

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS PROGENITORAS EM
CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS TUMORAIS DE CÂNCER DE MAMA**

Emyle da Silva Brum

Caxias do Sul

2020

EMYLE DA SILVA BRUM

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando
à obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Mariana Roesch Ely

Co-orientadora: Dra. Daniela Steffens Vergani

Caxias do Sul

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

B893a Brum, Emyle da Silva

Avaliação de marcadores de células progenitoras em cultura primária de células tumorais de câncer de mama [recurso eletrônico] / Emyle da Silva Brum – 2020.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Orientação: Mariana Roesch Ely.

Coorientação: Daniela Steffens Vergani.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Mama - Câncer. 2. Epidemiologia. 3. Metástase. 4. Células-tronco. I. Mariana Roesch, orient. II. Vergani, Daniela Steffens, coorient. III. Título. Ely,

CDU 2. ed.: 618.19-006

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

EMYLE DA SILVA BRUM

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS
PROGENITORAS EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS
TUMORAIS DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Steffens Vergani

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04 DE AGOSTO DE 2020.

Orientador: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Steffens Vergani

Prof. Dra. Liliana Rockenbach

Prof. Dra. Patricia Kelly Wilmsen Dalla Santa Spada

Profa. Dra. Mirian Salvador

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1Epidemiologia geral para câncer de mama	11
2.2 Considerações sobre carcinoma ductal <i>in situ</i>.....	12
2.3 Expressão imunohistoquímica de marcadores preditivos para câncer de mama	15
2.3.1 Receptores de ER e PR.....	17
2.3.2 Receptor Andrógeno.....	19
2.3.3 HER2	20
2.3.4 Ki67	21
2.4 Subtipos moleculares dos carcinomas de mama	23
2.4.1 Luminal A	23
2.4.2 Luminal B (HER2-).....	23
2.4.3 HER2	24
2.5 Um tipo especial de carcinoma de mama: triplo negativo	26
2.6 Capacidade metastática dos tumores de mama e sua relação com células-tronco	28
2.7 Considerações sobre o ciclo celular e tumores de mama	33
2.8 Células-tronco cancerígenas e câncer de mama	34
2.8.1 Marcadores moleculares de células-tronco de câncer de mama	36
2.9 Citometria de fluxo.....	39
3 OBJETIVOS	41

3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4 MATERIAS E MÉTODOS	43
4.1 Pacientes	43
4.2 Comitê de ética em pesquisa	43
4.3 Amostras tumorais	43
4.4 Classificação dos tumores	44
4.5 Análise imunohistoquímica dos antígenos ER, PR, HER2 e Ki67 em peça cirúrgica.....	44
4.6 Cultivo celular primário de tumores de mama	45
4.7 Isolamento de células-tronco.....	46
4.8 Análise morfológica das culturas celulares	46
4.9 Análise imunofenotípica das células cultivadas.....	47
5 RESULTADOS	49
5.1 Amostras tumorais e classificação dos tumores	49
5.2 Análise imunoistoquímica dos antígenos ER, PR, HER2 e Ki67 em peça cirúrgica.....	50
5.3 Cultivo celular primário de tumores de mama e isolamento de células-tronco: análise morfológica das culturas celulares	52
5.4 Análise imunofenotípica das células cultivadas.....	55
5.5 Relação da expressão dos marcadores moleculares de células-tronco/progenitoras com o padrão de expressão imunohistoquímica e estadiamento do tumor	60
5.6 Análise do desfecho clínico dos pacientes	60
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO.....	74
8 PERSPECTIVAS	76

BIBLIOGRAFIA	77
ANEXOS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AR (receptor andrógeno, do inglês *androgen receptor*)
ASCO (Sociedade Americana de Oncologia, do inglês *American Society of Clinical Oncology*)
BL1 (basal 1)
BL2 (basal 2)
CAP (Colégio Americano de Patologia, do inglês *College of American Pathologists*)
CD (glicoproteínas marcadoras de superfície, do inglês *cluster of differentiation*)
CDK (quinases dependentes de ciclina, do inglês *cyclin-dependent kinase*)
Ck (citoqueratina, do inglês *cytokeratin*)
CM (câncer de mama)
CMCM (célula metastática de câncer de mama)
CSC (células-tronco cancerosas, do inglês *cancer stem cell*)
CTC (células tumorais circulantes)
EGFR (receptores de fatores de crescimento epitelial, do inglês *epithelial growth factorreceptor*)
EMT (transição epitélio-mesenquimal, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*)
ER (receptor de estrogênio, do inglês *estrogen receptor*)
HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (erbB-2) do inglês, *human epidermal receptor 2*)
INCA (Instituto Nacional de Câncer)
LAR (receptor andrógeno luminal, do inglês *luminal androgen receptor*)
M (mesenquimal)
MSL (tronco-mesenquimal, do inglês *mensechymal steam*)
PR (receptor de progesterona, do inglês *progesterone receptor*)
TNBC (câncer de mama triplo negativo, do inglês *triple negative breast cancer*)

RESUMO

O câncer de mama (CM) é uma doença que se apresenta como diferentes subtipos, Luminal A e B, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e triplo negativo. As células-tronco cancerosas (CSC) constituem uma subpopulação de células embrionárias indiferenciadas com características particulares dentro do tumor e são as principais contribuintes para o desenvolvimento e progressão da doença. Além disso, este tipo celular foi correlacionado com a capacidade de conduzir metástases. Até o momento já foram descritos diversos marcadores moleculares de CSC, porém sem aplicabilidade clínica, uma vez que dados que correlacionem com os subtipos moleculares do CM são escassos. Assim sendo, faz-se necessário investigações de biomarcadores específicos, precisos e sensíveis, particularmente para contribuir e elucidar melhor o entendimento dos diferentes subtipos de tumores de mama. O objetivo principal deste estudo é traçar um perfil de avaliação das propriedades funcionais moleculares de células displásicas e tumorais de mama submetidas a cultivo celular. Neste estudo foram avaliadas 6 pacientes com diagnóstico de câncer ductal de mama. As amostras provenientes de cirurgias de quadrantectomia ou mastectomia foram classificadas de acordo com sua malignidade. Além disso, realizou-se avaliação imunohistoquímica, o que possibilitou classificá-las como: subtipo Luminal A (n=1), Luminal B (n=4) e HER2 positiva (n=1). Foi realizado cultivo de células tumorais e benignas das amostras cirúrgicas, nas quais foram identificados marcadores moleculares de CSC. Observou-se um aumento de CD44 e Ck e redução de CD24 na amostra de isolamento tumoral quando comparado com a benigna. Em relação a diferentes subtipos de CM, foi encontrado valores de CD44, CD24 e Ck menores para o subtipo HER2+ do que para o Luminal B. A análise desses biomarcadores permitiu relacionar com o estadiamento do tumor, subtipo molecular, pior prognóstico e conduta clínica das pacientes. O entendimento da expressão dos biomarcadores de CSC permitirá, futuramente, proporcionar um diagnóstico mais preciso e prognóstico mais direcionado a cada condição e subtipo tumoral, além da estratificação das pacientes de acordo com o risco de desenvolvimento de metástases.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é o câncer mais comumente diagnosticado em mulheres e a quinta causa de morte por câncer no mundo (Moloney et al., 2020; Xiaoxian et al., 2017), sendo a neoplasia maligna mais prevalente entre a população feminina (Afzal et al., 2019; SIEGEL et al., 2016). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020), ocorreram 66.280 novos casos no Brasil, correspondendo a 29,7% das neoplasias no sexo feminino (MS / INCA / Estimativa de câncer no Brasil, 2020). Os índices de mortalidade conforme a localização primária do tumor até o ano de 2017 chegavam a 16,1% no Brasil anualmente (INCA, 2019).

Anualmente, são diagnosticados aproximadamente 1,67 milhão de casos de CM invasivo (Moloney et al., 2020). Pesquisas sobre o CM revelaram que os mecanismos moleculares e as vias de sinalização que regulam as funções das células-tronco cancerosas (CSC), uma subpopulação de células embrionárias indiferenciadas com características particulares dentro do tumor, são compartilhadas com células malignas (Oliphant et al., 2020) e podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da doença (Chiotaki et al., 2016). Essas células foram detectadas em tumores primários e metastáticos e foram correlacionadas com a capacidade de conduzir metástases (Yang et al., 2020; LI et al., 2012). A resistência das CSC à quimioterapia convencional acaba levando a recorrência do tumor inicial, associado aos parâmetros clínicos, sendo que as propriedades biológicas características dessas células as tornam resistentes à quimioterapia convencional (Wu et al., 2020; LI et al., 2008).

