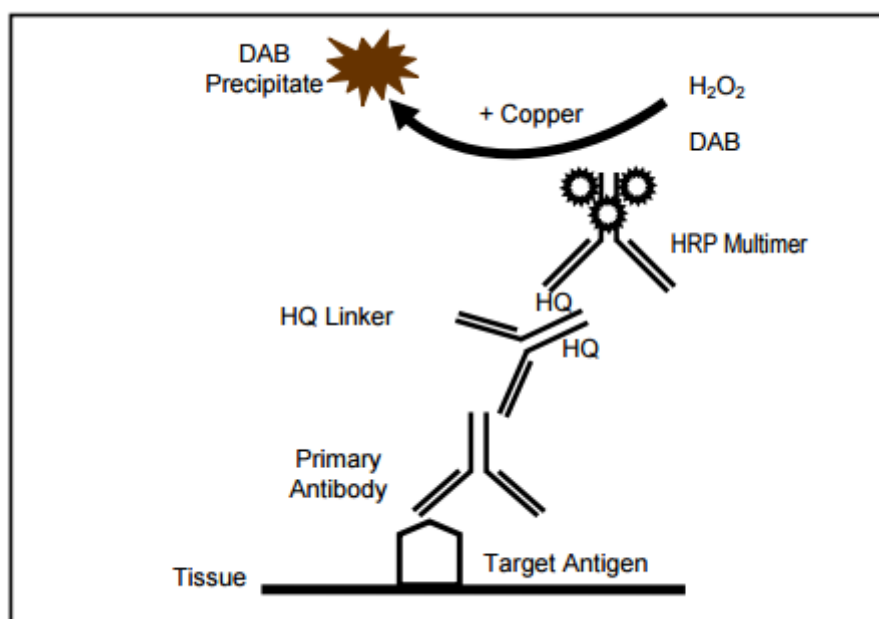


Figura 3.4- Kit de detecção *Optiview DAB*. Adaptado da ref. (93).

No caso do anticorpo PD-L1, foi realizada uma etapa adicional com um kit de amplificação (Ventana, Roche), de forma a amplificar o sinal da marcação. O kit de amplificação é um sistema que permite aumentar a intensidade da marcação, através da adição de haptenos sintéticos não endógenos e multímeros que se ligam ao anticorpo primário, levando consequentemente a sensibilidade necessária para visualizar os antígenos com quantidades mínimas de expressão. O kit é constituído por 2 soluções *Amplifier A (Rabbit -Mouse)* e o *Amplifier B (Mouse-Rabbit)*.

A solução *Amplifier A* é composta por haptenos sintéticos, que reagem com as enzimas HRP e o H_2O_2 no local de interesse. A solução *Amplifier B*, é composta por multímeros que se ligam

aos haptenos, aumentando o sinal da marcação. A Figura 3.5 demonstra como o kit de amplificação funciona juntamente com o kit de detecção *optiview* DAB.

As secções de tecido foram incubadas com o durante 8 minutos para cada um dos reagentes do kit de amplificação.

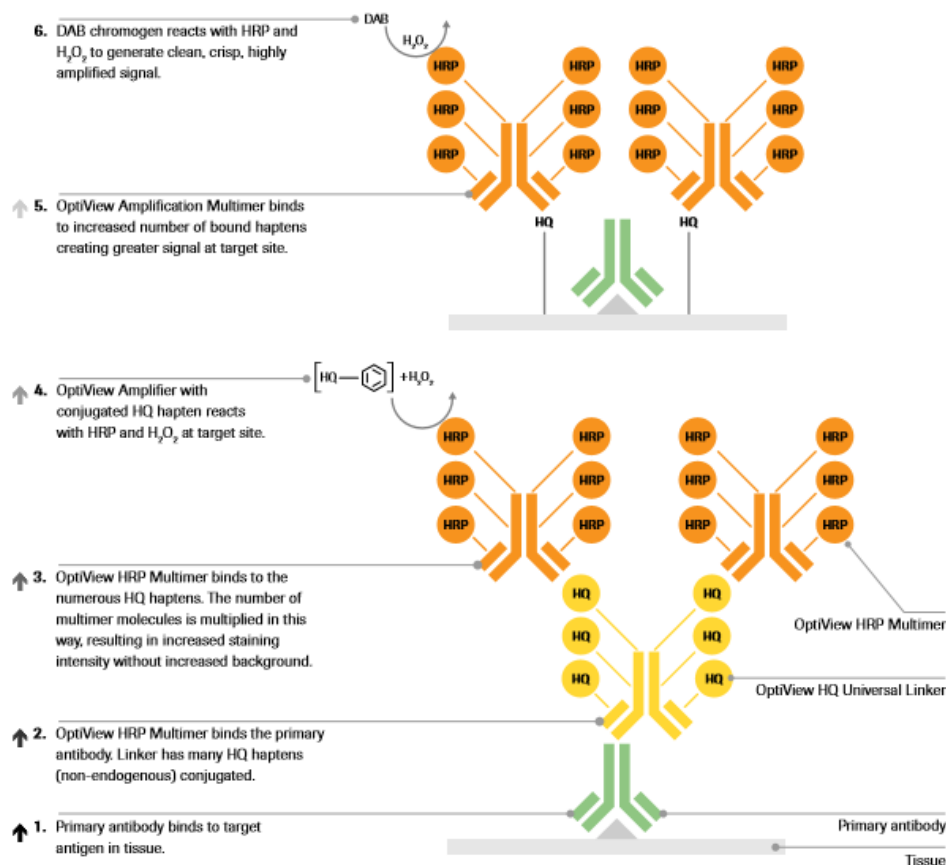


Figura 3.5- Esquema representativo do kit de detecção *optiview* juntamente com o kit de amplificação. Adaptado da ref (93).

Posteriormente, as secções de tecido foram contrastadas com Hematoxilina e *Bluing Reagent* (Ventana, Roche). A hematoxilina é um corante nuclear básico que, cora os núcleos das células, permitindo visualizar sua morfologia. O *bluing reagent* é uma solução alcalina que permite intensificar o contraste nuclear, tornando os núcleos mais azulados. Por fim, as secções de tecido foram desidratadas com concentrações decrescente de etanóis (70%,95%,100%), diafanizadas em xilol e montadas com resina (*Entellan*) e lamela.

3.4. Imunofluorescência (IF) – Dupla marcação

A imunofluorescência é uma técnica de IHQ que utiliza sistemas de detecção com compostos fluorescentes para visualização do antigénio. Esta técnica tem por requisito a utilização de um microscópio apropriado para a visualização das marcações, com vários filtros de emissão de luz no campo dos ultravioletas (480-590 nm). Os fluorocromos mais utilizados nas técnicas de imunofluorescência são a fluoresceína, rodamina, *fast red* (91).

Neste estudo a IF com dupla marcação foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão diferencial de PD-L1 nas células neoplásicas e em macrófagos, utilizando secções de tecido parafinado de 3µm de espessura. A primeira parte do protocolo foi realizada automaticamente no equipamento BenchMark ULTRA englobando, desparafinação, recuperação antigénica com a solução tampão CC1 a 100°C durante 64 min e bloqueio da peroxidase endógena (Anexo 9.5). As etapas seguintes foram realizadas manualmente.

Posteriormente, efetuou-se uma lavagem de 5 minutos em água corrente e duas lavagens em *phosphate buffer solution* (PBS) com *Tween* a 0,02%. Procedeu-se à delimitação da secção de tecido na lâmina com uma caneta hidrofóbica e incubação com uma solução composta por Negro de Sudão a 0,1% em etanol a 70%, para minimizar a autofluorescência do tecido e o fundo inespecífico. Depois, procedeu-se à incubação com uma solução comercial de bloqueio das marcações não específicas (*UltraVisionProteinBlock*, *ThermoScientific*), durante 30min, à temperatura ambiente. Em seguida, as secções de tecido foram incubadas com o anticorpo primário, com as diluições indicadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3- Anticorpos primários e anticorpos secundários conjugados com corante fluorescente

Anticorpos primários	Clones	Diluições dos Atc primários	Tempo de Incubação e Temperatura	Anticorpos secundários + Alexa Fluorocromo conjugado	Diluições dos Atc secundários	Tempo de Incubação e Temperatura	Origem dos Anticorpos primários
Anti-PD-L1	E1L3N Rabbit	1:1000	Durante a noite a 4°C	Donkey anti-rabbit biotilado + Streptavidina conjugada com Alexa 555	1:250 1:500	1h a TA 20min	Cell Signaling
Anti-AE1/AE3	PCK26 Mouse	Pré-diluído	10 min	Donkey anti-mouse conjugado com Alexa 647	1:200	1h a TA	Ventana, Roche
Anti-CD68	PG-M1 Mouse	1:100	Durante a noite a 4°C				Dako

Atc- Anticorpo; TA- Temperatura Ambiente

Para efetuar a marcação dupla PD-L1/CD68, os casos selecionados (n=3) foram incubados simultaneamente com ambos os anticorpos durante a noite a 4°C. No caso da marcação dupla PD-L1/AE1/AE3 os 3 casos foram incubados apenas com o anticorpo anti-PD-L1 nas condições referidas anteriormente. No dia seguinte, após uma lavagem de 5 minutos com PBS com *Tween* a 0,02%, as lâminas foram incubadas com anticorpo AE1/AE3 durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

Posteriormente foram feitas três lavagens com PBS com *Tween* a 0,02%, em todas as lâminas, para remover as ligações inespecíficas dos anticorpos. As secções foram depois incubadas com dois anticorpos secundários simultaneamente: “donkey anti-rabbit” biotilado (*LifeTechnologies, USA*), e “donkey anti-mouse” (*Invitrogen, USA*) conjugado com um corante fluorescente, “Alexa Flour 647”, durante 1 hora em câmara escura.

A partir desta etapa, as secções de tecido foram mantidas sempre no escuro, de forma a evitar a autofluorescência e reações cruzadas com o fluorcromos. De seguida, foram feitas 3 lavagens com PBS com *Tween* a 0,02% após as quais se incubou a Streptavidina conjugada com um corante fluorescente “Alexa Fluor 555” durante 20 minutos. Esta solução liga-se ao anticorpo secundário biotilado, amplificando dessa forma o sinal do PD-L1. Seguidamente foram feitas 6 lavagens com PBS com *Tween* a 0,02%. O contraste dos núcleos foi efetuado com o *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI), um corante nuclear e cromossómico, que estabelece ligação as regiões AT do DNA e emite uma fluorescência azul. O corante DAPI vem acoplado ao meio de montagem de imunofluorescência, o *Vectashied*.

Por último, as lâminas foram seladas com verniz e conservadas a 20°C. Finalmente, as lâminas foram avaliadas utilizando o microscópio *Zeiss Axiolmager Z1* (Carl Zeiss MicroImaging).

Em todas as experiências foram utilizados controlos positivos (secção de placenta) e negativos. Os controlos negativos foram incubados com o diluente do anticorpo primário durante a noite, com omissão do anticorpo primário, e com os anticorpos secundários. Enquanto, os controlos positivos foram submetidos a todas as etapas do protocolo, incluindo a incubação com o anticorpo primário.

3.5. Extração de DNA

Os 24 casos foram submetidos a extração de DNA, realizada em secções de tecido de 10µm de espessura, obtidas de fragmentos fixados em formol e incluídos em parafina. Em cada amostra foi feita a dissecação da área representativa das células neoplásicas, previamente delimitada pelo Patologista em secções de tecidos coradas por Hematoxilina e Eosina. O DNA extraído foi coletado para um microtubo, adicionou-se 400 µl de tampão de lise celular e 20 µl de proteinase K. Em seguida, as amostras foram incubadas numa estufa com agitação durante a noite a 56°C. Posteriormente foi feita a inativação da proteinase K a alta temperatura, durante 15 minutos e a centrifugação das amostras a 1300rpm durante 2 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para um tubo coletor, previamente identificado, e procedeu-se à purificação do DNA, no Magcore HF16 Automated DNA/RNA Purification System, utilizando um kit de purificação apropriado.

De seguida, o DNA purificado de cada amostra foi quantificado no NanoDrop 2000 e conservado a -20°C. O DNA extraído foi utilizado para o estudo de instabilidade de microssatélites e para a deteção de EBV pelo método de PCR.

3.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma técnica de biologia molecular utilizada para amplificar um ou mais fragmentos de DNA específico do complexo genoma humano. A técnica é simples, e permite gerar vários números de cópias de um segmento de DNA de interesse. Esta técnica tem diversas aplicabilidades deste de: sequenciação, estudo de mutações, clonagem, genotipagem, diagnóstico de doenças, deteção de patogénese e medicina forense (94, 95).

O princípio da reação baseia-se em 3 etapas principais (Figura 3.6):

- 1º. Etapa- **Desnaturação**, as cadeias de DNA são desnaturadas a 95°C
- 2º. Etapa- **Anneling**, consiste na hibridização dos *primers* em cada uma das cadeias moldes (50-60°C).
- 3º. Etapa- **Extensão**, processo de síntese das novas cadeias pelo Taq DNA polimerase (72°C).

A reação de PCR requiere os seguintes componentes: um tampão- para manter o pH da reação e MgCl₂, DNA molde, desoxinucleótidos- (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) em proporções iguais para a construção da cadeia nascente, *primers* (iniciadores)- sequência de cadeia simples complementar a cadeia mãe de DNA que vai ser copiada, e o DNA polimerase *Thermus aquaticus* (Taq), enzima termoestável capaz de inserir desoxinucleótidos à cadeia complementar que está a ser sintetizada (94, 95).

A reação de PCR, envolvendo as 3 etapas principais (desnaturação, *annealing* e extensão), ocorre em ciclo, sendo possível aumentar, em cada ciclo, 2 vezes a concentração de DNA pré-existentes. Consoante o número de ciclos estabelecidos, a amplificação torna-se exponencial (94, 95).

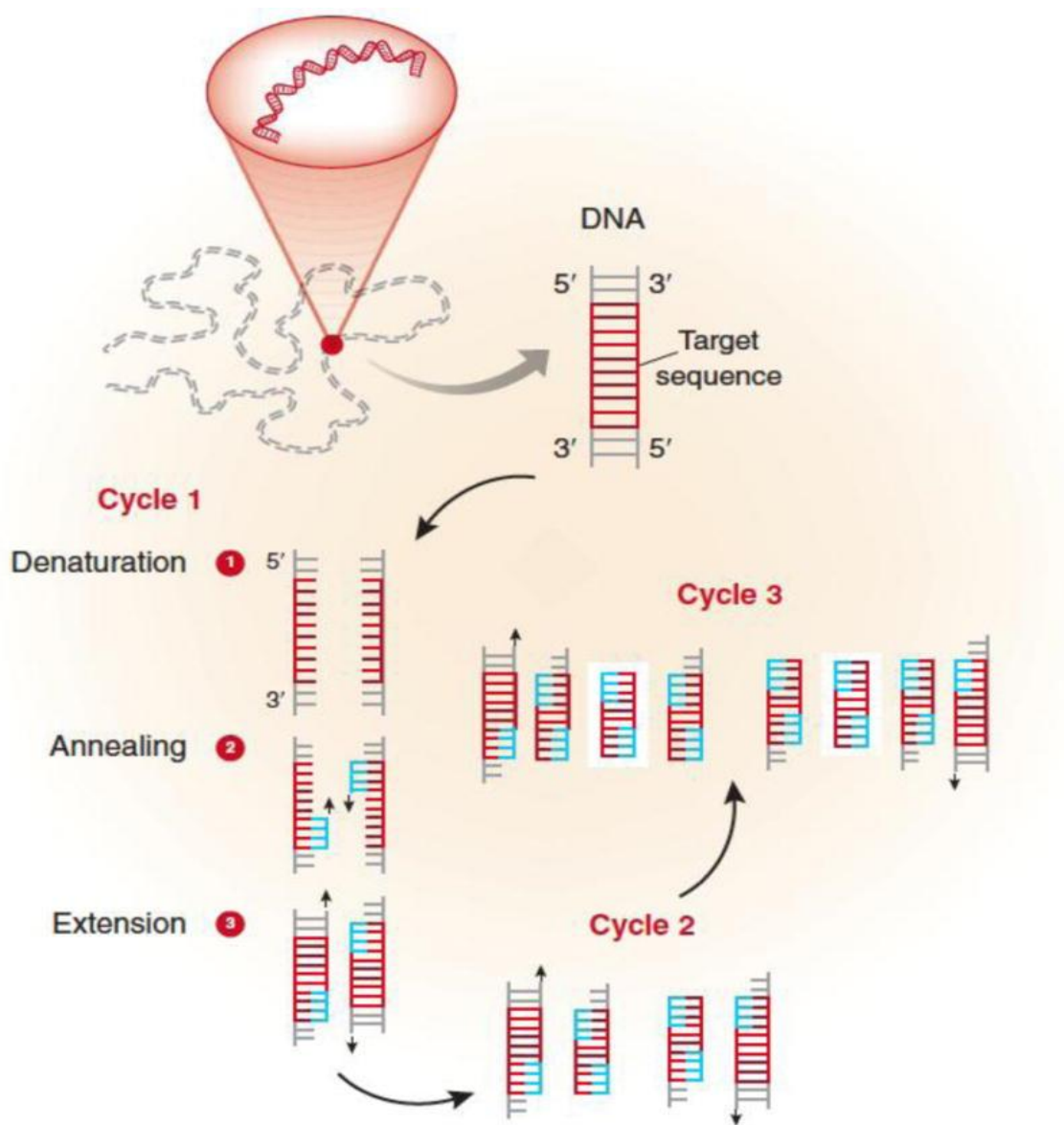


Figura 3.6- Esquema ilustrativo das 3 etapas principais da reação de PCR. Adaptado da ref.(96).

Existem varias variantes (adaptações e modificações) da técnica básica de PCR nomeadamente: RT-PCR, PCR multiplex, *Nested* PCR (96).

3.7. Instabilidade de microssatélites (IMS)

Neste estudo, a pesquisa de instabilidade de microssatélites foi realizada através da técnica de PCR multiplex, utilizando um painel de 5 marcadores mononucleotídicos. Este estudo foi realizado no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP).

A técnica de PCR multiplex é uma variante do PCR clássico, que se baseia na utilização de múltiplos pares de *primers* em simultâneo numa única reação de PCR para identificar estirpes de patogénicos ou patogénicos isolados (Figura 3.7). Esta técnica permite produzir vários produtos amplificados da sequência de DNA específico de diferentes tamanhos. As vantagens desta técnica são: permite detetar vários patogénicos em simultâneo num único ensaio, tem um custo-efetivo baixo e consome pouco tempo na sua execução (95).



Figura 3.7- No PCR multiplex, são utilizados múltiplos pares de *primers*, para amplificar múltiplos alvos de interesse, numa única reação de PCR. Adaptado da ref.(97).

A pesquisa de IMS foi realizada no DNA extraído de secções de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, de acordo com o protocolo previamente descrito.

Inicialmente foi feita a amplificação específica das regiões de microssatélites, utilizando um painel de 5 marcadores mononucleotídeos quasimonomórficos (BAT25, BAT26, NR-24, NR-21, NR-27) e o protocolo de amplificação dos *loci* de microssatélites (Multiplex PCR; Qiagen, studio City, California).

Estes marcadores são pares de *primers* que identificam regiões de repetições mononucleotídicas específicas, numa única reação de PCR e têm acoplado em cada *primer* anti-sense um marcador fluorescente, tal como descrito na Tabela 3.4.

Tabela 3.4- Sequências de *primers* para análise de IMS.

Nome	Genes	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do produto (bp)	Marcadores fluorescentes
BAT-25	<i>c-KIT</i>	F: TACCAGGTGCGAAAGGCGA R: TCTCGATTTTAACTATGCGTC	153	NED (Preto)
BAT-26	<i>hMSH2</i>	F: CTCGGGTAATCAAGTTTTTAG R: AACCATTC AACATTTTAAACCC	183	6-FAM (Azul)
NR-24	“Zinc finger 2”	F: CGTGAATTTTACCTCCTGAC R: ATTGTCGCATTTCGATTCCAA	131	HEX (Verde)
NR-21	<i>SLC7A8</i>	F: GAGTCCGTGCGACAGTTCTA R: CTGGTCACTCCGGTTTACAA	109	6-FAM (Azul)
NR-27	<i>Inhibitors of apoptosis proteins-1</i>	F: AACCATCGTTCGAAACCACT R: CGATAATACTACGAATGACC	87	NED (Preto)

F- forward; R- reverse

Para a reação de PCR multiplex, foi preparado um tubo de PCR com um volume de 5 µl de solução de reação para cada amostra, contendo 2,5µl de Master Mix (Qiagen), 1,1 µl de água livre de RNase e DNase, 0,4 µl dos *primers* dos 5 marcadores de microssatélites e 1 µl do DNA purificado de cada amostra.

Posteriormente, os tubos de PCR foram colocados no termociclador (T100™ Thermal Cycler, USA) e submetidos às seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, *annealing* a 55°C durante 1m30s e extensão a 72°C durante 1 minuto. No final dos 35 ciclos, ocorreu uma etapa de extensão a 60°C durante 20 minutos.

Após amplificação, foram adicionados 13µl de uma mistura de formamida-Rox (numa proporção de 120:5), a 1,2 µl do produto de PCR de cada amostra. A formamida foi utilizada para desnaturar as cadeias de DNA, mantendo-as alinhadas em cadeia simples e o ROX foi utilizado como marcador fluorescente (vermelho) de peso molecular.

Por último, o perfil alélico dos 5 marcadores foi analisado através de eletroforese capilar, usando o sequenciador automático de DNA (ABI PRISM, 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) de acordo com o protocolo estabelecido.

As amostras foram classificadas como IMS-alto grau (IMS-A), quando identificados 2 ou mais marcadores “mutados” ou com picos extras, IMS-baixo grau, quando apenas um marcador se apresentava “mutado” e *Microsatellite stable* (MSS) na ausência de marcadores “mutados” ou ausência de picos extras (49).

3.8. Nested PCR

O *Nested PCR* é uma variante do PCR clássico, que consiste na realização de dois PCR consecutivos, para a obtenção de um produto com maior especificidade. Neste método baseia-se na utilização de dois pares de *primers*, um 1º par de *primers* externo, que flanqueia a região do DNA de interesse, e um 2º par de *primers* interno, que amplifica a região precisa que se pretende amplificar. Na 1ª reação de PCR utiliza-se o 1º par de *primers* externo, enquanto, na 2ª reação de PCR utiliza-se o 2º par de *primers* interno, e o produto do 1º PCR serve como DNA molde para a síntese do 2º produto (Figura 3.8).

O método de *Nested PCR* permite aumentar a sensibilidade e a especificidade do produto amplificado. Além disso, é utilizado para confirmar a integridade do produto do 2º PCR (95).

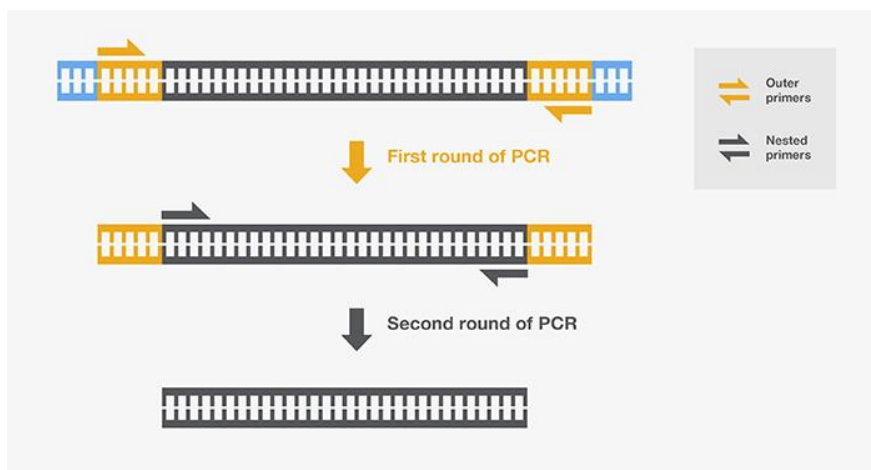


Figura 3.8- Esquema demonstrativo do princípio básico do *Nested PCR*. Adaptado da ref. (97).

3.8.1. *Nested PCR* para detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV)

A detecção da presença de EBV nas amostras foi realizada pelo método de *Nested PCR*, através da utilização de *primers* para o gene *EBNA2* (que codifica o antígeno nuclear 2 do vírus EBV). Foram utilizados *primers* específicos que permitem a discriminação do EBV de tipo 1 e de tipo 2 (*EBNA2*-EBV tipo 1 e *EBNA2*-EBV tipo 2).

O PCR foi realizado em amostras de DNA extraído de cada caso acordo com o protocolo previamente descrito. Para a primeira reação de PCR, foi preparado um tubo de PCR para cada amostra com 12 µL de solução de reação (Master Mix, NZYTech).

A solução de reação foi constituída por: 1,25 µl de solução tampão, 1,25 µl de dNTPs, 0,75 µl de MgCl₂ (NZYTech), 0,1 µl de *Taq polimerase* (NZYTech), 7,625 µl de água livre de DNase e RNase, 0,5 µl do *primer forward EBNA2* (Sigma-Aldrich) e 0,5 µl do *primer reverse EBNA2* (Sigma-Aldrich) (Tabela 3.5).

Tabela 3.5- Sequências de *primers* do 1º PCR e do *Nested* PCR. Adaptado da ref. (23).

Nome dos <i>primers</i>	Gene	Sequência dos <i>primers</i>
EBNA2-F EBNA2-R	<i>EBNA2</i>	F: TGGCAAACCCGTCCTCTC R: TAATGGCATAGGTGGAATG
<i>Nested</i> EBNA2-F <i>Nested</i> EBNA2-R1	<i>EBNA2</i>	F: AGGGATGCCTGGACACAAGA R1: GCCTCGGTTGTGACAGAG
<i>Nested</i> EBNA2-F <i>Nested</i> EBNA2-R2	<i>EBNA2</i>	F: AGGGATGCCTGGACACAAGA R2: TTGAAGAGTATGTCCTAAGG

F- *forward*; R1- *reverse* EBNA-EBV tipo 1; R2- *reverse* para EBNA2-EBV tipo 2.

A reação de PCR no termociclador envolveu uma etapa inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 seg., *annealing* a 52°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min. No final, ocorre uma etapa de alongação a 72°C durante 10 minutos e o alongamento a 12°C.

Para a 2º reação de *Nested* PCR foi preparado tubos de PCR e solução de reação em duplicado para cada amostra, de forma a amplificar o gene *EBNA2* para os dois tipos de EBV (tipo 1 e tipo 2) separadamente (Figura 3.9). Foi utilizado o mesmo *primer Nested* forward para os dois tipos de EBV, sendo alterado apenas o *primer Nested* reverse, que permite distinguir o tipo 1 e o tipo 2.

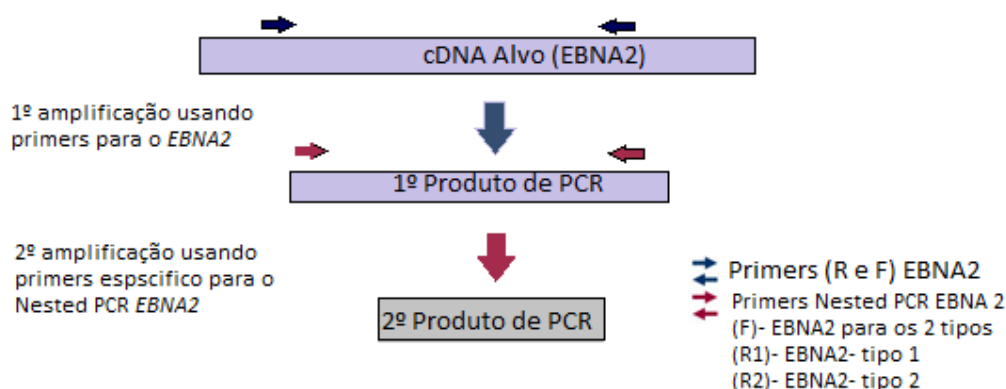


Figura 3.9- Esquema ilustrativo do *Nested* PCR na detecção do EBV nos CGEL.

Para cada tubo de PCR foi preparado 23 µl de solução de reação (Master Mix), constituído por 2,5 µl de solução tampão, 2,5 µl de dNTPs, 1,5 µl de MgCl₂ (NZYTech), 0,2 µl de *Taq Polimerase* (NZYTech), 15,25 µl de água livre de DNase, 1 µl de *primer forward Nested-EBNA2* (igual para os dois tipos de EBV) e 1 µl de *primer reverse Nested EBNA2-EBV* tipo 1 (R1) ou 1 µl de *primer reverse EBNA-2-EBV* tipo 2 (R2) (Tabela 3.5). Em seguida, foi adicionado 2µl do produto do primeiro PCR de cada amostra na solução de reação. Por fim ocorreu a reação de PCR no termociclador, envolvendo o mesmo número de ciclos e tempos utilizados no primeiro PCR.

Para a visualização e purificação do produto do *Nested* PCR foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose. A eletroforese em gel é uma técnica que se baseia na utilização de campo elétrico, com uma amostra de DNA num gel de agarose, para separar o produto de PCR mediante o tamanho dos fragmentos de DNA. Esta técnica permite verificar a pureza do produto de PCR, determinar o peso molecular e detetar macromoléculas, tais como, proteínas e ácidos nucleicos (98).

A separação do produto do *Nested* PCR foi realizada num gel de agarose a 2%, contendo o corante *greensafe*, que permitiu visualizar a migração das amostras. Previamente foi adicionado nas amostras um tampão de carregamento, constituído por azul de bromofenol e glicerol, numa concentração 6 vezes o volume final da amostra. Após preparação das amostras, estas foram carregadas no gel de agarose embebidos em solução TBE a 1%, e a corrida ocorreu a 180v durante 45 minutos. Adicionou-se no gel de agarose, um marcador de peso molecular, o *ladder*, para referenciar o tamanho do produto.

Em todas as experiências foram utilizados controlos positivos (duas linhas celulares: GP-positivo para *EBNA2-EBV* tipo 1 e IPA-positivo para *EBNA2-EBV* tipo 2) e negativos (branco: com ausência de DNA).

3.9. Hibridização *in situ* (HIS)

A hibridização *in situ* é uma técnica que permite identificar a localização da expressão de um determinado gene no microambiente celular. Esta técnica baseia-se na utilização de sondas marcadas que hibridizam e detetam sequências alvo específicas de DNA ou RNA em amostras fixadas.

A hibridização da sonda ocorre através do aquecimento inicial da sonda e do tecido que leva subsequentemente a desnaturação das cadeias de DNA, seguida de um arrefecimento da reação, que permite a sonda hibridizar a sequência de DNA complementar alvo. A hibridização da sonda é visualizada através de métodos de detecção indireto, que utiliza anticorpo primário dirigida a sonda, que por sua vez é reconhecido por uma enzima ligada a um sistema de detecção com cromogéneo. Este complexo dá origem a uma precipitação colorida no local da ligação específica do anticorpo (99, 100).

Para a detecção de EBV também foi realizada a técnica de hibridização *in situ*, que determina a localização da infecção latente por EBV e também permite validar os resultados obtidos pelo método de PCR.

O método de HIS, identifica a expressão de *EBV-encoded small RNAs* (EBER), através de uma sonda de oligonucleotídeos marcadas com fluoresceína, que hibridiza especificamente com os transcritos precoces de RNA localizados no interior do núcleo das células neoplásicas infetadas (22, 101). No presente estudo a HIS foi realizada no equipamento BenchMark ULTRA System (Ventana Medical Systems), utilizando sondas marcadas com fluoresceína (INFORM EBER Probe, Ventana, USA) (102).

A HIS foi realizada nos 24 casos, em secções de tecido de 3µm de espessura, obtidas de fragmentos fixados em formol e incluídos em parafina. Previamente as secções de tecido aderidas em lâminas adesivadas, foram colocadas na estufa durante 1 hora a 60°C. Seguidamente, as lâminas foram colocadas no equipamento BenchMark ULTRA, tendo cada lâmina sido processada individualmente. As secções de tecido foram desparafinadas com a solução EZprep e seguidamente foi realizada a digestão enzimática com a enzima ISH Protease 3 (Ventana), uma endopeptídase, que atua a 37°C, e tem a função de remover as proteínas que rodeiam a sequência de DNA. Posteriormente, as secções de tecido foram incubadas com a sondas INFORM EBER, durante 1 hora. A sonda INFORM EBER atua a 37°C, hibridizando os transcritos de *EBV-encoded small RNAs* (EBER), sendo necessário uma prévia desnaturação das cadeias de DNA a 85°C, para facilitar o acesso da sonda ao alvo de interesse. Após hibridização, foram feitas lavagens para remover as sondas que não foram hibridizadas.

Em seguida foi aplicado o kit de detecção *iVIEW_{Blue}* Detection Kit (ISH *iVIEW* kit, Ventana), composto por: um anticorpo primário anti-fluoresceína de ratinho, um anticorpo secundário biotilado (anti-ratinho), as enzimas streptavidina e fosfatase alcalina, para visualização, o 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) e o cromogéneo Nitro-Azul-Tetrazólio (100) .

Inicialmente, as secções de tecido foram incubadas com o anticorpo primário anti-fluoresceína de ratinho que deteta as sondas marcadas com fluoresceína. De seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário de bode anti-ratinho biotilado que por sua vez se liga ao anticorpo primário formando um complexo. Depois, foi adicionado um conjugado de enzimas (streptavidina e fosfatase alcalina) que se ligam à biotina acoplada ao anticorpo secundário. A visualização da marcação foi feita através do BCIP e o cromogéneo Nitro Azul-Tetrazólio, que dá origem a um precipitado azul (Figura 3.10) (100, 103).