Nos últimos anos há um constante crescimento na busca pelo conhecimento das células-tronco e seu potencial tumorigênico. Um maior entendimento da capacidade proliferativa dessas células traria benefícios para o tratamento de diversas patologias (Wu et al., 2020). Somado aos desafios envolvidos no manejo de pacientes que são diagnosticados com CM, principalmente os diagnósticos tardios, buscam-se novos tratamentos que sejam acessíveis a toda a população. Diante da premissa de que o tratamento quimioterápico engloba altos custos econômicos, sociais e humanos, buscam-se novas tecnologias na área para melhor entendimento molecular do câncer, bem como, alvos terapêuticos mais específicos.

O advento da tecnologia de microarranjos de DNA e a análise paralela de diversos genes permitiram correlacionar perfis de expressão gênica aos desfechos clínicos dos pacientes. Pesquisadores analisaram mais de oito mil genes e identificaram inicialmente cinco subtipos: Luminal A, Luminal B, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) superexpresso, triplo negativo e basal-like. Análises moleculares revelaram que CSC de CM podem exibir perfis imunofenotípicos distintos em comparação com os seus tumores de origem (Wu et al., 2020; Yang et al., 2020; LIU et al., 2011). As glicoproteínas marcadoras de superfície (CD) 44 e 24 são os biomarcadores mais comumente utilizados para identificar CSC, na qual a expressão da glicoproteína de superfície CD44 combinada com baixa expressão ou ausência da glicoproteína de superfície CD24 (CD44+/CD24-) tipifica CSC de mama, demonstrado primeiramente por Al-Hajj et al., (2003). Estudos afirmam, que CD44 é um regulador de transição epitélio-mesenquimal (EMT), fornecendo informações sobre o desenvolvimento e prognóstico desta patologia, como capacidade de invasão do tumor, migração e resistência à terapia. Estes marcadores também estão envolvidos na tumorigênese do CM, aumentando a capacidade metastática e promovendo resistência a terapia.

A maioria dos estudos genômicos e proteômicos são realizados utilizando tecidos tumorais congelados. Esse trabalho utilizou uma cultura de células a partir do tecido tumoral fresco, a fim de reproduzir assinaturas transcriptômicas e/ou proteicas que possam auxiliar no diagnóstico, entendimento do câncer e adaptar estratégias individuais para cada paciente.

Neste estudo foram cultivadas células cancerosas e displásicas de mama, avaliadas suas propriedades funcionais em tumores primários e caracterizado o perfil molecular das células selecionadas em comparação com as dos tumores primários. Somado a isso, foram identificados marcadores CD44/CD24/Ck em cultivo de células primárias de amostras de lesões não malignas e malignas de mama e sua correlação com dados do estadiamento da doença, subtipo molecular e desfecho clínico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia geral para câncer de mama

O CM é uma doença causada pela multiplicação desordenada das células de mama, gerando células anormais que se multiplicam e formam um tumor. Um conjunto diversificado de tipos de células impulsiona a formação do tecido mamário por meio da interação e regulação de hormônios locais e sistêmicos e fatores de crescimento. Seu desenvolvimento foi descrito em diferentes estágios na puberdade e na fase adulta (McNally, 2019). Há vários tipos de câncer de mama, fazendo com que a doença possa evoluir de diferentes formas. Alguns tipos têm desenvolvimento rápido, enquanto outros crescem mais lentamente. Esses comportamentos distintos se devem a características próprias de cada tumor (Moloney et al., 2020).

O CM é diagnosticado em cerca de dois milhões de pessoas a cada ano, causando 627.000 mortes anualmente (Bray et al., 2018). Possui a maior taxa de incidência e é a principal causa de morte por câncer em mulheres no mundo. No entanto, a mortalidade geral não é tão alta quanto nos outros tipos de câncer (Bray et al., 2018). Há um pico de recidivas em cerca de 2 a 3 anos após a cirurgia, mas a taxa de metástases permanece relativamente alta, porque as células disseminadas podem permanecer dormentes por até 20 anos e começar a proliferar após algum evento desencadeante (Demicheli et al., 2010).

Em nível mundial, o CM é o mais incidente entre as mulheres. Em 2018, ocorreram 2,1 milhões de casos novos, o equivalente a 11,6% de todos os cânceres. Esse valor corresponde a um risco estimado de 55,2/100 mil indivíduos. As maiores taxas de incidência esperadas foram na Austrália e Nova Zelândia, nos países do Norte da Europa e na Europa Ocidental (Celià-Terrassa et al., 2018).

O INCA (2020) estima que para cada ano do triênio 2020/2022, sejam diagnosticados no Brasil 66.280 novos casos de CM, com um risco estimado de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres. Em 2017, foram contabilizados 16.927 óbitos, sendo

16.724 mulheres e 203 homens no país, o equivalente a um risco de 16,16 por 100 mil indivíduos.

Independentemente da condição socioeconômica do país, a incidência desse câncer se coloca entre as primeiras posições das neoplasias malignas femininas . Por outro lado, observou-se um declínio na tendência das taxas de incidência em alguns países desenvolvidos, parte atribuída à diminuição do tratamento de reposição hormonal em mulheres pós-menopausa (Moloney et al., 2020; Xiaoxian et al., 2017).

Esse tumor também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença. Em 2019, cerca de 2.670 novos casos de CM invasivo foram diagnosticados em homens. Para os homens, o risco de CM ao longo da vida é de cerca de 1 em 833 indivíduos. Como nas mulheres, o CM em homens pode ser positivo ou negativo para receptores hormonais, assim como positivo ou negativo para HER2. Como o número de casos de CM em homens é relativamente pequeno comparado ao número de casos em mulheres, há uma falta de informações sobre a doença em homens, além de não existir estudos focados especificamente em tratamentos para o CM masculino. Para auxiliar a tomada de decisões sobre tratamentos, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) estabeleceu diretrizes sobre como gerenciar o CM masculino. Estudos clínicos para analisar tratamentos específicos para o CM masculino estão atualmente em andamento (Instituto OncoGuia, 2020; INCA, 2020).

2.2 Considerações sobre carcinoma ductal *in situ*

Cerca de 20% dos novos casos de CM são de carcinoma ductal *in situ*. Quase todas as mulheres diagnosticadas neste estágio da doença possuem elevada perspectiva de serem curadas (Instituto OncoGuia, 2020; ASCO 2017). O carcinoma ductal *in situ*, também conhecido como carcinoma intraductal, é considerado não invasivo ou CM pré-invasivo. A diferença entre o carcinoma ductal *in situ* e carcinoma invasivo é que as células não se disseminaram através dos ductos para o tecido mamário adjacente (Intituto OncoGuia, 2020; ASCO 2017).

O carcinoma ductal *in situ* é considerado um pré-câncer pois em alguns casos pode se tornar um câncer invasivo. Isso significa que ao longo do tempo, o carcinoma ductal *in situ* pode se disseminar. No entanto, atualmente não há como identificar quais cânceres se tornarão invasivos. Portanto, todas as mulheres com carcinoma ductal *in situ* devem ser tratadas (Instituto OncoGuia, 2020; ASCO 2017).

A **Figura 1** evidencia o Sistema TNM de estadiamento do tumor, o qual é estabelecido após tratamento cirúrgico e determina a extensão da doença com maior precisão (INCA, 2020). A classificação dos tumores é obtida de acordo com a dimensão da extensão anatômica da doença, levando em consideração as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente (Giuliano et al., 2017).