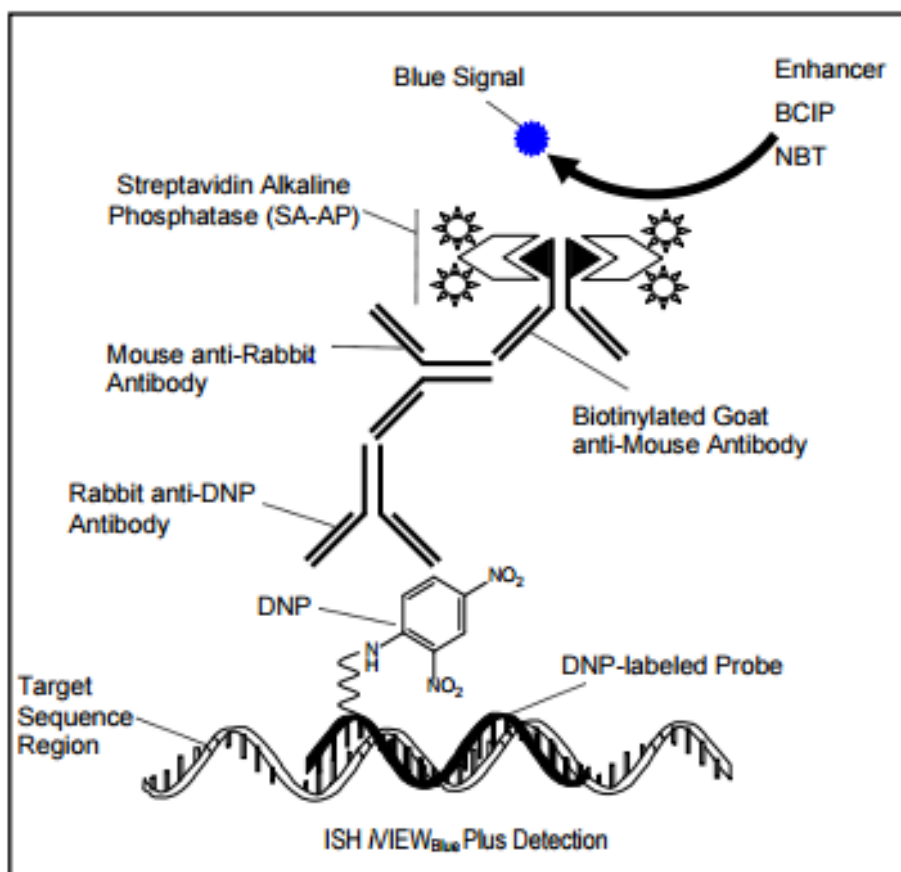


Figura 3.10- Esquema ilustrativo do princípio básico do kit de detecção de hibridização *in situ*. Adaptado da ref. (103).

Entre as etapas de incubação, as secções de tecido foram sempre submetidas a lavagens com a solução tampão adstringente de SSC (*Sodium Salt Citrate*), com pH 7, composta por citrato de sal de sódio, e tampão de cloreto de sódio e citrato de sódio, cuja função é remover todos os compostos não hibridizados. Por fim as secções de tecido foram contrastadas com *Nuclear Fast Red*, que dá uma cor vermelha aos núcleos das células.

No final do protocolo, as lâminas foram desidratadas com etanol a 50%, 70% e 100%, acetona, diafanizadas em xilol e montadas em lâminas com *Entellan* e cobertas com lamela. Em todas as experiências foram utilizadas secções de tecido como controlo positivo para o EBER, aderidas na mesma lâmina de cada caso.

3.10. Avaliação da expressão de PD-L1

A avaliação da expressão de PD-L1 foi realizada por um Patologista experiente, de acordo com os critérios propostos por Böger *et al* (104). Os critérios utilizados para avaliação da expressão de PD-L1 nos casos foram: percentagem de células neoplásicas marcadas, intensidade da marcação das células neoplásicas e percentagem de células imunes, sendo atribuído um valor de acordo com o sistema de score apresentado na Tabela 3.6. Por fins de análise de resultados consideraram-se dois grupos: 1) $\geq 50\%$ de células neoplásicas e/ou estromais expressam PD-L1; 2) $< 50\%$ de células neoplásicas e/ou estromais expressam PD-L1. Também se avaliou a intensidade da marcação, classificada em negativo, baixa, moderada e forte.

Tabela 3.6- Sistema de Score de imunoreactividade da expressão de PD-L1. Adaptado da (104).

Sistema de Score de imunoreactividade
Score de percentagem de células tumorais PD-L1
0 (0%)
1 (<=1%)
2 (2-10%)
3 (11-50%)
4 (>50%)
Score de intensidade de PD-L1
0 (negativo)
1 (Baixa)
2 (Moderada)
3 (Forte)
Percentagem de célula imunes
0 (0%)
1 (1-5%)
2 (6-20%)
3 (>20%)

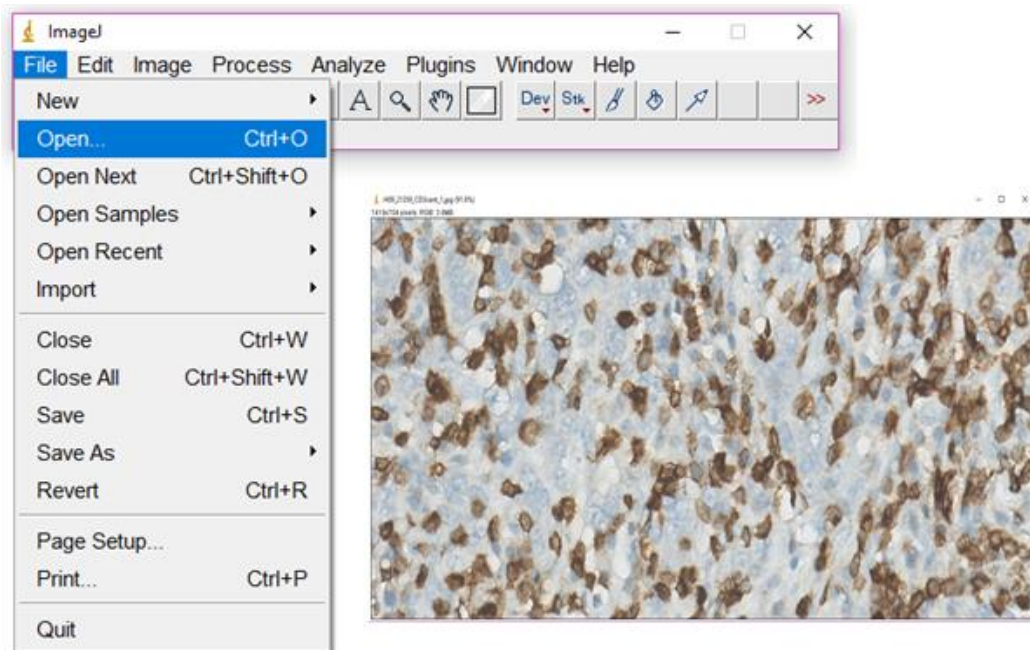
3.11. Avaliação da expressão de CD8 e CD3 no estroma linfóide

A expressão de linfócitos CD3 e CD8 foi quantificada tanto no centro como na periferia do tumor. Para cada caso, as lâminas foram digitalizadas e a partir destas digitalizações foram feitas fotografias de 10 áreas no centro do tumor e 10 áreas na periferia do tumor, utilizando um sistema de câmara acoplado a um microscópio (Leica DMD108, *Leica Microsystems*). A seleção das áreas foi feita por um Patologista experiente, compreendendo toda a área tumoral, mucosa adjacente não neoplásica, mucosa gástrica, visualizada pela coloração HE. Na seleção foi evitada áreas de necrose e de ulceração. As fotografias foram realizadas com uma ampliação de 400x.

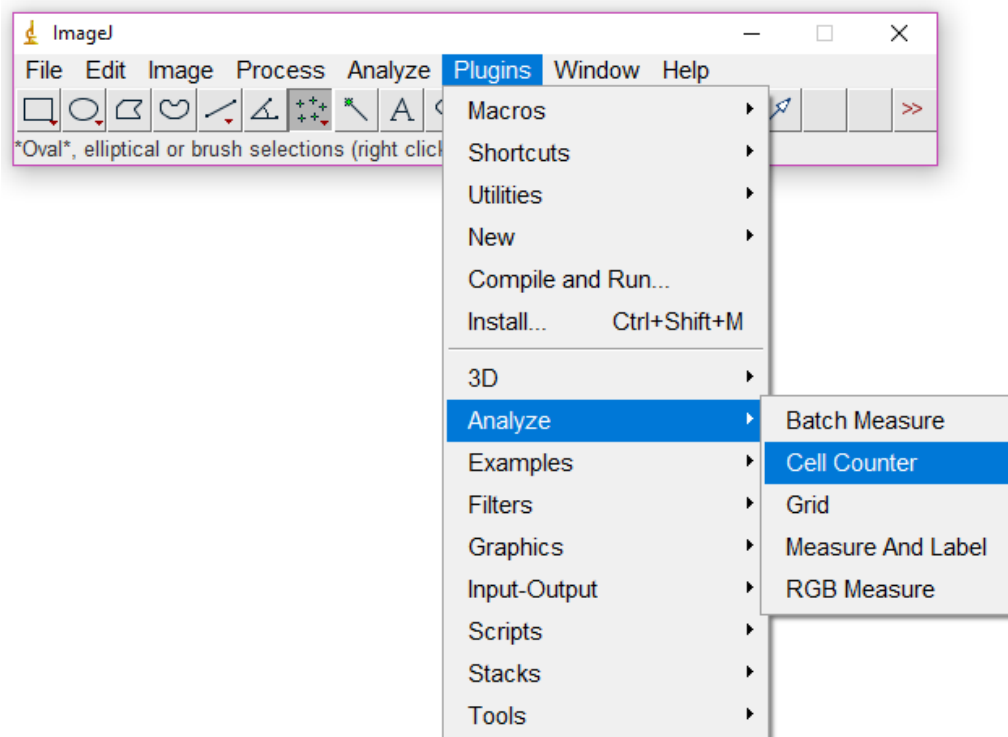
Posteriormente, as fotografias foram analisadas no *software ImageJ* onde foram feitas as contagens dos linfócitos T CD3+ e dos linfócitos T CD8+, separadamente, no centro e na periferia do tumor.

3.11.1. Método de quantificação dos linfócitos T CD3+ e CD8+ no software ImageJ

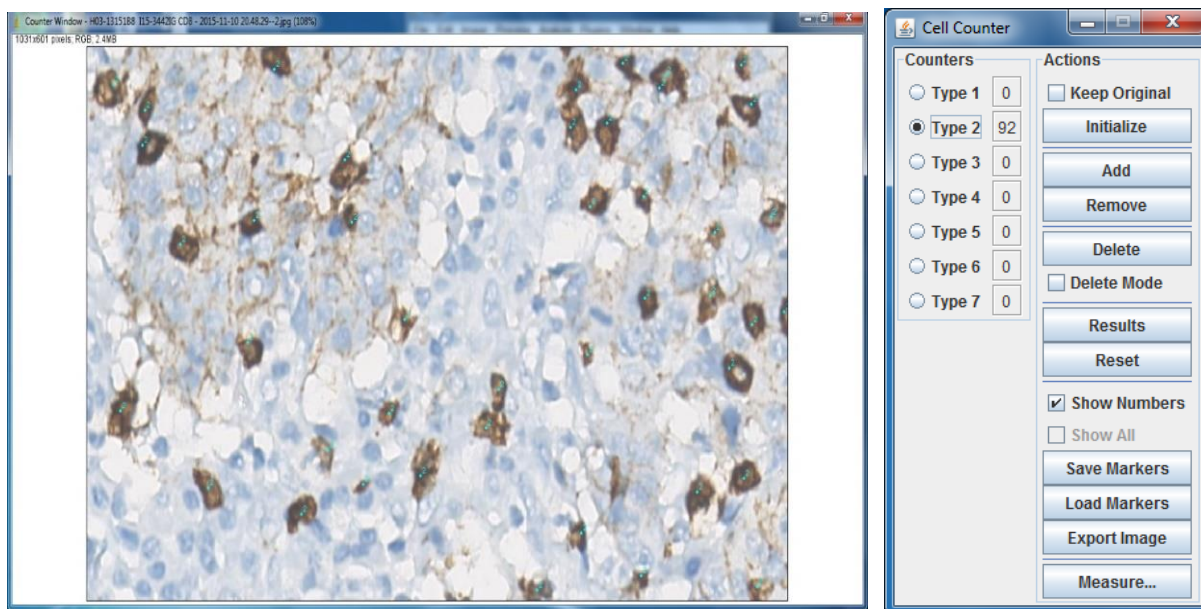
1º. Após aquisição de imagem, abrir a imagem com o software Image J.



2°.Selecionar a opção *Plugins* na barra de ferramenta, seguida de *Analyze* e por último escolher a opção *Cell Counter*.



3º. Fazer a contagem manual das células marcadas com o respetivo anticorpo com uma cor (neste caso o Azul). O software contabiliza automaticamente o número de células marcadas manualmente.



Dos valores obtidos das contagens, foram utilizados o valor médio da soma das contagens nas diferentes áreas (centro e periferia) para o estudo estatístico.

3.12. Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada utilizando o software SPSS versão 23.0. O nível de significância considerada foi de $p < 0,05$.

Para comparar a expressão de CD3 e CD8 entre o centro e na periferia do tumor, foi avaliada, primeiramente, a normalidade da distribuição da soma das contagens de linfócitos T CD3 e CD8, utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. Posteriormente, foi aplicado o teste paramétrico *t*-Student para amostras emparelhadas.

Para comparar a expressão de CD3 e CD8 relativamente à infecção por EBV, foi também testada a normalidade das duas variáveis, utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. De seguida, foi aplicado o Teste *t*-Student para amostras independentes.

Para avaliar a associação entre a infecção por EBV e a instabilidade de microssatélites, foi realizada o teste exato de *Fisher*. Foi realizado também o teste exato de *Fisher* para avaliar a associação entre as duas técnicas de deteção do EBV, PCR e HIS.

4.RESULTADOS

4.1. Características clínico-patológicas do CGEL

O presente estudo foi realizado numa amostra de 24 casos de CG, com um perfil histopatológico específico, denominados CGEL. O objetivo do estudo foi caracterizar dos casos de CGEL quanto ao perfil clínico-patológico, associação ao EBV, IMS, infiltrado linfóide, e expressão de PD-L1. A idade dos doentes foi, em média, de 65,4 anos com um desvio padrão de 12,4. A maioria dos doentes 15/24 (62,5%) tinham idade superior a 65 anos. Quanto ao género, verificou-se um predomínio de doentes do sexo masculino 17/24 (71%). A maioria dos doentes com CGEL 16/24 (66,7%) foi submetida a cirurgia total do estômago (gastrectomia total). Dos 24 casos, 15 (62,5%) dos tumores localizavam-se no terço médio/superior e 9 (37,5%) no terço inferior do estômago. A taxa média de sobrevida dos doentes com CGEL foi de 67,1 meses com um desvio padrão de 41,5. Os estadios de pTNM estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Características clínico-patológicas de 24 casos de CGEL

Características	n (%)
▸ Idade de diagnóstico	65,4 ± 12,4
<65 Anos	9 (37,5%)
>65 Anos	15 (62,5%)
▸ Género	
Masculino	17 (70,8%)
Feminino	7 (29,2%)
▸ Localização	
Terço inferior	9 (37,5%)
Terço médio/superior	15 (62,5%)
▸ Tipos de cirurgias realizadas	
Gastrectomia distal	8 (33,3%)
Gastrectomia total	16 (66,7%)
▸ Sobrevida do doente (meses)	67,1 ± 41,5
▸ Estadios pTNM	
IA e IB	6 (25,0%)
IIA e IIB	12 (50,0%)
IIIA e IIIB	5(20,8%)
IV	1 (4,2%)

4.2. Caracterização morfológica do CGEL

A avaliação morfológica foi feita em lâminas coradas por Hematoxilina & Eosina (HE), tendo-se verificado a presença de infiltrado linfocitário denso em todos os casos, que dificultava a descrição do padrão morfológico das células neoplásicas. Deste modo, para melhor caracterizar a morfologia das células tumorais, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo pan-citoqueratina (Anti-AE1/ AE3), de modo a evidenciar o padrão morfológico destas células.

Através do estudo imunostiquímico, verificou-se uma heterogeneidade da arquitetura das estruturas epiteliais neoplásicas com constituição de glândulas, ninhos sólidos, cordões/trabéculas e presença de células pouco-coesas (Figura 4.1 e 4.2). As células neoplásicas encontravam-se dispostas em túbulos, glândulas, cordões, trabéculas e células isoladas. Verificou-se que o infiltrado linfocitário era constituído predominantemente, por linfócitos e plasmócitos e com a presença frequente de folículos linfóide no centro e periferia do tumor.

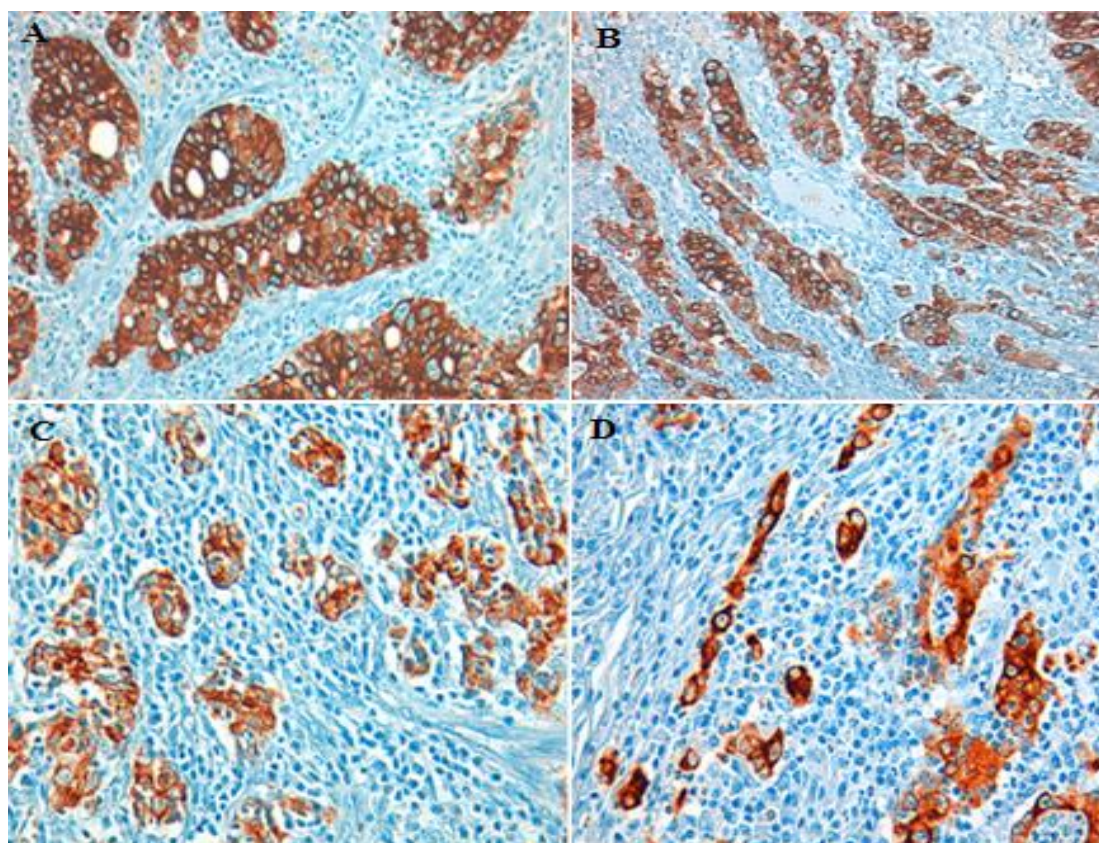


Figura 4.1- Expressão de AE1/AE3 pelas células neoplásicas do CGEL: A- Estrutura glandular (cribriforme); B- Estrutura cordonal; C- Estrutura micro-glandular; D- Estrutura de células pouco-coesas (IHQ, 400x).

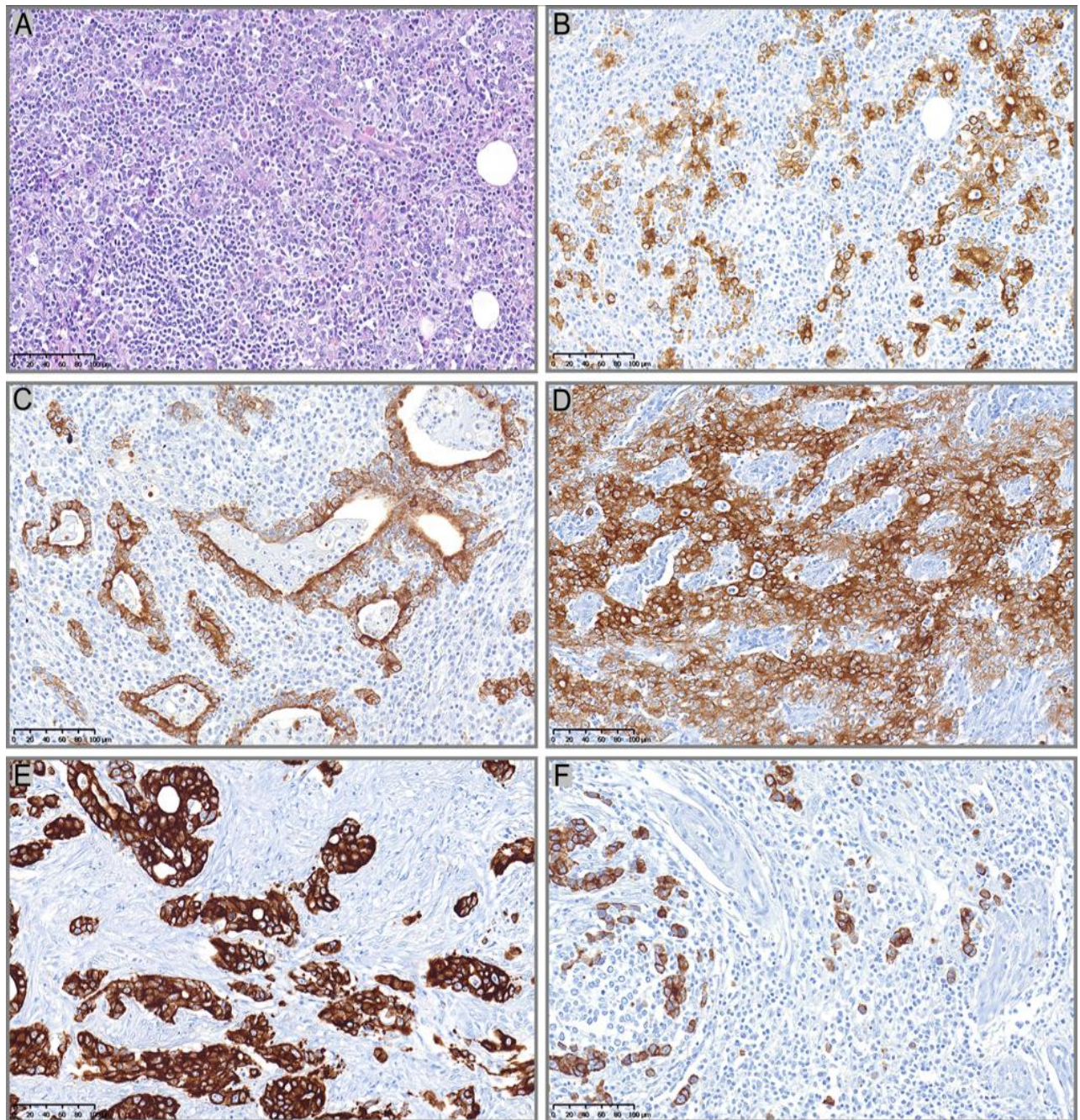


Figura 4.2- Padrão morfológico dos CGEL através das técnicas de HE e Imuno-histoquímica. A- Pela coloração H&E verifica-se um infiltrado linfóide proeminente no estroma e o padrão morfológico das células neoplásicas pouco nítida; B- Imuno-histoquímica com o anticorpo AE1/AE3, para a identificação das células neoplásicas e melhor demonstração do padrão morfológico; Identificação do arranjo das células neoplásicas: em túbulos (C), em glândulas (D), em cordões e trabéculas (E) e células isoladas (400x).

Outras características morfológicas foram avaliadas, descritas na Tabela 4.2. De acordo com a classificação de Lauren (9), observaram-se os seguintes sub-tipo histológicos: intestinal (2/24;8,3%), difuso (0/24; 0%), misto (2/24; 8,3%) e não classificável (20/24; 83,3%). O padrão de crescimento foi classificado como infiltrativo (9/24; 37,5%) e expansivo (15/24; 62,5%). Observou-se a presença de permeação linfática em 15 casos (62,5%) e de invasão venosa em 13 casos (54,2%). Só foram identificados metástases à distância (M1) num dos casos (4,2%).

Tabela 4.2- Características morfológicas dos CGEL

Caraterísticas	n (%)
Classificação de Lauren	
➤ Intestinal	2 (8,3%)
➤ Difuso	0 (0%)
➤ Misto	2 (8,3%)
➤ Não Classificado	20 (83,3%)
Padrão de crescimento	
➤ Infiltrativo	9 (37,5%)
➤ Expansivo	15 (62,5%)
Permeação linfática	
➤ Presente	15 (62,5%)
➤ Ausente	9 (37,5%)
Invasão venosa	
➤ V0	13 (54,2%)
➤ V1	11 (45,8%)
Metástase à distancia	
➤ M0	23 (95,8%)
➤ M1	1 (4,2%)

4.3. Expressão de CD3 e CD8 no microambiente tumoral

Ensaio clínico com imunoterapia têm evidenciado que os doentes com infiltrado de linfócitos T mediados pela imunidade adaptativa pré-existent, apresentam resultados mais efetivos, aos inibidores do *checkpoint* imunológico, em relação aos doentes com pouco infiltrado linfocitário. Neste sentido, foi considerado pertinente avaliar o infiltrado linfocitário nos CGEL.

A caracterização do microambiente tumoral, particularmente o infiltrado linfocitário, foi avaliada em todos os casos, através da técnica de imuno-histoquímica, recorrendo ao anticorpo CD3, que marca a sub-população de linfócitos T tipo CD3, e ao anticorpo CD8, que marca linfócitos T citotóxicos tipo CD8. A técnica de imuno-histoquímica, demonstrou a expressão das subpopulações de linfócitos, evidenciando-os com uma marcação citoplasmática e membranar de cor castanha (Figura 4.3). Posteriormente, foi feita a quantificação dos linfócitos T CD3+ e CD8+ no centro e na periferia do tumor utilizando o software *ImageJ*.

Na Tabela 4.3 apresentam-se os resultados obtidos da aplicação do Teste t para amostras emparelhadas na comparação da expressão de CD8 no centro e na periferia do tumor, verificando-se que a expressão de CD8 foi significativamente superior na periferia em relação ao centro do tumor ($p=0,000$).

Comparando a expressão de CD3 no centro e na periferia do tumor, também se verificou uma expressão significativamente superior na periferia em relação ao centro do tumor ($p=0,003$).

Tabela 4.3- Comparação da expressão de CD8 e CD3 no centro e na periferia do tumor

	Média± Desvio Padrão (n=24)	P
CD8 Centro	1915,9±1124,5	0,000
CD8 Periferia	2435,8±1281,4	
CD3 Centro	3580,8±2192,1	0,003
CD3 Periferia	4452,3±2304,3	

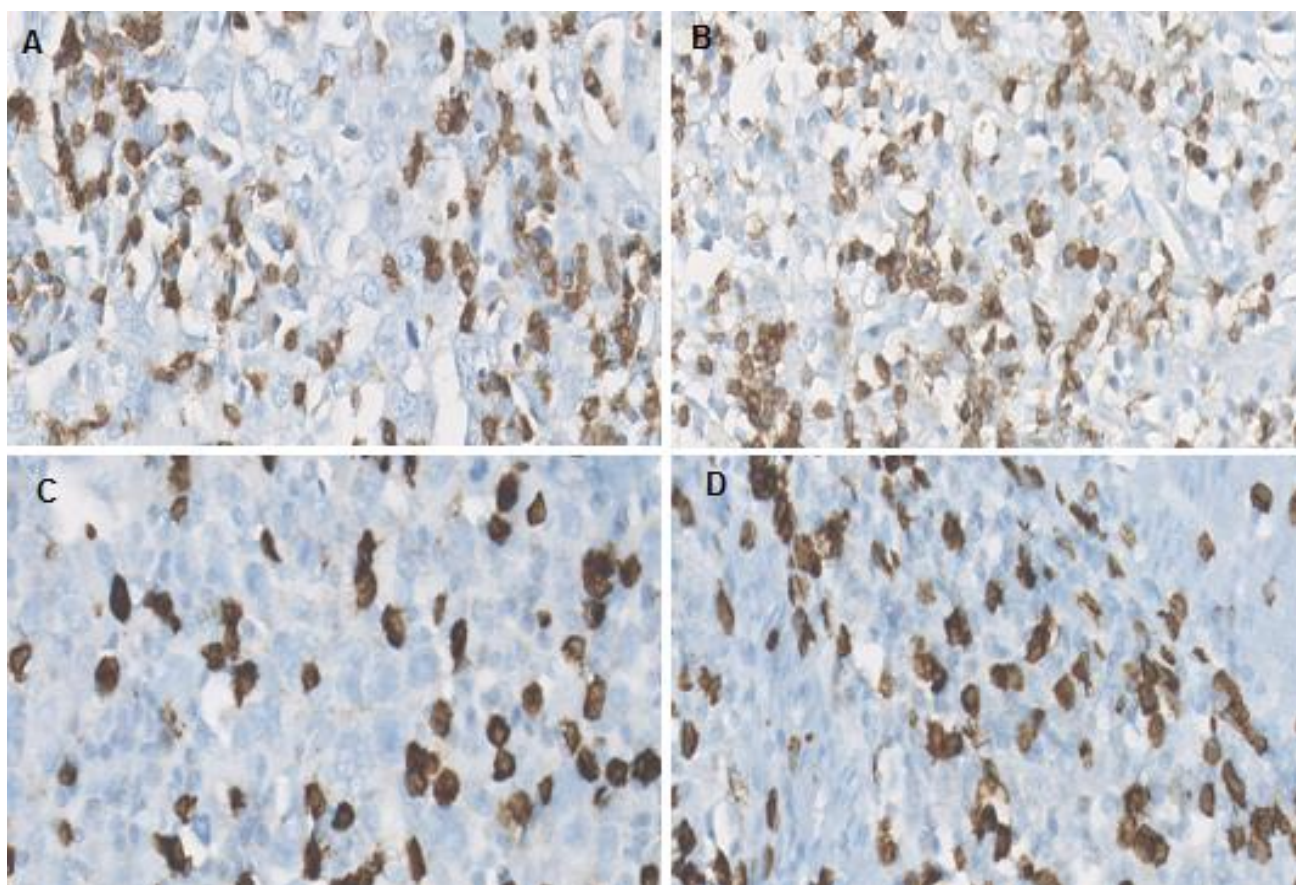


Figura 4.3- Expressão de CD3 e CD8 em carcinomas gástricos com estroma linfóide: A- Expressão de CD3 no centro do tumor; B-Expressão de CD3 na periferia do tumor; C- Expressão de CD8 no centro do tumor; D- Expressão de CD8 na periferia do tumor (IHQ, 400x).

4.4. Infecção por EBV no CGEL

A avaliação da infecção por EBV foi realizada em todos os casos, através de duas técnicas: PCR e HIS. A técnica de PCR permitiu identificar o DNA do vírus no genoma humano, através da expressão do gene *EBNA-2* pelas células neoplásicas infetadas e linfócitos infiltrados no tumor. Enquanto, a técnica de HIS permitiu identificar o *EBV-encoded small RNAs* (EBER) no núcleo das células neoplásicas infetadas.

Pela técnica de HIS (EBER), foram detetados 16 casos de CGEL (66,7%) com a presença de EBV, e 8 casos (33,3%) negativos para o EBV (Tabela 4.4). O *EBV-encoded small RNAs* (EBER) foi identificado no núcleo das células neoplásicas infetadas, com uma coloração azul, e ausente na mucosa normal adjacente (Figura 4.4).

Tabela 4.4- Detecção de infecção por EBV através de técnica de hibridização *in situ*

EBV por HIS	N	%
Positivo	16	66,7
Negativo	8	33,3
Total	24	100

Em 23 casos procedeu-se a deteção de EBV por *Nested* PCR. Num dos casos não havia material disponível para esta análise. Pela técnica de *Nested* PCR, foram identificados 11 casos (47,8%) positivos e 12 casos (52,2%) para o *EBNA2*-EBV de tipo 1. Enquanto, para o *EBNA2*-EBV de tipo 2 não se identificou qualquer caso positivo (Figura 4.5). Nos resultados obtidos da experiência do *Nested* PCR, demonstrados por eletroforese no gel de agarose (Figura 4.5), a presença de uma banda de 300bp, que corresponde ao peso molecular do gene *EBNA2*, EBV tipo 1.