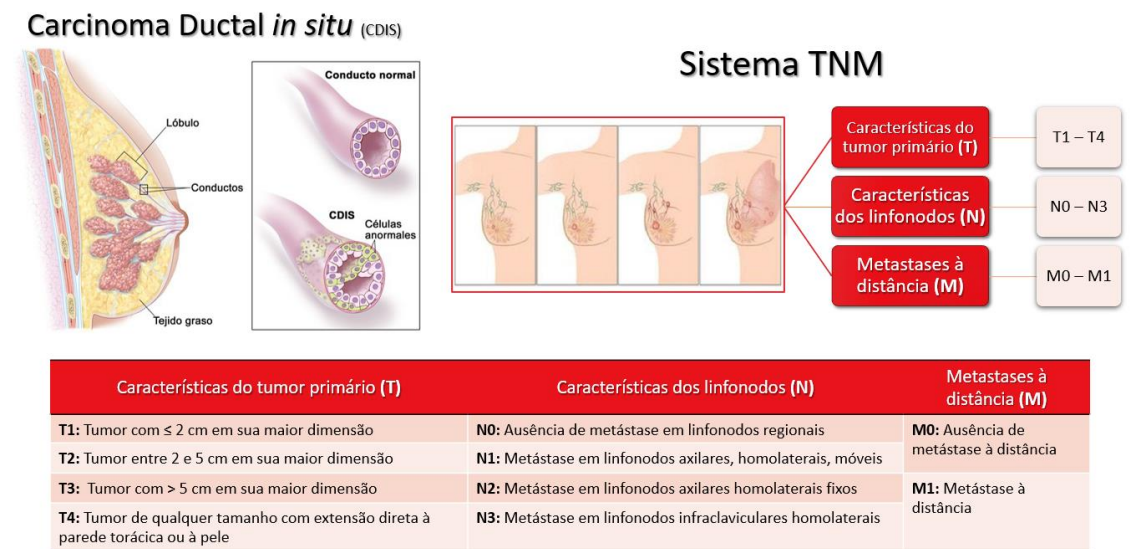


Figura 1: Estadiamento do carcinoma de mama. O Sistema TNM classifica o tumor de acordo com características do tumor primário (T), características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Adaptada de National Cancer Institute (2012); Giuliano et al. (2017); National Breast Cancer Foundation, Inc. (2020).

Os valores do TNM não são os únicos que determinam o estágio da doença. Alguns outros fatores devem ser considerados como o grau tumoral, que mede, através da microscopia, quão anormal as células cancerígenas são, o que é denominado diferenciação. O grau pode ser importante devido disseminação e elevada taxa de replicação tumoral. Geralmente é atribuído uma graduação. No baixo grau (células bem diferenciadas) as células cancerígenas se parecem muito com as células normais. Em geral, esses cânceres tendem a crescer lentamente. Em cânceres (mal diferenciados) de alto grau, as células cancerosas parecem muito diferentes das células normais. Cânceres de alto grau tendem a crescer mais rapidamente e têm um prognóstico pior, portanto podem precisar de tratamentos diferentes do que os cânceres de baixo grau. Mesmo quando o grau não afeta o estágio do câncer, ele ainda pode afetar o prognóstico e / ou tratamento (OncoGuia, 2020; INCA, 2020).

Outro fator que deve ser considerado para o diagnóstico e decisão terapêutica é o estadiamento clínico, que consiste em uma estimativa da extensão da doença com base nos resultados do exame físico, usando os mesmos critérios do sistema TNM, juntamente com exames de imagem e biópsia de tumor. É também a linha de base utilizada comparativa para ver se a doença responde ao tratamento (OncoGuia, 2020; INCA, 2020). A **figura 2** representa as classificações de acordo com o grau tumoral e estadiamento clínico.

Classificação histológica – grau tumoral

- 1 Bem diferenciado, células com crescimento lento e histologicamente semelhantes ao tecido normal da mama;
- 2 Moderadamente diferenciado, células com características entre o tipo 1 e 3;
- 3 Pouco diferenciado, células tendem a crescer e disseminar de forma mais agressiva e ausência das características de tecido normal.

Estadiamento do tumor

Estágio	Características do tumor primário (T)	Características dos linfonodos (N)	Metástases à distância (M)
0	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IIA	T0, T1 ou T2	N0 ou N1	M0
IIIA	T1, T2 ou T3	N1 ou N2	M0
IB	T0 ou T1	N1*	M0
IIB	T2 ou T3	N0 ou N1	M0
IIIB	T4	N0, N1 ou N2	M0
IIIC	T0, T1, T2, T3 ou T4	N3	M0
IV	T0, T1, T2, T3 ou T4	N0, N1, N2 ou N3	M1

* Micrometástases com aproximadamente 200 células > 0,2 mm < 2 mm.

Figura 2: Classificação histológica – grau tumoral (1-3) e estadiamento do tumor (I-IV). Adaptada de Giuliano et al. (2017).

2.3 Expressão imunohistoquímica de marcadores preditivos para câncer de mama

Atualmente, o diagnóstico do carcinoma de mama é individual, baseado em vários fatores, incluindo a morfologia do tumor, classificação do grau tumoral, tamanho do tumor, presença de metástases linfonodais e expressão de estrogênio, progesterona e HER2, conforme dados do estadiamento (Giuliano et al., 2017).

Através da análise molecular do CM e com o perfil de expressão gênica estabelecido, Perou e Sorlie (2000; 2001) mostraram que a doença pode ser subclassificada em diferentes subtipos. Em termos gerais, esses subtipos incluem: ER (receptor de estrogênio) luminal positivo (luminal A e luminal B), HER2 positivo e basal. A determinação do perfil de expressão gênica pode ter valor agregado elevado, demorada e dependendo da plataforma pode exigir uma nova amostra de biópsia do

tumor sem o uso de formalina (Arpino et al., 2016; Reis-Filho et al., 2011). Dadas essas restrições, pode ser difícil implementar em larga escala o perfil da expressão gênica. No entanto, vários grupos, incluindo a ASCO, a Rede Nacional de Câncer Compreensiva e o Consenso de St. Gallen, emitiram diretrizes e recomendações para apoiar a implementação de análises moleculares úteis para estratificação de riscos e tratamento planejado (ASCO, 2017; Goldhirsch et al., 2013).

A avaliação de biomarcadores padronizados que possam ser avaliados com imunohistoquímica (ER, PR e HER2) é de extrema relevância para o diagnóstico. A contribuição de outros fatores, como taxa proliferativa e expressão de citoqueratinas, também podem ser importantes. A classificação de St. Gallen (2013) incluiu ainda, a avaliação do Ki67 (um marcador de células em proliferação) (Gerdes et al., 1983; Goldhirsch et al., 2013). A expressão inferior a 20% de receptores de estrogênio é associado aos subtipos luminal B e HER2- (Goldhirsch et al., 2013). A **Figura 3** mostra um esquema relacionando a divisão dos tumores Luminal A e B, Luminal HER2+ e Triplo negativo com suas respectivas marcações imunohistoquímicas.

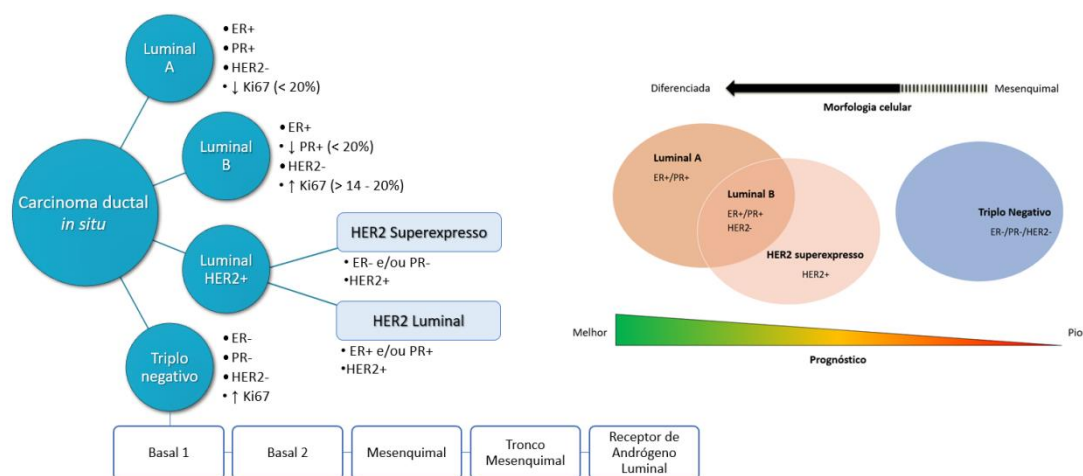


Figura 3: Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama (Luminal A e B, Luminal HER2+ e Triplo negativo) com marcações imunohistoquímicas para receptores hormonais (ER e PR), HER2 e Ki67 e sua relação com o prognóstico clínico. Adaptada de Goldhirsch et al. (2013; 2016); van Seijen et al. (2019).

No geral, em pacientes com CM em estágio I – II ocorre recidiva da doença local após cirurgia conservadora de mama e radioterapia em aproximadamente 10–15% dos casos, enquanto 0-10% dos pacientes com doença em estágio I – IIIA sofrem recorrência em parede torácica após mastectomia (Freedman et al., 2000). Até o momento, vários fatores têm sido associados à biologia agressiva do câncer e o aumento do risco de recorrência local-regional. Esses fatores incluem:

- invasão linfovascular (Megee et al., 1996);
- idade jovem (Bouvet et al., 1997);
- tamanho aumentado do tumor (Von Dongen et al., 2000);
- status da margem fechada ou envolvida (Jager et al., 1999; Obedian et al., 2000);
- status nodal positivo (Touboul et al., 1999; Pisansky et al., 1993);
- grau alto do tumor (Magee et al., 1996; O'Rourke et al., 1994);
- componente intraductal extenso (Voogd et al., 1999);
- doença multifocal / multicêntrica (Wilson et al., 1993);
- status negativo do receptor hormonal (Borger et al., 1994; Recht et al. 1999);
- e falta de terapia sistêmica adjuvante (Harris et al., 2000).