Tabela 4.5- Detecção de infecção por EBV através da técnica de PCR

EBV por PCR	N	%
Positivo	11	47,8
Negativo	12	52,2
Total	23	100

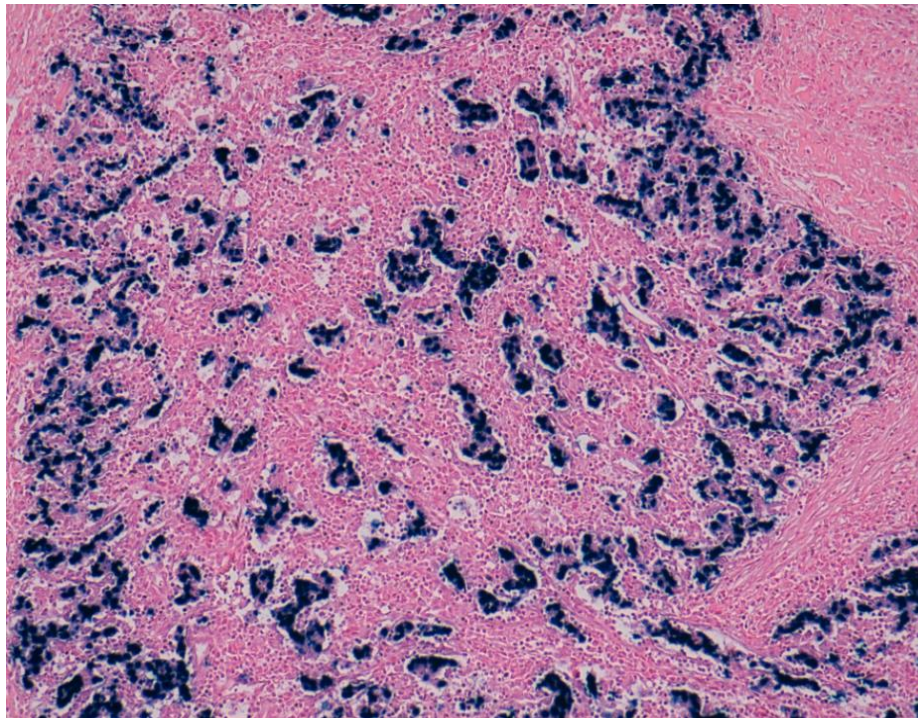


Figura 4.4- Hibridização *in situ* para detecção de infecção por EBV no CGEL. O sinal de hibridização localiza-se apenas no núcleo das células neoplásicas, representado por uma cor azul (HIS, 100x).

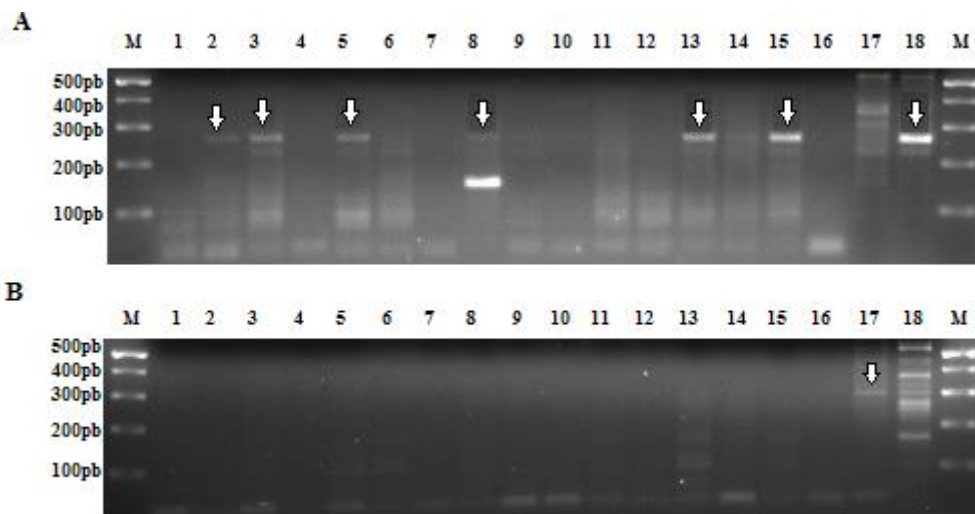


Figura 4.5- *Nested* PCR para detecção de DNA do vírus de EBV: A- O produto de amplificação de 300 bp corresponde ao gene *EBNA2*-EBV tipo 1 (casos assinalados com uma seta branca). B- Não se verificou amplificação do gene *EBNA2*-EBV tipo 2 em qualquer dos casos. M-marcador de peso molecular; 1-15 – casos em estudo; 16- controlo negativo; 17- controlo positivo para o *EBNA2*-EBV tipo 2 (linha celular IPA); 18- controlo positivo para o *EBNA2*-EBV tipo1 (linha celular GP).

4.5. Comparação das técnicas de detecção da infecção por EBV

Para avaliar a correlação existente entre as duas técnicas de detecção da infecção por EBV foi efetuado o teste exato de *Fisher*. Pela técnica de PCR foram detetados 11 casos positivos para EBV (*EBNA2*) e 12 casos negativos para EBV, enquanto por HIS, foram detetados 15 casos positivos para EBV (*EBER*) e 8 casos negativos. Todos os casos positivos por PCR (*EBNA2*), foram igualmente positivos pela técnica de HIS (*EBER*). Contudo, em 4 casos, positivos por HIS, não se obteve amplificação por PCR. Os resultados obtidos demonstram uma associação fortemente significativa entre as duas técnicas de detecção de infecção por EBV ($p=0,001$).

Tabela 4.6- Comparação das técnicas de HIS e PCR na detecção de infecção por EBV

		HIS		Total
		Negativo	Positivo	
PCR	Negativo	8	4	12
	Positivo	0	11	11
Total		8	15	23

4.6. Comparação de infecção por EBV com a presença de linfócitos CD3+ e CD8+ no centro e na periferia do tumor

Comparou-se a infecção por EBV com a expressão de linfócitos CD3+ e CD8+, através do Teste t para amostras independentes. Dos resultados obtidos, verificou-se que na maioria dos casos EBV positivos a quantidade de linfócitos T CD8+, era significativamente superior no centro e na periferia do tumor, em relação aos casos EBV negativos ($p=0,005$ e $p=0,002$ respetivamente) (Tabela 4.7). Resultados semelhantes foram obtidos no estudo dos linfócitos T CD3+ no centro e na periferia do tumor ($p=0,001$ e $p=0,002$ respetivamente) (Tabela 4.7). Os resultados obtidos da análise quantitativa do infiltrado linfocitário revelam que os CGEL infetados por EBV têm um infiltrado de linfócitos T citotóxicos CD8 e CD3 proeminente no tumor em relação os casos EBV negativos.

Tabela 4.7- Comparação da infecção por EBV e a presença de linfócitos CD8+ e CD3+ no centro e na periferia do tumor

	EBV	N	Média ± Desvio Padrão	P
CD8 Centro	Positivo	15	2357,3±1104,3	0,005
	Negativo	9	1180,4±726,2	
CD8 Periferia	Positivo	15	2973,4±1221,7	0,002
	Negativo	9	1539,9±814,6	
CD3 Centro	Positivo	15	4539,5±2159,9	0,001
	Negativo	9	1983,0±1027,2	
CD3 Periferia	Positivo	15	5383,5±2331,6	0,002
	Negativo	9	2900,3±1190,3	

4.7. Instabilidade de microssatélites no CGEL

A pesquisa de IMS no CGEL foi realizada através da técnica de PCR multiplex, e análise dos resultados por eletroforese capilar. A técnica de PCR multiplex, com os 5 marcadores mononucleotídicas, permitiu amplificar as regiões de microssatélites, com maior probabilidade de instabilidade. A análise eletroforética, permitiu identificar alterações no número de sequências repetidas, através da presença de picos extras em dois ou mais dos marcadores. Foi considerado instabilidade microssatélites de alto grau os casos com picos extras em dois ou mais marcadores (Figura 4.6), sendo estes picos correspondentes às clones de células neoplásicas. Enquanto, os casos que não apresentaram picos extras em nenhum dos marcadores foram considerados MSS (Figura 4.7).

A análise de instabilidade de microssatélites foi realizada em todos os casos, tendo sido identificada 4 casos (16,7%) de CGEL com instabilidade de alto grau (IMS-A). Nos 20 casos (83,3%) restantes não se detetou MSS (Tabela 4.8).

Tabela 4.8- Instabilidade de microssatélites no CGEL

IMS	n	%
Ausente	20	83,3
Presente	4	16,7
Total	24	100

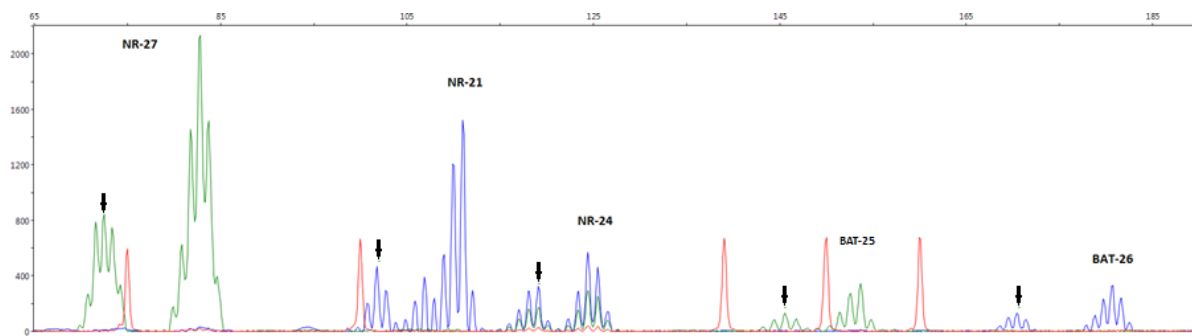


Figura 4.6- Eletoferograma representativo de instabilidade microssatélites de alto grau. As setas demonstram picos extras nas regiões microssatélites identificadas pelos marcadores NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26, respetivamente.

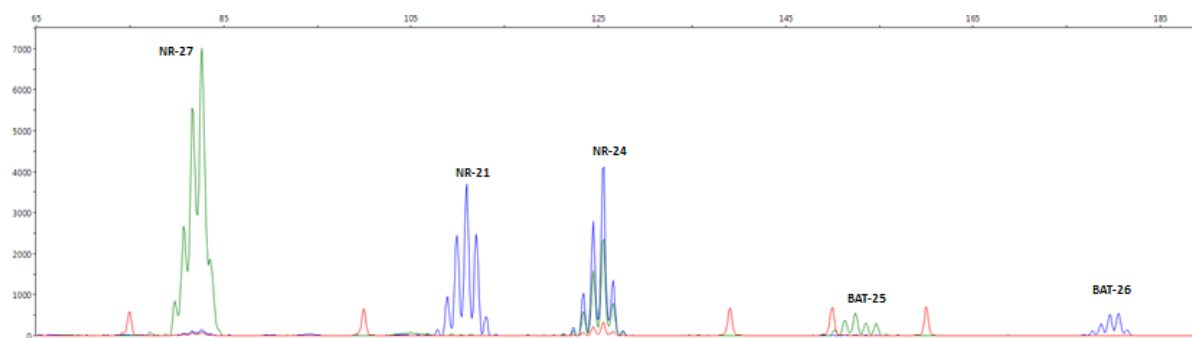


Figura 4.7- Eletoferograma representativo de instabilidade microssatélites estáveis, ou seja, não se verifica picos extras em nenhum os marcadores.

4.8. Associação entre infecção por EBV e IMS no CGEL

Para avaliar a associação existente entre a infecção por EBV e a IMS nos CGEL, foi realizado o teste estatístico exato de *Fisher*, que nos permitiu avaliar a correlação existente entre duas variáveis. Verificou-se que todos os casos com infecção por EBV (n=16) eram estáveis, isto é, não apresentavam IMS. Nos casos negativos para EBV (n=8), detetou-se instabilidade de microssatélites de alto grau em 4 casos (50%), sendo os restantes (n=4) estáveis (50%) (Tabela 4.9). Os resultados obtidos demonstram que a infecção por EBV e a IMS estão inversamente correlacionados ($r=-0,577$, $p=0,003$).

Tabela 4.9- Associação entre infecção por EBV e IMS-A

		EBV		Total
		Negativo (n=8)	Positivo (n=16)	
IMS-A	Ausente	4(50%)	16 (100%)	20
	Presente	4 (50%)	0 (0%)	4
Total		8	16	24

4.9. Avaliação da expressão de PD-L1 no CGEL

A expressão de PD-L1 foi avaliada em todos os casos, através do estudo imuno-histoquímico, com o anticorpo anti-PD-L1, que identifica as células neoplásicas e imunes que expressam a proteína PD-L1. O intuito desta avaliação foi de explorar se nos CGEL a via de sinalização PD-L1/PD-1 se encontra ativa.

Os casos foram classificados em dois grupos: 1) expressão acentuada de PD-L1 ($\geq 50\%$ das células imunorreativas, neoplásicas e/ou estromais) em 6 casos (25%); 2) expressão de PD-L1 em menos de 50% das células em 18 casos (75%) (Tabela 4.10).

Tabela 4.10- Expressão de PD-L1 no CGEL

Expressão do PD-L1	n	%
$\geq 50\%$	6	25
$< 50\%$	18	75
Total	24	100

4.10. Padrão morfológico de expressão de PD-L1 nas células neoplásicas e células estromais

A técnica de imuno-histoquímica, permitiu avaliar o padrão de expressão de PD-L1 nas células neoplásicas e nas células estromais. A expressão de PD-L1 foi observada nas células neoplásicas e nas células estromais (linfócitos, macrófagos e células dendríticas), mas ausente nas células epiteliais não neoplásicas (Figura 4.8). Na maioria dos casos com expressão de PD-L1 $\geq 50\%$, as células epiteliais neoplásicas exibiam um padrão de expressão predominantemente membranar (Figuras 4.9), enquanto as células estromais exibiam um padrão de expressão citoplasmático, granular ou em “Dot” (Figura 4.10).

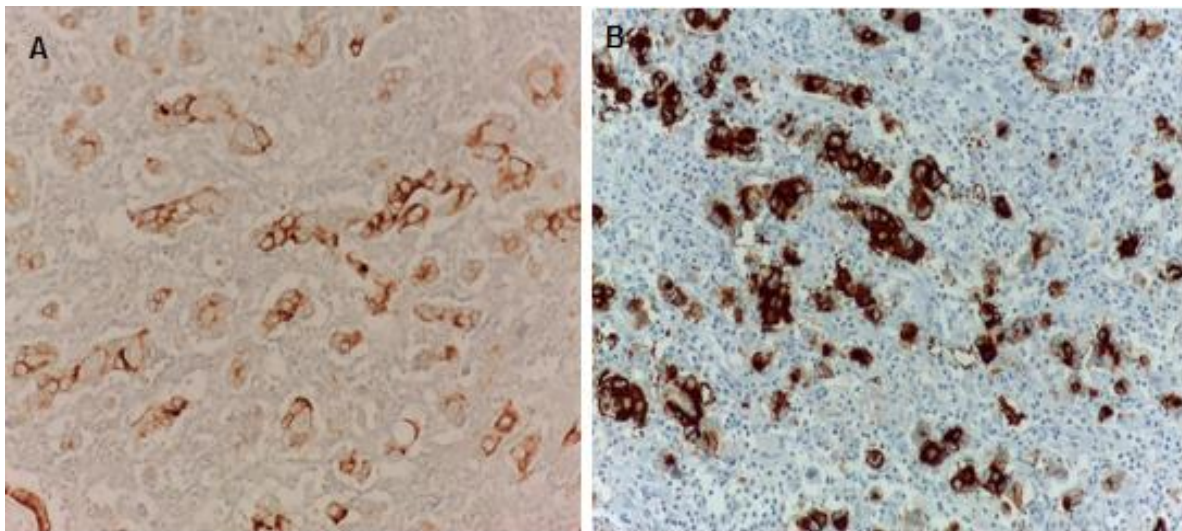


Figura 4.8 - Coloração Imuno-histoquímica com o anticorpo AE1/AE3 (A) e PD-L1 (B): A- Expressão de AE1/AE3, realçando as células epiteliais neoplásicas (IHQ, 100x); B- Expressão de PD-L1 membrana e citoplasmático nas células neoplásicas e estromais (IHQ, 200x).

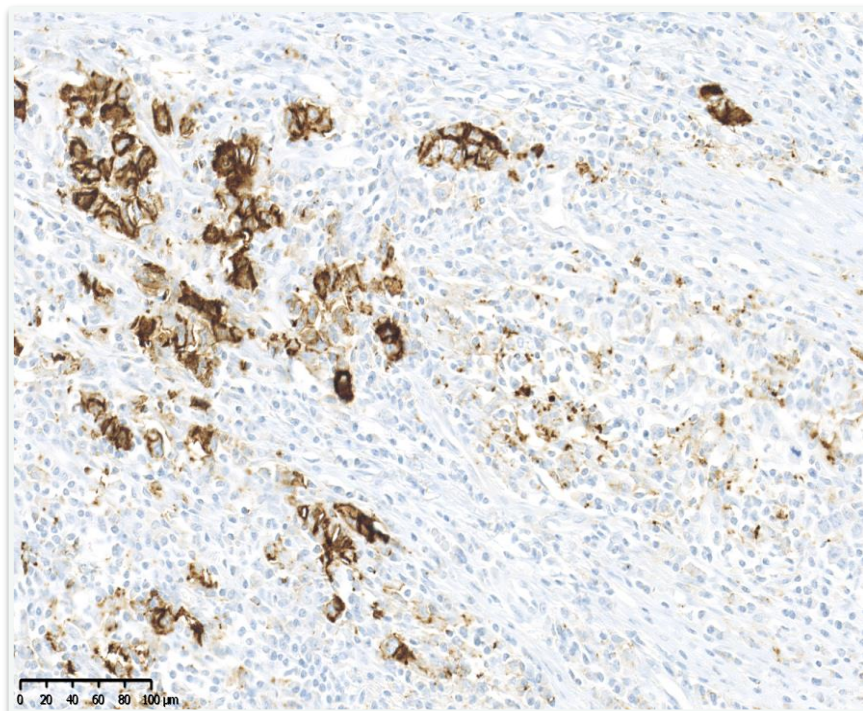


Figura 4.9- Coloração Imuno-histoquímica com o anticorpo PD-L1. Expressão aumentada de PD-L1 >50% identificada nas células epiteliais neoplásicas e estromais. As células epiteliais neoplásicas apresentam uma expressão membranar, citoplasmática de PD-L1 (200x).

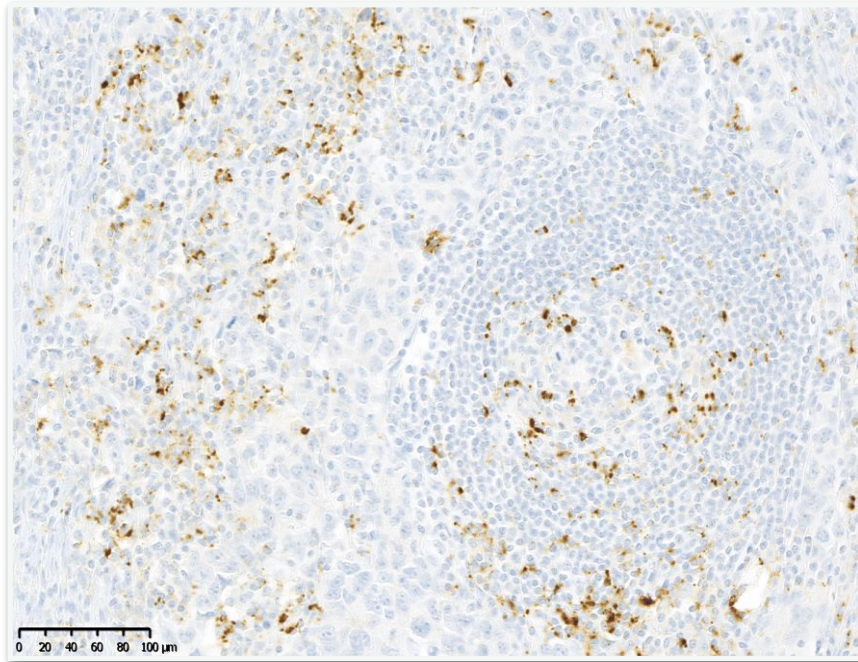


Figura 4.10- Coloração Imuno-histoquímica com o anticorpo PD-L1. Expressão de PD-L1 <50% identificada principalmente nas células estromais (200x).

4.11. Comparação entre a expressão de PD-L1 e o infiltrado linfocitário intratumoral

Tendo em conta a importância da expressão de PD-L1 no infiltrado linfocitário intratumoral para aplicabilidade da imunoterapia com inibidores do *checkpoint* imunológico, foi avaliado a associação existente entre a expressão de PD-L1 e o infiltrado linfocitário intratumoral, através do teste t para amostras independentes. Segundo os resultados obtidos, não foi encontrada uma associação significativa entre a expressão de PD-L1 e a distribuição da população de linfócitos T CD8+ e CD3+.

4.12. Avaliação da dupla marcação por imunofluorescência

A análise de co-localização de expressão de PD-L1 nas células epiteliais neoplásicas e nas células estromais foi realizada através da técnica de imunofluorescência - dupla marcação. A dupla marcação foi realizada com os anticorpos conjugados com os respectivos fluorocromos, o anti-PD-L1 (conjugado com o fluorocromo vermelho) para avaliar a expressão da proteína PD-L1 nas células epiteliais e estromais, o anti-pan-citoqueratina (AE1/AE3) (conjugado com fluorocromo verde) para identificar as células epiteliais neoplásicas e o anti-CD68 (conjugado com fluorocromo o verde) para identificar os macrófagos no microambiente tumoral. Num grupo selecionado de casos foi possível demonstrar a co-localização de PD-L1 e da pan-citoqueratina AE1/AE3 nas células neoplásicas (epiteliais), através da visualização de sobreposição dos fluorocromo que revelaram uma marcação cor de laranja. Foi também possível demonstrar a co-localização de PD-L1 e CD68 em macrófagos do microambiente tumoral (também através da sobreposição dos fluorocromos que deram origem a uma marcação cor de laranja) (Figura 4.11). Neste estudo, demonstrou-se uma co-expressão de PD-L1 superior nas células epiteliais em relação aos macrófagos.

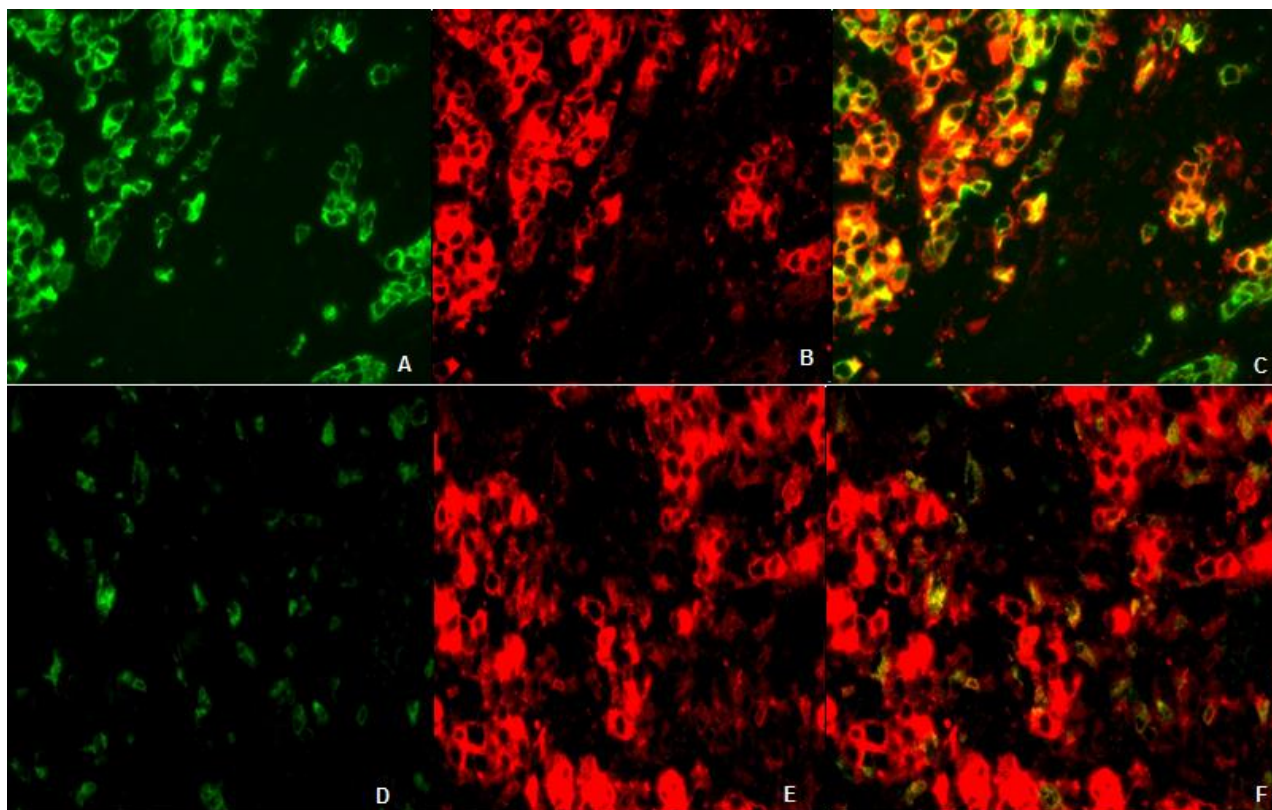


Figura 4.11- Co-localização de expressão de PD-L1 em células epiteliais neoplásicas (AE1/AE3) e em macrófagos (CD68): A- Expressão de AE1/AE3 em células epiteliais neoplásicas (verde); B- Expressão de PD-L1 em células epiteliais neoplásicas (vermelho); C- Co-expressão de PD-L1 e AE1/AE3 em células epiteliais neoplásicas (amarelo); D- Expressão de CD68 em macrófagos (verde); E- Expressão de PD-L1 em macrófagos (vermelho); F- Co-expressão de PD-L1 e CD68 em macrófagos (amarelo) (Imunofluorescência, 400x).

4.13. Comparação entre a expressão de PD-L1, infecção por EBV e IMS

A comparação da expressão de PD-L1 com a infecção por EBV e IMS revelou que, nos casos com expressão de PD-L1 $\geq 50\%$ (n=6), se detetou infecção por EBV em 4 casos (66,7%) e a presença de IMS-A nos 2 casos restantes (33,3%). Contudo, não foi encontrada uma associação significativa entre a expressão de PD-L1, a infecção por EBV e a instabilidade de microssatélites (Tabela 4.11). Os casos em que se detetou a presença de infecção por EBV (n=4) são diferentes daqueles em que se verificou a presença de IMS-A (n=2) (Figura 4.12).

Tabela 4.11- Comparação entre a expressão de PD-L1, infecção por EBV e IMS

		Expressão de PD-L1			
		<50% (n=18)		≥50% (n=6)	
		N	(%)	n	(%)
EBV	Positivo (n=16)	12	66,7	4	66,7
	Negativo (n=8)	6	33,3	2	33,3
IMS-A	Presente (n=20)	2	11,1	2	33,3
	Ausente (n=4)	16	88,9	4	66,7

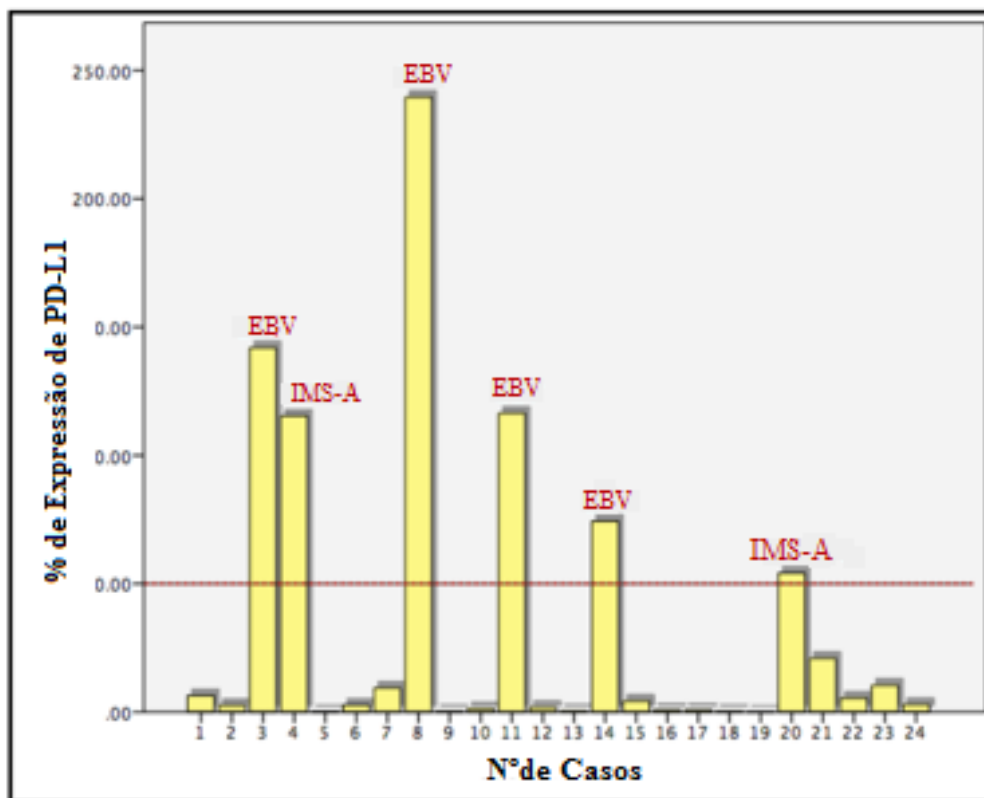


Figura 4.12- Comparação da expressão de PD-L1, infecção por EBV e IMS-A nos 6 casos com expressão de PD-L1 ≥50%: infecção por EBV (n=4); IMS-A (n=2).

4.14. Expressão de PD-L1 no CGEL e sobrevida dos doentes

A análise da associação existente entre a expressão de PD-L1 e a sobrevida dos doentes, foi realizada através do teste t para amostras independentes. Não se verificou diferença significativa ($p=0,497$) na sobrevida dos doentes com CGEL em função de expressão de PD-L1 ($\geq 50\%$ versus $< 50\%$), ou seja, nesta série a expressão do PD-L1 não influencia a sobrevida dos doentes com CGEL (Tabela 4.12).

Tabela 4.12- Expressão de PD-L1 e a sobrevida geral (Meses)

	Expressão de PD-L1	n	Média \pm Desvio Padrão	<i>p</i>
Sobrevida Geral	$\geq 50\%$	6	77,33 \pm 40,307	0,497
	$< 50\%$	18	63,67 \pm 42,401	

5. DISCUSSÃO

O carcinoma gástrico com estroma linfóide é um sub-tipo raro de cancro do estômago, mais frequente nos homens, constituindo cerca de 1-4% de todos os tipos de CG (18, 105). Histologicamente, estes tumores são caracterizados por um abundante infiltrado linfocitário no estroma, com uma distribuição relativamente uniforme (22). Estes tumores caracterizam-se ainda pelo bom prognóstico, com impacto na boa sobrevida dos doentes (17).

O principal objetivo deste estudo foi o de avançar na caracterização morfológica, imuno-histoquímica e molecular do CGEL, relativamente ao microambiente tumoral, infeção por EBV, instabilidade de microssatélites e expressão de PD-L1. Para a prossecução destes objetivos utilizaram-se varias técnicas de biologia molecular (PCR, eletroforese capilar, HIS) e de imuno-histoquímica e imunofluorescência (com dupla marcação).

Na primeira fase, o trabalho centrou-se na avaliação morfológica do CGEL, com análise das características histológicas e imuno-histoquímicas através utilização de pan-citoqueratina AE1/AE3. Verificou-se uma heterogeneidade morfológica intratumoral com existência de estruturas glandulares, cordonais, microglandulares e células neoplásicas pouco-coesas. Além disso, verificou-se que a maioria dos tumores era do tipo histológico “não classificável”, de acordo com a classificação de Lauren, apresentando um crescimento expansivo e permeação linfática. De uma forma geral os carcinomas gástricos são morfológicamente heterogéneos. Contudo, no sub-tipo de CGEL ainda não tinha sido avaliada, especificamente, a heterogeneidade morfológica intratumoral (1, 106).

Neste presente trabalho, foi também avaliado o perfil clinico-patológico dos doentes com CGEL, verificando-se um predomínio de doentes do sexo masculino (71%), com idade média de 65,4 anos e uma taxa média de sobrevida de 67,1 meses. Verificou-se ainda que a maioria dos tumores foi diagnosticada em estadios iniciais pTNM e que estes se localizavam preferencialmente no terço médio/superior do estômago. Estes resultados são concordantes com os de estudos anteriores, que demonstram que o CGEL tem melhor prognóstico em relação aos subtipos de CG, sem estroma linfóide e apresentam características clinico-patológicas distintas (34, 107, 108).

Foi também caracterizado o microambiente tumoral do CGEL, uma vez que este sub-tipo de CG é caracterizado pelo abundante infiltrado linfocitário intratumoral. Sabe-se que o microambiente tumoral é constituído maioritariamente por células imunes, particularmente por linfócitos T citotóxicos CD8+ e tem sido demonstrada a sua dupla função, como pro- e anti-

tumoral durante a tumorigênese (109). Múltiplos estudos têm relevado que as células imunes do microambiente tumoral quando interagem com as células malignas desencadeiam uma ação promotora da oncogênese (109, 110). Neste sentido avaliou-se o infiltrado linfocitário presente no CGEL, através da marcação imuno-histoquímica para os linfócitos T de tipo CD3+ e CD8+, utilizando o software *ImageJ*, para quantificar a expressão de CD3+ e CD8+ no centro e na periferia dos tumores. Na comparação da expressão de CD8+ e CD3+, no centro e na periferia do tumor, verificou-se que quer a expressão de CD8+ quer a expressão de CD3+ foi significativamente superior na periferia em relação ao centro. No entanto, um estudo no cancro colorretal, no qual se avaliou a expressão de CD8 no centro e periferia do tumor, verificou-se um predomínio de infiltrado linfóide CD8+ na periferia do tumor (111). Outro estudo recente mostrou que, no CG com IMS, a densidade de linfócitos está fortemente associada a estadios precoces e que esta densidade é mais baixa em estadios avançados (58). Uma explicação para este fato seria que o infiltrado de linfócitos T CD8+ e CD3+, quer no centro quer na periferia, estaria a exercer uma função anti-tumoral nas fases iniciais do desenvolvimento neoplásico. No CGEL, a elevada densidade de linfócitos (CD3+ e CD8+) em todos os estadios tumorais (tal como verificado no presente estudo) corrobora com esta interpretação. Contudo, importa salientar que a metodologia utilizada tem algumas limitações, uma vez que se baseia numa contagem não automatizada, suscetível à ocorrência de erros, justificando-se a utilização de métodos automatizados para validação dos resultados obtidos.