A recorrência local-regional pode estar associada a um tumor mais agressivo, impactando diretamente na sobrevida do paciente (Fisher et al., 2002; Ragaz et al., 2005). De um modo geral, a definição das características biológicas do CM facilita na caracterização de diferentes tipos histológicos de tumores, na compreensão do prognóstico da doença e no planejamento de tratamento. Tipicamente, a imunohistoquímica é usada para caracterizar a expressão de proteínas intracelulares ou de superfície celular relacionadas ao câncer. Entre vários fatores, os marcadores prognósticos preditivos do CM avaliados por imunohistoquímica mais utilizados incluem: ER, PR, HER2 e Ki67.

2.3.1 Receptores de ER e PR

O receptor de estrogênio (ER) desempenha um importante papel estimulador no tecido epitelial normal mamário e no desenvolvimento e progressão do CM. Além

disso, o ER é um dos biomarcadores prognósticos mais importantes na doença. O ER pertence a um grupo de receptores nucleares de hormônios que atuam como fatores de transcrição, possui duas isoformas: ER α (a isoforma clinicamente mensurada) e ER β . Pacientes cujos tumores são ER+ se beneficiam da terapia endócrina direcionada para ER (como tamoxifeno e inibidores da aromatase), e o tratamento pode reduzir a recorrência local, recorrência distante e mortalidade (EBCTCG, 2005; 2011). No entanto, os CM ER+ não respondem a quimioterápicos citotóxicos e são menos propensos a obter uma resposta patológica completa quando comparados com pacientes com CM ER- que recebem apenas quimioterapia neoadjuvante (Colleoni et al., 2004; Ring et al., 2004).

O receptor de progesterona (PR) também se manifesta como duas principais isoformas (PR-A e PR-B) e desempenha um papel na sinalização do ER (Lange et al., 2008). É provável que o PR atue como um fator para o desenvolvimento do CM, que pode ser mais impactante para mulheres no período pós-menopausa (Chlebowski et al., 2003). Pensa-se que o ER regula a expressão do PR e a expressão do PR é considerada indicativa de um eixo estrogênio-ER funcional (Clarke et al., 2003). Na maioria dos casos, a expressão do PR se correlaciona com a expressão do ER e, do ponto de vista prático, a expressão do PR na ausência do ER pode exigir repetição de testes. A expressão do ER e PR apresenta o prognóstico com desfecho clínico mais favorável no CM. Além disso, a expressão do PR está correlacionada com resposta à terapia endócrina, mesmo quando a expressão do PR é baixa (Mohsin et al., 2004). No entanto, nos casos de CM ER+, a avaliação do PR pode não adicionar informações preditivas significativas. Dito isto, os CM que são ER+ e PR+ podem obter maior benefício da terapia endócrina do que tumores ER+ e PR-.

Atualmente, a avaliação da expressão dos ER e PR é prática padrão e a maioria frequentemente realizada por imunohistoquímica. A imunoexpressão do ER e PR se manifesta como coloração nuclear e a expressão heterogênea é normalmente observada em epitélio ductal normal da mama. Até 80% dos CM são positivos para ER (Harvey et al., 1999) e 55-65% são positivos para a expressão PR (Schiff et al., 2012). A ASCO e o Colégio Americano de Patologia (CAP do inglês, *College of American Pathologists*) estabeleceram recomendações sobre a avaliação do ER e PR (Hammond et al., 2010).

De acordo com essas recomendações, nos relatórios de patologia para ER e PR, os resultados devem incluir os seguintes detalhes: porcentagem e/ou proporção de células tumorais, coloração positiva em uma seção de tecido ou preparação de citologia, intensidade geral da coloração (fraco, moderado ou forte) e uma interpretação quanto ao status dos receptores hormonais. Quanto ao último item, a expressão do ER e PR é considerada positiva quando $\geq 1\%$ das células tumorais coram positivamente, negativo quando $< 1\%$ e incompreensível quando variáveis pré-analíticas impedem uma avaliação precisa. Isso inclui o uso de fixadores que não sejam 10% de tampão neutro formalina durante o processamento do tecido, duração da fixação inferior a 6 horas ou superior a 72 horas, atraso na fixação/tempo isquêmico frio mais de 1 hora, descalcificação das amostras usando ácidos e controles inadequados de análises intrínsecas ou extrínsecas. Algumas instituições fornecem uma pontuação combinando porcentagem e intensidade do receptor de hormônio de células tumorais para mensurar a expressão (Goldhirsch et al., 2013; 2016).

A maioria dos laboratórios de patologia utiliza métodos imunohistoquímicos para determinar expressão do ER e PR. O teste é frequentemente realizado em material de biópsia prévio à cirurgia e a expressão de receptores hormonais orienta a ressecção da lesão (Harris et al., 2003). Isso permite que médicos, oncologistas, cirurgiões e pacientes possuam informações prognósticas e terapêuticas antes de estabelecer um plano de tratamento. No entanto, existe variabilidade institucional na maneira pela qual a imunoexpressão do ER e PR é avaliada. Em alguns centros, os patologistas utilizam a análise de imagem digital na qual os cortes são digitalizados e convertidos em imagens de computador de alta resolução, para que a análise imunohistoquímica possa ser realizada. A análise da imagem digital está sendo utilizada com maior frequência devido à variabilidade da técnica (Stalhammar et al., 2016).

2.3.2 Receptor Andrógeno

Como ER e PR, a expressão imunohistoquímica do receptor andrógeno (AR) é nuclear e geralmente forte e difusa quando presente (isto é, presente em $> 80\%$ dos núcleos de células tumorais). A expressão é observada na maioria dos CM ER+, bem

como carcinomas HER2+. No espectro do CM triplo negativo (TNBC), os tumores com superexpressão do AR geralmente manifestam-se como carcinoma apócrino (“carcinoma com diferenciação apócrina”), um tumor ductal em que as células invasivas exibem células apócrinas com extensas alterações (>90% das células tumorais exibindo características apócrinas) (Laksani et al., 2012). A maioria dos patologistas relacionam a imunoexpressão do AR em 1% dos núcleos de células tumorais como AR+. Os tumores que geralmente exibem um perfil de expressão negativos para ER, mas positivos para AR se sobrepõe aos grupos luminal, basal e ocasionalmente HER2+. Muitos desses tumores, mas não todos, mostram algum grau de diferenciação apócrina (Farmer et al., 2005).

Do ponto de vista clínico, os CM com AR+ apresentam bom prognóstico, comparados aos tumores AR-, independentemente do status do ER (Vera-Badillo et al., 2014). Entre os TNBC, o significado da expressão do AR no prognóstico e no curso clínico continua sendo investigado. Em alguns estudos, os TNBC AR+ apresentam melhor prognóstico quando comparado ao AR-. No entanto, outros estudos encontraram uma sobrevida reduzida em pacientes com estágio inicial da doença (Lehmann-Che et al., 2013). Confundindo ainda mais o significado prognóstico da expressão do AR, está a presença de superexpressão de HER2 em casos moleculares apócrinos. O curso clínico favorável do TNBC positivo para AR pode estar relacionado à sobreposição genética dos tumores luminais.

2.3.3 HER2

O HER2 é um receptor transmembrana de tirosina quinase que regula o crescimento celular, proliferação e sobrevivência através de várias vias de sinalização diferentes, como as vias mTOR e RAS / RAF / MEK / ERK (Wieduwilt et al., 2008). A amplificação do gene HER2 é observada em 15 a 30% dos CM e é um forte biomarcador prognóstico para um curso clínico agressivo (Slamon et al., 1987).

É importante ressaltar que a superexpressão do gene HER2 também é um forte marcador preditivo de resposta a terapia anti-HER2, que inclui anticorpos monoclonais

que se ligam ao domínio extracelular do receptor HER2 (trastuzumabe e pertuzumabe), pequenas moléculas inibidoras do receptor de tirosina quinase (lapatinibe) e um conjugado de anticorpo trastuzumabe (ado-trastuzumabe emtansina; T-DM1) (Alqaisi et al., 2014; Nielsen et al., 2004).

O teste de imunohistoquímica para HER2 é padrão para carcinomas invasores de mama, primários ou metastáticos e a superexpressão da proteína HER2 ocorre tipicamente secundária à amplificação do gene HER2/neu (Pegram et al., 2000). Conforme as recomendações da ASCO e CAP de 2013 (Wolff et al., 2013) sobre testes de HER2 em carcinoma mamário, o limiar para um teste positivo em imunohistoquímica é forte coloração circunferencial em >10% das células tumorais invasivas (escore 3+), enquanto os critérios para resultado negativo inclui: a) nenhuma mancha observada ou incompleta, fraca ou quase imperceptível coloração da membrana em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas (escore 0), ou b) incompleto, fraca ou coloração de membrana quase imperceptível em >10% das células tumorais (pontuação 1+). Para minimizar equívocos, também são realizadas hibridização fluorescente *in situ* (FISH), hibridização cromogênica *in situ* (CISH) ou ensaios de hibridação de prata *in situ* (SISH) para determinar a amplificação do gene HER2. Os ensaios de imunohistoquímica e de amplificação de genes geralmente produzem resultados semelhantes, pois a amplificação induz a superexpressão proteica detectada imunohistoquimicamente em 95% dos casos (Goldhirsch et al., 2013; 2016).

2.3.4 Ki67

O Ki67 é um marcador de proliferação nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto G0 (Gerdes et al., 1991). Em geral, os CM que expressam altos níveis de Ki67 se correlacionam com piores prognósticos (Trihia et al., 2003; Azambuja et al., 2007). Meta-análises de Azambuja et al., em 2007 e Stuart-Harris et al., em 2008, mostraram que o Ki67 está associado ao prognóstico, sobrevida livre de doença e sobrevida global. Em 2009, o Consenso de St. Gallen estratificou os tumores de acordo com baixos valores de Ki67 (<15%), valores intermediários (16% a 30%) e altamente proliferativos (>30%) para ajudar identificar pacientes que poderiam se beneficiar

potencialmente do tratamento com quimioterapia ou terapia endócrina. Estudos adicionais relataram um nível de Ki67 de 10% a 14% (Jonat et al., 2011; De Censi et al., 2011) e 20% (Goldhirsch et al., 2013; 2016), como característica de alto risco para desfecho clínico desfavorável.

O subtipo luminal A é definido como ER+ e/ou PR+, HER2- e Ki67 baixo, isto é, um índice Ki67 <14%. Enquanto que, o subtipo B luminal como ER+ e/ou PR+, HER2- e Ki67 elevado, ou seja, um índice Ki67 $\geq$ 14%. Além disso, utiliza-se o método imunohistoquímico e o painel de quatro biomarcadores, ER, PR, HER2 e Ki67 para estratificação do tumor (Cheang et al., 2009).

As diretrizes da ASCO não incluíram Ki67 na lista de marcadores rotineiramente avaliados para predizer o prognóstico da doença. No entanto, na Europa, o Consenso de Especialistas Internacionais de St. Gallen recomendou o uso de marcadores de proliferação, como o Ki67, além de parâmetros padrões (estágio, grau e status dos receptores hormonais) na escolha dos regimes de tratamento sistêmico (Goldhirsch et al., 2016). Um papel para o Ki67 também foi encontrado no cenário neoadjuvante, principalmente em pacientes submetidos a terapia endócrina pré-operatória (Dowsett et al., 2007), indicando como uma variação na expressão de Ki67 pode prever resultados a longo prazo. Nishimura e colaboradores em 2010, investigaram o papel do Ki67 no tratamento sistêmico neoadjuvante e constataram que os valores dos marcadores antes do início do tratamento poderiam ajudar a prever a resposta, enquanto os mensurados após a quimioterapia podem ajudar a prever sobrevida livre de doença (Nishimura et al., 2010). Além disso, a quantificação do Ki67 é rentável quando comparado aos ensaios multigênicos. Em alguns centros, o Ki67 é incluído nos relatórios de patologia cirúrgica com outros marcadores padrões e pode auxiliar na identificação de tumores luminais B não identificados por ER, PR e HER2 (Goldhirsch et al., 2013; 2016).

2.4 Subtipos moleculares dos carcinomas de mama

2.4.1 Luminal A

Representam 30 a 40% de todos os CM invasivos. Possui perfil de expressão gênica com mutações PIK3CA, MAP3KI, GATA3, FOXA1 e alta expressão de ESR1 e XBP1. Quanto a morfologia, classifica-se como 1 ou 2. A maioria são carcinomas bem diferenciados e sem tipo especial, carcinomas lobulares clássicos, tubulares, mucinosos, neuroendócrinos e carcinomas cribriformes (Vuong et al., 2014).

Em relação ao perfil imunohistoquímico, apresenta ER+, alta expressão do PR ($\geq 20\%$), HER2- e baixo Ki67. Vários estudos mostraram que um Ki67 de 20% foi o ponto de corte para separar os subtipos Luminal A e Luminal B (Prat et al., 2013; Goldhirsch et al., 2013; 2016).

O subtipo molecular luminal A geralmente está associado a um prognóstico altamente favorável (Toutsore et al., 2017) e mostra envolvimento linfonodal menos frequente e menos extenso (Sanpaolo et al., 2011; Garcia et al., 2014). Esse subtipo também tende a ter um curso mais indolente, com uma evolução mais lenta ao longo do tempo, quando comparado com os outros subtipos moleculares (Jatoi et al., 2011). Além disso, um status positivo de receptor hormonal é um fator prognóstico favorável e também preditivo de resposta à terapia endócrina (EBCTCG 2005; Von der Leiji et al., 2012; Haffty et al., 1996). Em termos de recorrência local-regional, vários estudos retrospectivos mostraram resultados semelhantes, com porcentagens variando entre 0,8 e 8% (Millar et al., 2009; Voduc et al., 2010; Arvold et al., 2011; Albert et al., 2010; Nguyen et al., 2008).

2.4.2 Luminal B (HER2-)

Representam 20% a 30% de todos os CM invasivos. Seu perfil de expressão gênica apresenta mutações TP53 e PIK3CA, amplificação de ciclina D1 e MDM2, perda de ATM, instabilidade genômica aprimorada e amplificações focais. Quanto a morfologia, pode ser classificado em 2 ou 3. São cânceres com menor diferenciação,

principalmente carcinomas ductais invasivos e também alguns carcinomas micropapilares invasivos (Vuong et al., 2014).

O perfil imunohistoquímico é positivo para ER, menor expressão do PR (<20%), negativo para HER2 e maior índice de Ki67 (>14 ou 20%) (Harvey et al., 1999; Cheang et al., 2009). O subtipo molecular luminal B está associado a um prognóstico intermediário quando comparado ao subtipo molecular luminal A (Tsoutsore et al., 2017). O risco de recorrência local-regional para tumores luminais B, conforme descrito na literatura, varia de 1,5 a 8,7%, com pico de incidência nos primeiros 5 anos após o diagnóstico (Millar et al., 2009; Voduc et al., 2010; Arvold et al., 2011; Albert et al., 2010; Nguyen et al., 2008).

Os subtipos moleculares luminais apresentam menores taxas de recorrência local-regional com cirurgia conservadora e mastectomia (Lowery et al., 2012). No estudo de Lowery et al., (2012) estimou-se que a taxa de recorrência local-regional para os subtipos luminal A e B após cirurgia conservadora de mama e radiação era de aproximadamente 5%, mesmo no cenário de não adesão à terapia endócrina. É importante que os médicos reforcem que a terapia endócrina reduz as taxas de recorrência e mortalidade local-regional em mais de 50% de pacientes com CM positivos para ER entre 5 e 10 anos após o diagnóstico (EBCTCG, 2011).

2.4.3 HER2

Representam 12% a 20% de todos os cânceres de mama invasivos. Seu perfil de expressão gênica inclui amplificação HER2, TP53, PIK3CA, alta expressão de FGFR4 e receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR), mutações APOBEC, amplificação da ciclina D1 e alta instabilidade genômica (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003; Staaf et al., 2010). Quanto a morfologia, pode ser classificado em 2 ou 3. São carcinomas infiltrantes, carcinomas lobulares apócrinos e pleomórficos.