Numa segunda fase do trabalho avaliou-se a presença de infecção por EBV no CGEL. O EBV tem sido reconhecido como um dos agentes etiológicos na carcinogênese do GC, e a maioria dos casos de CGEL está fortemente associada a infecção por EBV (112). Chang M *et al* (113), demonstraram uma associação entre a infecção por EBV e o CGEL, tendo verificado que 80% dos casos de CGEL apresentavam infecção por EBV (113). No presente estudo verificou-se uma elevada taxa de infecção por EBV no CGEL (66,7%). Os resultados obtidos corroboram assim com as observações de estudos anteriores. Verificou-se também que a infecção por EBV estava presente apenas no núcleo das células epiteliais neoplásicas, tal como verificado pelo método de HIS.

O EBV pode ser classificado em EBV de tipo 1 e de tipo 2. Relativamente à amplificação do *EBNA2* por PCR, é de evidenciar que o gene *EBNA2*-EBV de tipo 1 é mais frequente do que o *EBNA2*-EBV de tipo 2 no CGEL, à semelhança do que se verificou no linfoma não Hodgkin (23). O EBV do tipo 1 é frequentemente detetado nos países em desenvolvimento e tem uma elevada eficiência na transformação dos linfócitos B em relação ao EBV do tipo 2 (23). Neste estudo, observou-se a infecção por EBV tipo 1 em todos os casos de CGEL analisados por *Nested* PCR para o gene *EBNA2*. Estes resultados sugerem que o EBV pode ser um agente causal na carcinogénese gástrica com uma ação precoce nas fases iniciais da oncogénese, podendo contribuir para a transformação maligna e expansão clonal das células neoplásicas (21, 22, 35).

No presente estudo foram utilizadas duas metodologias para detetar a infecção por EBV, nomeadamente a Hibridização *in situ* (HIS) e o PCR. Ambos os métodos apresentaram resultados semelhantes, contudo verificou-se uma pequena discrepância de resultados em 4 casos, sendo os casos negativos pelo método de PCR e positivos pelo método de HIS. As possíveis causas para justificar a discrepância de resultados, poderá ter sido devido à perda de integridade do DNA do tumor, para a sequência de *EBNA2*, durante a microdissecção da secção de tecido parafinado, assim como a própria heterogeneidade tumoral. Vários estudos têm revelado que a HIS é o método *Gold Standard* para a deteção de EBV, com alta especificidade e sensibilidade, permitindo localizar o RNA do EBV no núcleo das células neoplásicas, o que não é possível pela técnica de PCR (33). Na realidade, o PCR não permite esclarecer a localização do vírus em células epiteliais ou estromais. É, contudo, um método de aplicação fácil e mais barato que a HIS, podendo ter um papel no *screening* inicial de infecção por EBV, com utilização subsequente de HIS nos casos negativos por PCR. Recentemente, um estudo demonstrou que a HIS é suficiente para detetar a infecção por EBV (33). O presente estudo comprova as diversas vantagens da aplicação da HIS na deteção de EBV em relação ao PCR.

Comparou-se ainda a infecção por EBV com a expressão de CD3+ e CD8+, no centro e na periferia do tumor e verificou-se que a maioria dos tumores EBV positivos apresentava uma expressão de CD3+ e CD8+ significativamente superior, quer no centro quer na periferia do tumor, em relação aos tumores EBV negativos. Os resultados deste estudo e os dados da literatura sugerem que o infiltrado linfocitário abundante do CGEL pode ser secundário à infecção por EBV (114).

A resposta imune do hospedeiro tem sido apontada como um fator que limita o crescimento tumoral, com um impacto no prognóstico favorável do CGEL quando comparado ao de outros tipos de CG (115, 116).

Numa terceira fase do trabalho, avaliou-se a instabilidade de microssatélites neste subtipo de tumores, uma vez que o fenótipo de IMS-A tem sido descrito no CGEL, estando associado a uma melhor sobrevida em relação aos tumores com instabilidade de baixo grau ou sem instabilidade de microssatélites. Neste estudo, averiguou-se que apenas 4 casos apresentaram IMS-A, sendo os restantes estáveis. A frequência de IMS-A no CGEL foi de 16,7%, uma frequência relativamente elevada em relação à observada numa população chinesa em que se observou uma frequência de 8% de instabilidade de microssatélites numa série constituída por vários tipos de CG (117). Contudo, esta taxa de IMS-A (16,7%) pode ser justificada pelo fato desta série apresentar um elevado número de casos EBV positivos e estes dois subtipos moleculares serem mutuamente exclusivos (113). Outros estudos demonstraram que o infiltrado linfocitário tumoral no CGEL é mais abundante nos casos com IMS-A (114).

No presente estudo foi utilizado o PCR multiplex e eletroforese capilar para a pesquisa de instabilidade de microssatélites. Contudo, outros estudos têm demonstrado a utilidade da imuno-histoquímica para a pesquisa de instabilidade de microssatélites (48).

Verificou-se uma relação inversa entre a infecção por EBV e IMS, ou seja, não foi encontrado qualquer caso com positividade simultânea para a infecção por EBV e IMS-A. Os resultados obtidos são concordantes com os de estudos anteriores, que demonstraram uma possível relação mutuamente exclusiva entre a infecção por EBV e a IMS-A neste sub-tipo de CG (113). Em 2003, Chang *et al* sugeriram um papel importante da infecção por EBV e IMS na carcinogênese gástrica que, sendo independentes, podem desencadear mecanismos semelhantes no processo de desenvolvimento neoplásico (113).

A expressão de PD-L1 tem sido observada frequentemente no GC, tanto nas células neoplásicas como em células estromais, incluindo células imunes (118). A ligação de PD-L1 ao seu recetor PD-1 resulta na inativação dos linfócitos T que, inibidos da sua função, condiciona um défice de resposta imunológica do hospedeiro (119). Nestas circunstâncias, as células neoplásicas escapam à destruição pelo sistema imunológico (119). Esta fase do trabalho consistiu em avaliar o padrão de expressão de PD-L1 no CGEL.

Identificou-se expressão acentuada de PD-L1 ($\geq 50\%$) nas células neoplásica e estromais em 25% dos casos. Verificou-se que a expressão de PD-L1 era heterogénea. A literatura apresenta também resultados heterogéneos em grande parte devido a diferentes critérios de avaliação (percentagem de células com imunoreactividade, intensidade da imunoreactividade, tipo de células epiteliais ou estromais). Por exemplo, Thompson *et al* verificaram que apenas 12% das células neoplásicas exibiam expressão membranar de PD-L1, enquanto 44% das células imunes do estroma expressavam PD-L1 (118). Neste estudo, a positividade dos casos foi considerada tendo em conta a expressão de PD-L1 tanto nas células neoplásicas como nas células imunes do estroma (118). Num outro estudo recente, publicado pelo Böger *et al*, verificou-se que 30,0% dos casos tinha expressão de PD-L1 nas células neoplásicas, enquanto 88,4% dos casos tinham expressão de PD-L1 apenas nas células imunes, embora ambos os padrões tenham sido considerados positivos (104).

Deste modo, tem-se verificado uma necessidade em estabelecer critérios de avaliação de PD-L1 no GC, principalmente o limiar de positividade com impacto biológico que permita identificar os doentes que podem beneficiar de tratamento com inibidores do *checkpoint* imunológico (118).

Apesar da heterogeneidade de expressão de PD-L1, os resultados obtidos demonstram que neste subtipo de CG em particular, a expressão de PD-L1 é bem acentuada, o que os tornam alvo potencial a resposta ao bloqueio com inibidores do *checkpoint* imunológico.

No presente trabalho, a co-localização de PD-L1/AE1/AE3 nas células epiteliais neoplásicas e de PD-L1/CD68 nos macrófagos realizou-se com recurso à técnica de imunofluorescência com dupla marcação. Os resultados obtidos demonstraram de facto a existência de co-expressão de PD-L1 nas células neoplásica e nos macrófagos. A técnica de imunofluorescência-dupla marcação demonstrou ser uma técnica de grande utilidade para avaliação diferencial da expressão de PD-L1, sendo uma mais-valia como critério de seleção dos doentes que possam beneficiar da imunoterapia.

A expressão de PD-L1 tem sido demonstrada associada a infecção por EBV e a instabilidade de microssatélites nos carcinomas gástricos (13, 83, 120). Neste presente estudo foi também avaliada a relação entre a expressão de PD-L1, infecção por EBV e a IMS-A. Verificou-se que nos 6 casos com expressão aumentada de PD-L1 ($\geq 50\%$) havia infecção por EBV (n=4) ou IMS-A (n=2). Estes resultados estão de acordo com a nova classificação molecular do CG que individualiza o grupo de CGEL, e nele descreve a infecção por EBV e o aumento de expressão/amplificação de PD-L1 (13).

No presente estudo foi também avaliada a relação entre a expressão de PD-L1 e a quantidade de infiltrado linfocitário, não se tendo encontrado associações significativas. Isto é, a expressão de PD-L1 não influencia a densidade de infiltrado linfocitário no microambiente tumoral. Kim *et al* não observaram uma associação significativa entre a expressão de moléculas imunossupressoras (PD-L1, CTLA-4) e a densidade de células imunes no microambiente tumoral, corroborando assim com as observações feitas no presente trabalho (118, 121).

Por outro lado, num estudo recente demonstrou-se que o aumento da densidade de linfócitos CD8+ se associa ao aumento de expressão de PD-L1, nas células neoplásicas e estromais, indicando assim a ocorrência de um mecanismo de resistência imune adaptativa (118).

Foi também avaliada a sobrevida dos doentes com CGEL em função de expressão de PD-L1, não se tendo encontrado uma diferença significativa na sobrevida dos doentes, em função de expressão de PD-L1. Porém, estudos têm demonstrado uma forte associação entre a expressão de PD-L1 e a sobrevida global e/ou intervalo livre de doença nos doentes com CGEL (118).

Dada a dimensão da amostra (n=24), torna-se assim importante a validação dos resultados obtidos em séries alargadas de CGEL.

6. CONCLUSÕES FINAIS

Com este trabalho mostramos uma caracterização mais detalhada das características do CGEL, nomeadamente perfil clínico-patológico, resposta imune (caracterização do estroma linfóide e expressão de PD-L1), infecção por EBV e instabilidade de microssatélites.

De uma forma sumariada, podemos concluir que o CGEL se caracteriza por perfil clínico-patológico particular, uma taxa elevada de infecção por EBV (66,7%) e sobreexpressão de PD-L1 em 25% dos tumores. A expressão elevada de PD-L1 em casos com infecção por EBV ou IMS-A, coaduna-se com as características de dois dos sub-tipos de CG individualizados na nova classificação molecular do CG, para os quais é proposta terapêutica dirigida ao *checkpoint* imunológico.

As diversas metodologias utilizadas neste estudo (HIS, PCR, imuno-histoquímica, imunofluorescência) revelaram-se imprescindíveis para a caracterização mais precisa do CGEL revelando-se úteis para a identificação dos casos em que os doentes poderão beneficiar de terapêutica dirigida a elementos do *checkpoint* imunológico.

Este trabalho permitiu um avanço na caracterização do CGEL, relativamente à heterogeneidade morfológica intratumoral e resposta imune (caracterização do estroma linfóide e expressão de PD-L1), que ainda não tinha sido avaliado em estudos prévios.

Os resultados deste estudo contribuem para consolidar o conceito de que o CGEL associado à infecção por EBV é um alvo potencial para imunoterapia dirigida ao *checkpoint* imunológico.

7.PERSPETIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras, salienta-se a necessidade de estudar séries mais alargadas de CGEL e de utilizar técnicas mais automatizadas e precisas para a caracterização da população linfóide (incluindo análise de imagem, assim como caracterização molecular da resposta linfóide), metodologias já em implantação no laboratório onde se realizou este trabalho. Uma última palavra para mencionar a necessidade de esclarecer melhor os mecanismos subjacentes à expressão aumentada de PD-L1 no CGEL, estando em curso a pesquisa de amplificação do gene que codifica o PD-L1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lauwers GY, Carneiro F, Graham DY, Curado MP, Franceschi S, Montgomery E, et al. Tumours of the stomach: Gastric Carcinoma WHO classification of tumours of the digestive system: World Health Organization; 2010. p. 46-58.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-E86.
3. Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2006;12(3):354-62.
4. RORENO. Registo Oncológico Nacional 2010 2016.
5. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2014;23(5):700-13.
6. Patru C, Surlin V, Georgescu I, Patru E. Current issues in gastric cancer epidemiology. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2013;117(1):199-204.
7. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist*. 2007;12(1):20-37.
8. Setia N, Agoston AT, Han HS, Mullen JT, Duda DG, Clark JW, et al. A protein and mRNA expression-based classification of gastric cancer. *Mod Pathol*. 2016;29(7):772-84.
9. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma, an attempt at a histoclinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.
10. Carneiro F. Classification of gastric carcinomas. *Current Diagnostic Pathology*. 1997;4(1):51-9.
11. Ma J, Shen H, Kapesa L, Zeng S. Lauren classification and individualized chemotherapy in gastric cancer (Review). *Oncology letters*. 2016;11(5):2959-64.
12. Qiu MZ, Cai M-Y, Zhang D-S, Wang Z-Q, Wang D-S, Li Y-H, et al. Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *Journal of translational medicine*. 2013;11(1):58.
13. The Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.
14. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501(7467):338-45.

15. Lim B, Kim J-H, Kim M, Kim S-Y. Genomic and epigenomic heterogeneity in molecular subtypes of gastric cancer. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(3):1190.
16. Grabsch HI, Tan P. Gastric cancer pathology and underlying molecular mechanisms. *Digestive surgery*. 2013;30(2):150-8.
17. Watanabe H, Enjoji M, Imai T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer*. 1976;38(1):232-43.
18. Nakamura S, Ueki T, Yao T, Ueyama T, Tsuneyoshi M. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. Special reference to its detection by the polymerase chain reaction and *in situ* hybridization in 99 tumors, including a morphologic analysis. *Cancer*. 1994;73(9):2239-49.
19. Chijioke O, Azzi T, Nadal D, Münz C. Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *Journal of leukocyte biology*. 2013;94(6):1185-90.
20. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *The Lancet*. 1964;283(7335):702-3.
21. Matsunou H, Konishi F, Hori H, Ikeda T, Sasaki K, Hirose Y, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer*. 1996;77(10):1998-2004.
22. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 1992;140(4):769-74.
23. Hassan R, White LR, Stefanoff CG, de Oliveira DE, Felisbino FE, Klumb CE, et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol*. 2006;1:17.
24. Shinozaki-Ushiku A, Kunita A, Fukayama M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (Review). *International journal of oncology*. 2015;46(4):1421-34.
25. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M, Yoshiyama H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses*. 2012;4(12):3420-39.
26. Abe H, Kaneda A, Fukayama M. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: Use of Host Cell Machineries and Somatic Gene Mutations. *Pathobiology*. 2015;82(5):212-23.
27. Tokunaga M, Land C, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *The American journal of pathology*. 1993;143(5):1250.

28. Burke A, Yen T, Shekitka K, Sobin L. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 1990;3(3):377-80.
29. Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am J Pathol.* 1991;139(3):469-74.
30. Akiba S, Koriyama C, Herrera-Goepfert R, Eizuru Y. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: Epidemiological and clinicopathological features. *Cancer science.* 2008;99(2):195-201.
31. Fukayama M, Ushiku T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathology-Research and Practice.* 2011;207(9):529-37.
32. Camargo M, Murphy G, Koriyama C, Pfeiffer R, Kim W, Herrera-Goepfert R, et al. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *British journal of cancer.* 2011;105(1):38-43.
33. Chen XZ, Chen H, Castro FA, Hu JK, Brenner H. Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(20):e792.
34. Park S, Choi M-G, Kim K-M, Kim HS, Jung S-H, Lee JH, et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma: a distinct type of gastric cancer. *Journal of Surgical Research.* 2015;194(2):458-63.
35. Osato T, Imai S. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 1996;7(4):175-82.
36. Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, et al. Origin of Microsatellite Instability in Gastric Cancer. *The American Journal of Pathology.* 155(1):205-11.
37. Chong J-M, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, et al. Microsatellite Instability in the Progression of Gastric Carcinoma. *Cancer Research.* 1994;54(17):4595-7.
38. Eshleman JR, Markowitz SD. Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Human molecular genetics.* 1996;5(Supplement 1):1489-94.
39. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 1993;260(5109):812-6.

40. Janavicius R, Matiukaite D, Jakubauskas A, Griskevicius L. Microsatellite instability detection by high-resolution melting analysis. *Clinical chemistry*. 2010;56(11):1750-7.
41. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2006;8(3):305-11.
42. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer research*. 1999;59(1):159-64.
43. Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer research*. 1999;59(5):1090-5.
44. Han H-J, Yanagisawa A, Kato Y, Park J-G, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer research*. 1993;53(21):5087-9.
45. Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, et al. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *The American journal of pathology*. 1999;155(1):205-11.
46. Seo HM, Chang YS, Joo SH, Kim YW, Park YK, Hong SW, et al. Clinicopathologic characteristics and outcomes of gastric cancers with the MSI-H phenotype. *Journal of surgical oncology*. 2009;99(3):143-7.
47. Lee HS, Im Choi S, Lee HK, Kim HS, Yang H-K, Kang GH, et al. Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Modern pathology*. 2002;15(6):632-40.
48. Bae YS, Kim H, Noh SH, Kim H. Usefulness of Immunohistochemistry for Microsatellite Instability Screening in Gastric Cancer. *Gut Liver*. 2015;9(5):629-35.
49. Marrelli D, Polom K, Pascale V, Vindigni C, Piagnerelli R, De Franco L, et al. Strong prognostic value of microsatellite instability in intestinal type non-cardia gastric cancer. *Annals of surgical oncology*. 2016;23(3):943-50.
50. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346-54.

51. Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*. 117(5):1137-46.
52. Subhash VV, Yeo MS, Tan WL, Yong WP. Strategies and advancements in harnessing the immune system for gastric cancer immunotherapy. *Journal of immunology research*. 2015;2015.
53. Matsueda S, Graham DY. Immunotherapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1657-66.
54. Chang W-J, Du Y, Zhao X, Ma L-Y, Cao G-W. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(16):4586-96.
55. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001;61(13):5132-6.
56. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol*. 2003;33(10):2706-16.
57. Schumacher K, Haensch W, Röefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8+ T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer research*. 2001;61(10):3932-6.
58. Kim K-J, Lee KS, Cho HJ, Kim YH, Yang HK, Kim WH, et al. Prognostic implications of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells and CD8+ cytotoxic T cells in microsatellite-unstable gastric cancers. *Human pathology*. 2014;45(2):285-93.
59. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(16):3491-4.
60. Lertprasertsuke N, Tsutsumi Y. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Virchows Archiv A*. 1989;414(3):231-41.
61. Raufi AG, Klempner SJ. Immunotherapy for advanced gastric and esophageal cancer: preclinical rationale and ongoing clinical investigations. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(5):561-9.
62. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(10):715-27.

63. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008;99(10):1704-11.
64. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
65. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
66. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. 2014;27:16-25.
67. Ahmad M, Rees RC, Ali SA. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2004;53(10):844-54.
68. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-48.
69. Murphy A, Kelly RJ. Immunotherapy in Upper GI Malignancies. *Current Treatment Options in Oncology*. 2015;16(5):1-15.
70. Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, et al. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. *Gastric Cancer*. 2016;19(2):466-71.
71. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-95.
72. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704.
73. Carter LL, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *European Journal of Immunology*. 2002;32(3):634-43.
74. Ahearne MJ, Bhuller K, Hew R, Ibrahim H, Naresh K, Wagner SD. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Virchows Archiv*. 2014;465(3):351-8.

75. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *European journal of immunology*. 2003;33(10):2706-16.
76. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine*. 2002;8(8):793-800.
77. Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, Elkum N, Bin Amer SM, Al-Tweigeri T, et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *Int J Cancer*. 2007;121(4):751-8.
78. Strome SE, Dong HD, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Research*. 2003;63(19):6501-5.
79. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(5):336-47.
80. Pardoll DM. The blockade of immune *checkpoints* in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64.
81. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang X-G, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta histochemica*. 2006;108(1):19-24.
82. Zhang L, Qiu M, Jin Y, Ji J, Li B, Wang X, et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression on gastric cancer and its relationship with clinicopathologic factors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11084-91.
83. Qing Y, Li Q, Ren T, Xia W, Peng Y, Liu G-L, et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:901-9.
84. Dong M, Wang H-y, Zhao X-x, Chen J-n, Zhang Y-w, Huang Y, et al. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Human pathology*. 2016;53:25-34.
85. Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202-9.
86. Jiang D, Xu Y-y, Li F, Xu B, Zhang X-g. The role of B7-H1 in gastric carcinoma: clinical significance and related mechanism. *Medical Oncology*. 2014;31(11):1-7.

87. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(26):2455-65.
88. de Guillebon E, Roussille P, Frouin E, Tougeron D. Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers. *World journal of gastrointestinal oncology*. 2015;7(8):95.
89. Raufi AG, Klempner SJ. Immunotherapy for advanced gastric and esophageal cancer: preclinical rationale and ongoing clinical investigations. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2015;6(5):561.
90. Moehler M, Delic M, Goepfert K, Aust D, Grabsch HI, Halama N, et al. Immunotherapy in gastrointestinal cancer: Recent results, current studies and future perspectives. *Eur J Cancer*. 2016;59:160-70.
91. Ferro AB. *Imunohistoquímica*. Amadeu Borges Ferro; 2014.
92. DAKO. *Immunohistochemical Staining Methods*: Dako Denmark A/S, An Agilent Technologies Company; 2013.
93. Systems VM. *OptiView Detection Chemistry*. 2011.
94. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols: a guide to methods and applications*: Academic press; 2012.
95. Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. *Molecular diagnostic PCR handbook*: Springer Science & Business Media; 2005.
96. Garibyan L, Avashia N. *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(3):e6-e.
97. Scientific TF. *PCR Methods—Top Ten Strategies*. In: <https://www.thermofisher.com/pt>, editor.
98. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2d ed Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989.
99. Ambinder RF, Mann RB. Epstein-Barr-encoded RNA *in situ* hybridization: diagnostic applications. *Human pathology*. 1994;25(6):602-5.
100. System VM. *INFORM EBER (Epstein-Barr Virus Early RNA) Probe*. In: Roche, editor. 2012.
101. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):279-92.

102. Park JH, Kim EK, Kim YH, Kim J-H, Bae YS, Lee YC, et al. Epstein–Barr virus positivity, not mismatch repair-deficiency, is a favorable risk factor for lymph node metastasis in submucosa-invasive early gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2015;1-11.
103. Systems VM. Ventana ISH iView Blue Detection Kit. 2012.
104. Böger C, Behrens HM, Mathiak M, Kruger S, Kalthoff H, Rocken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016;7(17):24269-83.
105. Oda K, Tamaru J, Takenouchi T, Mikata A, Nunomura M, Saitoh N, et al. Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. *The American journal of pathology*. 1993;143(4):1063.
106. Carneiro F LG. Epithelial tumours of the stomach. In: Morson and Dawson's. In: Shepherd N WB, Williams G, Greenson J, Lauwers G and Novelli M, editor. *Gastrointestinal Pathology*. Fifth Edition
ed: Blackwell Publishing Ltd; 2013. p. 180-222.
107. Cheng N, Hui D-y, Liu Y, Zhang N-n, Jiang Y, Han J, et al. Is gastric lymphoepithelioma-like carcinoma a special subtype of EBV-associated gastric carcinoma? New insight based on clinicopathological features and EBV genome polymorphisms. *Gastric Cancer*. 2015;18(2):246-55.
108. Xu Q, Du J, Liu B. Lymphoepithelioma-like gastric carcinoma located in the lesser curvature of the gastric body: A case report and review of the literature. *Molecular and Clinical Oncology*. 2016;4(3):405-8.
109. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer letters*. 2015;368(1):7-13.
110. Shiao SL, Ganesan AP, Rugo HS, Coussens LM. Immune microenvironments in solid tumors: new targets for therapy. *Genes & development*. 2011;25(24):2559-72.
111. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(26):2509-20.
112. Cheng N, Hui D-y, Liu Y, Zhang N-n, Jiang Y, Han J, et al. Is gastric lymphoepithelioma-like carcinoma a special subtype of EBV-associated gastric carcinoma? New insight based on clinicopathological features and EBV genome polymorphisms. *Gastric Cancer*. 2015;18(2):246-55.

113. Chang MS, Lee HS, Kim HS, Kim SH, Choi SI, Lee BL, et al. Epstein–Barr virus and microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *The Journal of pathology*. 2003;199(4):447-52.
114. Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, Halling KC, Smyrk TC. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Modern pathology*. 2003;16(7):641-51.
115. Yoon S, Lee SJ, Chae YS, Kang BW, Kim JG, Seo AN, et al., editors. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer. *ASCO Annual Meeting Proceedings*; 2015.
116. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
117. Huang Y-q, Yuan Y, Ge W-t, Hu H-g, Zhang S-z, Zheng S. Comparative features of colorectal and gastric cancers with microsatellite instability in Chinese patients. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2010;11(9):647-53.
118. Thompson ED, Zahurak M, Murphy A, Cornish T, Cuka N, Abdelfatah E, et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut*. 2016:gutjnl-2015-310839.
119. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27(1):111-22.
120. Jiang D, Xu YY, Li F, Xu B, Zhang XG. The role of B7-H1 in gastric carcinoma: clinical significance and related mechanism. *Med Oncol*. 2014;31(11):268.
121. Kim JW, Nam KH, Ahn S-H, Park DJ, Kim H-H, Kim SH, et al. Prognostic implications of immunosuppressive protein expression in tumors as well as immune cell infiltration within the tumor microenvironment in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2016;19(1):42-52.

9. ANEXOS

Anexo 9.1- Protocolo de IHQ para o anticorpo AE1/AE3

Protocolo N° 12: AE1/AE3 Gilza (07-06-2017)

Procedimento: U OptiView DAB IHC v5 (v1.00.0117)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Hospital São João, EPE, Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto, PORTUGAL

Protocolo N° 12

- 1 Parafina [Seleccionado]
- 2 Desparafinação [Seleccionado]
- 3 Aquecer Lâmina até [72 ° C] a partir de Temperaturas médias (Desparafinação)
- 4 Enzima de pré-condicionamento celular [Seleccionado]
- 5 Aplicar uma gota de [PROTEASE 3] (Enzima), Aplicar coverslip e incubar [4 minutos]
- 6 Cell Conditioning [Seleccionado]
- 7 Ultra CC1 [Seleccionado]
- 8 Aquecer lâmina a [100 °C], e Incubar durante 4 minutos (Cell Conditioner #1)
- 9 Opção [Seleccionado]
- 10 Aplicar uma gota de [OPTION 1] (Opção), Aplicar coverslip e incubar [8 minutos]
- 11 Anticorpo primário [Seleccionado]
- 12 Temperatura do anticorpo primário [Seleccionado]
- 13 Aquecer Lâmina até [37 ° C] (Anticorpo primário)
- 14 Titulação do anticorpo [Seleccionado]
- 15 Hans Apply (Anticorpo primário), and Incubate for [0 H 8 Min]
- 16 Contrastante [Seleccionado]
- 17 Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN] (Contrastante), Aplicar coverslip e incubar [8 minutos]
- 18 Pós-contrastante [Seleccionado]
19. **Aplicar** uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar cover slip e incubar [4 minutos]

Anexo 9.2- Protocolo de IHQ para o anticorpo PD-L1

Protocolo Nº 11: PD-L1 Gilza (07-06-2017)

Procedendo: U *Opti View* DAB IHC v5 (v1.00.0117)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Hospital São João, EPE, Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto, PORTUGAL

Protocolo Nº 11

- 1 Parafina [Seleccionado]
- 2 Desparafinação [Seleccionado]
- 3 Aquecer Lâmina até [72 ° C] a partir de Temperaturas médias (Desparafinação)
- 4 Cell Conditioning [Seleccionado]
- 5 Ultra CC1 [Seleccionado]
6. Aquecer lâmina a [100 Cã], e. Incubar durante 4 minutos (Cell Condicione #1)
- 7 CC1 8 Min [Seleccionado]
- 8 CC1 16 Min [Seleccionado]
- 9 CC1 24 Min [Seleccionado]
- 10 CC1 32 Min [Seleccionado]
- 11 CC1 40 Min [Seleccionado]
- 12 CC1 48 Min [Seleccionado]
- 13 CC1 56 Min [Seleccionado]
- 14 CC1 64 Min [Seleccionado]
- 15 Inibidor de peroxidase pré-primário [Seleccionado]
- 16 Anticorpo primário [Seleccionado]
- 17 Titulação do anticorpo [Seleccionado]
- 18 Hand Apply (Anticarbon primary), and Incubate for [0 H 32 Min]
- 19 *OptiView* Amplificativo [Seleccionado]
- 20 Aplicar uma Gota de OV AMP H2O2 e uma Gota de OV AMPLIFIER, Aplicar Cover slip, Incubar durante [4 minutos]
- 21 Aplicar uma Gota de OV AMP MULTIMER, Aplicar Cover slip, e. Incubar durante [4 minutos]
22. Contrastante [Seleccionado]
23. Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN] (Contrastante), Aplicar cover slip e incubar [8 minutos]
- 24 Pós-contrastante [Seleccionado]
25. Aplicar uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar cover slip e incubar [4 minutos]

Anexo 9.3- Protocolo de IHQ para o anticorpo CD8

Protocolo N° 13: CD8 Gilza (07-06-2017)

Procedimento: U *OptiView* DAB IHC v5 (v1.00.0117)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Hospital São João, EPE, Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto, PORTUGAL

Protocolo N° 13

- 1 Parafina [Seleccionado]
- 2 Desparafinação [Seleccionado]
- 3 Aquecer Lâmina até [72 ° C] a partir de Temperaturas médias (Desparafinação)
- 4 Cell Conditioning [Seleccionado]
- 5 Ultra CC1 [Seleccionado]
6. Aquecer lâmina a [100 Cã], e. Incubar durante 4 minutos (Cell Condicione #1)
- 7 CC1 8 Min [Seleccionado]
- 8 CC1 16 Min [Seleccionado]
- 9 CC1 24 Min [Seleccionado]
- 10 CC1 32 Min [Seleccionado]
- 11 CC1 40 Min [Seleccionado]
- 12 CC1 48 Min [Seleccionado]
- 13 CC1 56 Min [Seleccionado]
- 14 Inibidor de peroxidase pré-primário [Seleccionado]
- 15 Anticorpo primário [Seleccionado]
- 16 Temperatura do anticorpo primário [Seleccionado]
- 17 Aquecer Lâmina até [37 ° C] (Anticorpo primário)
- 18 Titulação do anticorpo [Seleccionado]
- 19 Hans Apple (Anticorpo primário), anda. Incuba-te for [0 H 24 Min]
20. Contrastante [Seleccionado]
21. Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN] (Contrastante), Aplicar cover slip e incubar [8 minutos]
- 22 Pós-contrastante [Seleccionado]
- 23 Aplicar uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar cover slip e incubar [4 minutos]

Anexo 9.4- Protocolo de IHQ para o anticorpo CD3

Protocolo N° 67: CD3 Gilza (07-06-2017)

Procedimento: U *OptiView* DAB IHC v5 (v1.00.0117)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Hospital São João, EPE, Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto, PORTUGAL

Protocolo N° 67

- 1 Parafina [Seleccionado]
- 2 Desparafinação [Seleccionado]
- 3 Aquecer Lâmina até [72 °C] a partir de Temperaturas médias (Desparafinação)
- 4 Cell Conditioning [Seleccionado]
- 5 Ultra CC1 [Seleccionado]
- 6 Aquecer lâmina a [100 °C], e Incubar durante 4 minutos (Cell Conditioner #1)
- 7 CC1 8 Min [Seleccionado]
- 8 CC1 16 Min [Seleccionado]
- 9 CC1 24 Min [Seleccionado]
- 10 CC1 32 Min [Seleccionado]
- 11 Inibidor de peroxidase pré-primário [Seleccionado]
- 12 Anticorpo primário [Seleccionado]
- 13 Temperatura do anticorpo primário [Seleccionado]
- 14 Aquecer Lâmina até [37 °C] (Anticorpo primário)
- 15 Titulação do anticorpo [Seleccionado]
- 16 Hand Apply (Anticorpo primário), and Incubate for [0 H 28 Min]
- 17 *OptiView* HRP Multimer [Seleccionado]
- 18 Contrastante [Seleccionado]
- 19 Aplicar uma gota de [HEMATOXYLIN] (Contrastante), Aplicar coverslip e incubar [8 minutos]
- 20 Pós-contrastante [Seleccionado]
- 21 Aplicar uma gota de [BLUING REAGENT] (Pós-contrastante), Aplicar coverslip e incubar [4 minutos]

Anexo 9.5- Protocolo de recuperação antigénica para a técnica de imunofluorescência-dupla marcação.

Resumo do protocolo

Procedimento: U OptiView DAB IHC v5 (v1.00.0117)

BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module

Hospital São João, EPE, Alameda Prof. Hernâni Monteiro 4200-319 Porto, PORTUGAL

Protocolo Nº30	Protocolo: CC1 Recuperação	7-03-2016
-----------------------	-----------------------------------	------------------

- 1 Parafina [Seleccionado]
- 2 Desparafinação [Seleccionado]
- 3 Aquecer Lâmina até [72 ° C] a partir de Temperaturas médias (Desparafinação)
- 4 Cell Conditioning [Seleccionado]
- 5 Ultra CC1 [Seleccionado]
- 6 Aquecer lâmina a [95 ° C], e Incubar durante 4 minutos (Cell Conditioner #1)
- 7 CC1 8 Min [Seleccionado]
- 8 CC1 16 Min [Seleccionado]
- 9 CC1 24 Min [Seleccionado]
- 10 CC1 32 Min [Seleccionado]
- 11 CC1 40 Min [Seleccionado]
- 12 CC1 48 Min [Seleccionado]
- 13 CC1 56 Min [Seleccionado]
- 14 CC1 64 Min [Seleccionado]
- 15 Inibidor de peroxidase pré-primário [Seleccionado].