O estudo de Fountzilas et al., (2012) demonstrou que o status de receptores hormonais afetam a sobrevida, disseminação metastática e resposta ao tratamento. Portanto, os tumores HER2+ podem ser divididos em dois subtipos: a) HER2

superexpresso (ER- e / ou PR-e HER2+) (Fountzilias et al., 2012; Vici et al., 2015) e b) subtipo HER2 luminal (ER+ e / ou PR+ e HER2+). Ainda, o CM pode ser diferentemente classificado em dois fenótipos baseados na expressão do PR: podendo ser ER+/PR+/HER2+ ou ER+/PR-/HER2+. Há evidências pré-clínicas de divergência entre as vias de sinalização HER2 e o ER com efeito negativo na resposta à terapia endócrina (De Laurentiis et al., 2005; Algaissi et al., 2014).

Historicamente, a superexpressão do HER2 tem sido associada a uma maior frequência de recorrência local-regional com base em estudos em que os pacientes não foram tratados com terapia direcionada ao HER2, variando entre 4 e 15% (Millar et al., 2009; Voduc et al., 2010; Arvold et al., 2011; Albert et al., 2010; Nguyen et al., 2008). Na meta-análise de Lowery et al., (2012), 592 pacientes foram avaliados quanto à recorrência local-regional após cirurgia conservadora de mama com radioterapia e mastectomia. Os resultados mostraram taxas aumentadas de recorrência local-regional para pacientes com tumores HER2+, com taxas mais altas de recorrência observadas após cirurgia conservadora *versus* mastectomia. Neste estudo, menos de 6% dos pacientes positivos para HER2 foram tratados com trastuzumabe. Uma análise de 9.306 pacientes pertencentes a nove estudos, mostrou uma menor taxa de recorrência local-regional após mastectomia para tumores luminais negativos para HER2, quando comparados aos cânceres luminais positivos para HER2 (7,5% vs. 9,4%). Nesta análise, não foi observada diferença no risco de recidiva local-regional após a cirurgia conservadora para tumores luminais negativos para HER2 em comparação com tumores luminais positivos para HER2. No geral, tanto o câncer luminal HER2- quanto o luminal HER2+ apresentam uma tendência a taxas mais baixas de recorrência local-regional quando comparados aos subtipos de ER-/ HER2+ e TNBC (Lowery et al., 2012).

Pacientes com tumores HER2+ recebem terapias direcionadas, incluindo trastuzumabe e pertuzumabe, e isso modifica o curso natural desse subtipo de doença, apresentando melhores resultados (Tsoutsore et al., 2017). A positividade para HER2 é um fator preditivo para resposta ao trastuzumabe (Romond et al., 2005) e também um fator prognóstico para recorrência local-regional (Haffty et al., 1996; Pierce et al., 1994). No estudo de Panoff et al., (2011), pacientes com tumores HER2+ que foram

submetidos a mastectomia e receberam trastuzumabe, tiveram uma taxa de recorrência local-regional de 1,7%. Esse achado foi confirmado por uma análise de estudos de Yin et al., (2011), que também mostraram que o tratamento com trastuzumabe resultou em uma redução da recorrência local-regional em 50%. Foi sugerido que células cancerígenas da mama com danos de radiação poderiam ser mais vulneráveis a lesões quando privadas da sinalização celular mitogênica fornecida pela ativação da via HER2 (Pietras et al., 1999). Além disso, um estudo realizado em pacientes com CM T1 (extensão anatômica da doença) HER2+ mostrou um risco de recorrência local-regional de 2-5,7% para aqueles que não receberam trastuzumabe e 0% para aqueles pacientes tratados com trastuzumabe adionado ou não de quimioterapia 5 anos após o diagnóstico (Fehrenbacher et al., 2014).

2.5 Um tipo especial de carcinoma de mama: triplo negativo

Representa 15 a 20% de todos os cânceres de mama invasivos, o TNBC é definido pela ausência de expressão do ER, PR e HER2. Apesar de sua definição simples, apresenta morfologia, características genéticas e clínicas heterogêneas. A maioria dos TNBC se manifesta como carcinoma ductal invasivo de nenhum tipo específico, no entanto, a categoria também inclui variantes como carcinoma metaplásico, carcinoma com características medulares (conhecido como carcinoma medular), carcinoma com características apócrinas (conhecido como carcinoma apócrino), carcinoma secretório (conhecido como câncer de mama juvenil) e adenóide (carcinoma cístico). O perfil de expressão gênica permitiu a subdivisão desses cânceres em diferentes subtipos prognósticos significativos que, em alguns casos, se correlacionam com variante patológica particular. Os subtipos moleculares mais comuns e melhor caracterizados de TNBC são basal 1 (BL1), basal 2 (BL2), imunomodulatório (como primário), mesenquimal (M), tronco-mesenquimal (MSL) e receptor de andrógeno luminal (LAR) (Lehmann et al., 2011).

O carcinoma BL1 geralmente se manifesta clínica e patologicamente como carcinoma ductal invasivo de nenhum tipo específico e apresenta altos índices proliferativos de Ki67 enquanto seu perfil de expressão é enriquecido em genes

associada citoqueratina basal (incluindo KRT5), ao ciclo celular, a replicação do DNA e a vias de resposta a danos no DNA. Os tumores BL2 também se manifestam como carcinoma ductal invasivo de nenhum tipo específico e também mostram aumento da expressão gênica da citoqueratina basal, TP63 e sinalização do fator de crescimento (por exemplo, vias do EGF e IGFR1) (Curigliano et al., 2011; Foulkes et al., 2010).

Os subtipos M e MSL podem apresentar-se clinicamente como carcinoma metaplásico, definido como CM com diferenciação epitelial e mesenquimal, às vezes assumindo a forma de elementos heterólogos como osso e cartilagem. Esses tumores são enriquecidos em genes importantes para a diferenciação celular e vias de sinalização do fator de crescimento. Finalmente, o subtipo LAR geralmente se apresenta como carcinoma com diferenciação apócrina e correlaciona-se com o tipo apócrino molecular. Como esperado, o LAR apresenta expressão aumentada de genes de citoqueratina luminal (incluindo KRT7 e KRT1) e é enriquecido em mRNA do AR e expressão de proteínas, possivelmente explicando sua capacidade de resposta à terapias hormonais (Curigliano et al., 2011; Foulkes et al., 2010).

O subtipo molecular TNBC está associado a um prognóstico desfavorável quando comparado aos outros subtipos de CM, apresentando maior risco de recorrência da doença (Tsoutsore et al., 2017; Malone et al., 2010; Tun et al., 2014). Para o TNBC, o envolvimento de linfonodos regionais está associado a um prognóstico ruim, sem relação direta com o número de linfonodos envolvidos (Romond et al., 2005). O subtipo TNBC tem sido associado a um maior risco de recidiva local-regional (Haffty et al., 2006) e doença contralateral, como mostram Bessonova et al. (2011) e Malone et al. (2010), além de recidiva sistêmica. O pico de incidência de recorrência do TNBC ocorre nos primeiros 1 a 3 anos, conforme relatado em estudos de Jatoi et al. (2011) e Kumar et al. (2016). Na meta-análise de Lowery et al. (2012), o subtipo TNBC foi associado ao aumento das taxas de recorrência local-regional após cirurgia conservadora e mastectomia, variando entre 3 e 17%. Outros estudos relataram que o TNBC não está associado a um maior risco de recorrência local-regional (Wang et al., 2013; Moran et al., 2015). Abdulkarim et al. (2011) não relataram diferença nos eventos de recidiva local, enquanto Wang et al. (2013) encontraram pacientes com TNBC submetidos à mastectomia com resultados inferiores. Vários outros estudos descreveram o subtipo

TNBC como tendo o maior risco de recidiva local-regional (Millar et al., 2009; Voduc et al., 2010; Arvold et al., 2011; Haffty et al., 2006; Freedman et al., 2000; Albert et al., 2010; Nguyen et al., 2008). Além disso, após o diagnóstico de recidiva local-regional, esse subtipo molecular está associado a uma alta incidência de metástases à distância e mortalidade relacionada ao câncer (Kumar et al., 2016).

Outro tópico em debate é a aparente resistência à radioterapia desse subtipo molecular, que pode ser impactada pela negatividade do ER, menor duração do ciclo celular e menor tempo para reparo de danos ao DNA. Kyndi et al. (2008) relataram uma redução nas taxas de recidiva local-regional após radioterapia no TNBC e nenhum benefício geral de sobrevida, devido à negatividade dos receptores hormonais associados à radiofrequência (Kumar et al., 2016).

Ao contrário dos cânceres luminais, as taxas de metástases distantes no TNBC tornam-se significativamente menores após cinco anos, portanto a dormência das células tumorais disseminadas parece ser menos comum nesse subtipo (Curigliano et al., 2011; Foulkes et al., 2010).

Esse grupo é caracterizado pela agressividade, prognóstico e desfecho clínico desfavorável (Cronin et al., 2018). O baixo percentual de invasão de linfonodos (Ali et al., 2016) e alto percentual de células-tronco (Oskarsson et al., 2014), conferem a esse subtipo molecular, resistência aos fármacos disponíveis, recorrência e metástases (Al-Hajj et al., 2013; Ginestier et al., 2007).

2.6 Capacidade metastática dos tumores de mama e sua relação com células-tronco

As principais causas de mortalidade por CM envolvem metástases à distância e recidiva tumoral, bem como a falta de tratamento eficaz e resistência a medicamentos (Lafourcade et al., 2018; Christowitz et al., 2019).

Estudos apresentam o CM como uma doença de células-tronco caracterizada pela existência de células cancerígenas com características semelhantes à células progenitoras e com potencial de iniciar tumores. Essas células seriam responsáveis pela

disseminação e metástase do tumor e a quimioterapia convencional não seria capaz de erradicá-las, aumentando o número de CSC nos tumores, um efeito que poderia aumentar a probabilidade de recidiva do tumor. Quinze anos após a primeira evidência da existência de uma pequena subpopulação semelhante à células progenitoras, desempenhando um papel importante no CM, foi publicado um estudo sobre as cascatas de sinalização e proteínas envolvidas na manutenção do tumor. Além disso, outros estudos apontam diferenças no tamanho da população de células-tronco e nos mecanismos que regulam a estenose nos diferentes subtipos de CM. No geral, esse conhecimento oferece novas abordagens para intervir na atividade celular do CM.

A metástase representa um processo de vários estágios que inclui invasão de células tumorais, intravasamento nos vasos sanguíneos com aparência de células tumorais circulantes (CTC), extravasamento para os tecidos e formação de micro e macrometástases (Jie et al., 2017). Os cânceres podem sofrer metástases em um estágio inicial (van de Vijver et al., 2002); contudo, a metástase é mais tipicamente observada no câncer avançado (Vanharanta et al., 2013).

Apesar das lesões metastáticas serem responsáveis pela maioria das mortes relacionadas ao câncer, a colonização metastática é um processo extremamente ineficiente (Massagué e Obenauf, 2016). Cada etapa da cascata metastática hematogênica de carcinomas epiteliais (perda de polaridade, distanciamento do tumor, migração através da membrana basal e camadas estromais, intravasamento, sobrevivência na corrente sanguínea e extravasamento) representa um obstáculo significativo que contribui para a seleção de clones agressivos de células cancerígenas. Mesmo focando nas etapas após o intravasamento, menos de 0,01% das células irão desenvolver lesões metastáticas (Naumov et al., 2002; Braun et al., 2005). Estes números são confirmados por modelos experimentais de disseminação metastática (Valastyan e Weinberg, 2011), com a mudança de micrometástases estimadas que ocorram com uma frequência menor que 0,02% para metástases hepáticas de células de melanoma (Luzzi et al., 1998; Cameron et al., 2000). Nesse contexto, a persistência em órgãos secundários seria uma característica restrita a poucas células altamente agressivas e que possuem capacidade em atingir órgãos com um ambiente permissivo. No entanto, evidências clínicas e experimentais de disseminação precoce de CM foram

relatadas (Goddard et al., 2018), indicando que mesmo células da doença em estágio inicial podem disseminar e persistir.

Células cancerígenas disseminadas podem levar a recidiva da doença geralmente em período superior a 5 anos. A recorrência pode ser no local primário (dormência primária do tumor) ou em um local secundário (dormência metastática). Os mecanismos subjacentes aos dois tipos de dormência provavelmente poderão ser mecanismos genéticos ou epigenéticos intrínsecos celulares, ou distintos, dependendo do microambiente do tecido. A dormência clínica é comum em cânceres de mama, próstata, melanoma, renal e de tireóide (Uhr e Pantel, 2011).

Nos CM, o status do ER parece influenciar profundamente a taxa de recidiva: pacientes com ER- tendem a recidivar nos primeiros 5 anos após o diagnóstico primário do tumor, enquanto os pacientes ER+ apresentam risco aumentado entre 5 e 20 anos (Pan et al., 2017; Pantel e Hayes, 2018). Enquanto a terapia anti-estrogênio melhorou efetivamente os resultados dos pacientes, uma fração significativa ainda desenvolve recidiva à distância e é necessário prolongar a duração do tratamento além de 5 anos (Pan et al., 2017; Bense et al., 2018; Pantel e Hayes, 2018).

Em aproximadamente 5% das mulheres com CM, as metástases são clinicamente evidentes no momento do diagnóstico. Em outras mulheres, as metástases tornam-se aparentes em alguns anos ou mesmo décadas após o diagnóstico inicial (Schwartz & Erban, 2017). Os mecanismos responsáveis pela ampla variabilidade na propensão do CM em desenvolver metástases são desconhecidos, embora seja claro que a disseminação metastática de um tumor primário de mama pode ocorrer precocemente, em estágio pré-sintomático, e células disseminadas geralmente se instalam na medula óssea onde elas podem ficar dormentes por anos antes de se tornar clinicamente evidentes (Demicheli et al., 2010).

Dois estudos de Hosseini et al. 2016 e Harper et al. 2016 relacionam o processo metastático de células de CM e o tropismo pela medula óssea. Os mecanismos que influenciam a formação de metástases no CM incluem a expressão do HER2. Há uma visão de longa data de que a progressão do comportamento maligno durante o curso de uma neoplasia está relacionado à aquisição gradual por células cancerígenas de

variantes que predisõem ao comportamento maligno e metastático (Markowitz, 2009). Esse modelo prevê que um subconjunto de mutações no tumor primário também será encontrado nas células metastáticas. As células metastáticas, no entanto, podem adquirir mutações independentes das mutações no tumor primário, um fenômeno conhecido como progressão paralela. Uma alternativa, portanto, poderia ser a utilização de amostras do tumor primário, sangue ou metástases para análise molecular afim de guiar a terapia (Philippeos, 2011; McGillicuddy et al., 2018).

Os relatórios de Hosseini et al. (2016) e Harper et al. (2016), defendem a análise minuciosa precoce das células da lesão e o estabelecimento e proliferação dessas células no local da metástase. Hosseini et al. (2016) realizaram experimentos usando camundongos que foram projetados para expressar altos níveis de HER2 nas células epiteliais mamárias. Esses animais estavam propensos ao CM e, portanto, foram utilizados como um modelo de CM HER2+. Os autores observaram que 80% dos camundongos apresentaram metástases da medula óssea decorrentes de células disseminadas a partir de uma lesão neoplásica precoce de epitélio mamário logo após a indução da expressão do HER2. Hosseini et al. (2016) descobriram que, embora células em lesões precoces propensas a metástases, as células nos tumores tardios apresentam menor probabilidade a disseminação do tumor e são mais propensas a permanecer *in situ* e proliferar; estas células superexpressam HER2 e não possuem expressão do PR. Os autores também descobriram que a supressão dos PR em tumores tardios é mediada pela alta expressão de HER2. No artigo de Hosseini et al. (2016), uma análise de células cancerígenas disseminadas que foram isoladas de mulheres que receberam um diagnóstico de CM (com e sem metástases), revelou disseminação de células isoladas não metastáticas e nestas, não apresentavam alterações cromossômicas encontradas no tumor primário, como perda de cromossomo 8p. Por outro lado, uma análise das células cancerígenas disseminadas isoladas de mulheres com metástases mostrou alterações genéticas semelhante à do tumor primário, hipótese que apóia a ideia de que células cancerígenas disseminadas desde o início da lesão seguem um caminho independente ou paralelo da evolução genética em relação às células no tumor primário.

Harper et al. (2016) e Hosseini et al. (2016) concluíram que as vias de sinalização dependentes de progesterona podem ativar HER2, culminando em

processos, como o enfraquecimento da adesão celular, que favorecem as metástases. Hosseini et al. (2016) também descobriram que a densidade de células (o número de células por unidade de volume, alta em tumores estabelecidos vs. baixa no início lesões) influencia a expressão de PR e a propensão a metástases.

Certamente existem interações entre células metastáticas do câncer de mama (CMCM) e células da medula óssea. O microambiente da medula óssea pode influenciar a aquisição de mutações nas células cancerígenas, independentemente das mutações que se acumulam no tumor primário. As células mesenquimais também residem nos nichos vasculares da medula óssea e regulam a renovação e proliferação de células-tronco, geralmente por meios de citocinas secretadas. Estas células mesenquimais podem regular a dormência e ativação de células metastáticas, embora os mecanismos desse processo não encontram-se totalmente elucidados. As células estromais na medula óssea também podem ativar ou suprimir células imunes, incluindo células B, células T e macrófagos, tipos de células que desempenham um papel importante na defesa contra o câncer (Shackleton et al., 2006).

Ao longo dos anos, muitos estudos identificaram uma população crítica de células-tronco mamárias que fica no topo dessa hierarquia e pode dar origem a progenitores e células diferenciadas de ambas as linhagens. A primeira evidência da existência de células-tronco mamárias foi obtida através de estudos de transplante, nos quais pequenos segmentos de epitélio mamário implantados nas camadas de gordura mamária “limpas” e livres de receptores epiteliais dos camundongos foram capazes de reconstituir toda a glândula mamária (Deome et al., 2019). Estudos subsequentes apoiaram a teoria de uma população especializada de células-tronco mamárias usando citometria de fluxo para isolar populações raras de células baseado principalmente na expressão dos marcadores de superfície de CD24, CD29 e CD49f, que poderiam repovoar uma glândula mamária inteira e funcional. Por exemplo, Visvader e colegas (2006) descobriram que as células CD24 / CD49 de alta expressão representavam células-tronco mamárias adultas, denominadas unidades de repovoamento mamário, que poderiam regenerar de forma confiável todo o funcionamento das glândulas mamárias através de transplantes repetidos. Estudos estabeleceram que uma única célula possui a capacidade de regenerar uma completa árvore ductal mamária (Stingl et al., 2006).

2.7 Considerações sobre o ciclo celular e tumores de mama

Após disseminação num órgão secundário, as CMCM podem sofrer três destinos: morte, dormência ou crescimento. Foi proposto uma classificação de fenótipos em dormência celular, ou seja, células entrando em quiescência reversível em G0, e massa tumoral dormente, que representa um pequeno aglomerado de células onde a proliferação é contrabalançada pela apoptose devido à falta de nutrientes, aporte sanguíneo ou por causa do sistema imunológico (Linde et al., 2016; Goddard et al., 2018; Weidenfeld e Barkan, 2018; Lan et al., 2019). No entanto, é provável que esses estados coexistam no mesmo paciente e provavelmente as mesmas células podem flutuar dinamicamente entre esses diferentes estados.

Em contrapartida, os mecanismos de parada do crescimento geralmente se dividem em três principais categorias: quiescência, diferenciação terminal e senescência (Pack et al., 2019). Enquanto o primeiro é reversível após retirada de sinais restritivos, este último está associado a saída permanente do ciclo celular e ativação persistente de sinais de estresse. Quinases dependentes de ciclina (CDK) promovem a proliferação celular inibindo a família de proteínas Rb (P107, P130), inversamente, CDK são inibidos por inibidores de CIP / KIP (P21, P27, P57) e inibidores de INK4 (como P16). Fatores intrínsecos e extrínsecos são integrados a regulação deste mecanismo central, por exemplo, a diminuição do aporte sanguíneo desencadeia a regulação positiva de P27 e interrompe a proliferação, enquanto que as CDKs são induzidas por sinais mitogênicos. O dano ao DNA é o sinal interno que regula a proliferação e medeia a parada de crescimento via estabilização de P53 e seu alvo P21 (Bragado et al., 2013; Touny et al., 2014). Pouco se sabe sobre o papel do ciclo celular em relação aos diferentes estágios do fenótipo adormecido metastático e se células adormecidas estão mais próximas de quiescência ou senescência no ciclo celular.

Assume-se que as células dormentes são inerentemente resistentes à quimioterapia convencional (Wells et al., 2013; Linde et al., 2016). Se as células dormentes fossem inativas ou submetidas a proliferação, em que a taxa de proliferação é compensada por apoptose, haveria um profundo impacto no desenho de novas terapias.

Dados recentes mostram que a quimiorresistência está em parte ativamente apoiada pelo nicho metastático e não é apenas um consequência da parada do ciclo celular (Carlson et al., 2019). Além disso, recentemente foi demonstrado que vários pacientes com metástase óssea, com resistência ao tratamento com FEC (fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida), beneficiaram de tratamento adicional com docetaxel. Como este fármaco induz estabilização de microtúbulos, parada do ciclo celular no G2, fase M e apoptose, isso sugere que uma fração considerável de células adormecidas ainda apresentam atividade proliferativa (Naume et al., 2014; Goddard et al., 2018). Notavelmente, pacientes com células cancerígenas disseminadas e inativas, persistentes mesmo após a segunda terapia, apresentam pior prognóstico, apoiando a ideia de que lesões metastáticas se desenvolvem a partir células cancerígenas disseminadas adormecidos pré-existent (Braun et al., 2005; Naume et al., 2014).

2.8 Células-tronco cancerígenas e câncer de mama

As células-tronco cancerígenas (CSC) apresentam uma população rara de células tumorais que, devido à auto-renovação e capacidade de diferenciação, são responsáveis pelo início e manutenção do tumor. Também são consideradas uma fonte de metástases (Krawczyk et al., 2014), associadas ao mau prognóstico e alta agressividade do CM (Abreu et al., 2020).

Avanços na tecnologia genética, mostraram que os CSC, como as células tumorais primárias, exibem heterogeneidade genética (Pestrin et al., 2015; Shaw et al., 2017). No entanto, existem poucas informações sobre alterações genéticas específicas que possam estar associadas ao potencial metastático das CSC, particularmente com uma maior capacidade de migrar, intravasar, alterar o metabolismo energético, interagir com plaquetas e células imunes do sangue e ser resistente à terapia (Lim et al., 2019; Wang et al., 2018; Lim et al., 2019). Os dados atualmente disponíveis indicam heterogeneidade genética das CSC no mesmo paciente, bem como diferenças na paisagem mutacional entre os CSC e o tumor ou metástases primárias. Esses achados indicam que apenas parte das células tumorais primárias tem capacidade de invasão e uma grande porcentagem de CSC morre na circulação. A sobreposição entre CSC e o

tumor primário dependem, entre outros fatores, da heterogeneidade do tumor (Paoletti et al., 2018).

Até o momento, as CSC foram identificadas em muitas neoplasias malignas. No entanto, suas características biológicas foram descritas principalmente por citometria de fluxo, sequenciamento, análise de FISH e PCR, técnica espectroscópica (SERS), entre outras (Kaminska et al., 2019; Millner et al., 2013). Alguns autores indicam que modelos *in vitro* e *in vivo* também podem ser utilizados para estudar o fenótipo de CSC (Samanta e Semenza, 2018).

Ainda há poucos recursos para tratamento de tumores metastáticos, portanto, metástases continuam sendo a principal causa de mortalidade por câncer (Lawson et al., 2018). A principal causa da terapia anti-metastática malsucedida são as diferenças genética e fenotípica entre as metástases e o tumor primário. Por um lado, isso se deve ao fato da evolução clonal das células metastáticas e, por outro lado, a heterogeneidade dos CSC formadoras secundárias de focos tumorais. Em outras palavras, apenas parte das células tumorais primárias entra na corrente sanguínea, a maioria das células morre na circulação. As demais CSC, que refletem a paisagem genética do tumor primário em menor grau, são capazes de formação de metástases (Massague et al., 2016).

A avaliação de CSC metastáticas pode ser usada para prever a probabilidade de metástase e também para determinar medidas diagnósticas e terapêuticas necessárias. Além disso, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamentos ou medicamentos baseados em um retrato molecular de CSC metastáticas parecem promissores. Isso seria permitir a eliminação de tais células tumorais não somente na circulação como no local primário, impedindo sua entrada na corrente sanguínea. Até o momento, não há opções de tratamento antitumoral com base no direcionamento de futuras metástases. No entanto, vários métodos terapêuticos visando eliminar inicialmente o risco de doença metastática foram propostos (Owens e Nylor, 2013).

Foi provado que a terapia anti-HER2 em pacientes com CM com CTC HER2+ aumenta significativamente a sobrevida (Liu et al., 2013). O gefitinibe, um medicamento anti-EGFR, mostrou-se altamente eficaz para pacientes com CM avançado com expressão de EGFR (Kalykaki et al., 2014). Um estudo recente propôs

através de imunofluorescência um painel de marcadores (Top1, Top2, Ki67, RAD51, ABCG2 e H2AX) combinado com ensaio de detecção de apoptose TUNEL, focada nos CTC e projetada para prever a resposta à terapia. Este trabalho demonstrou que o tratamento com erinotecano melhora a sobrevida global de pacientes com CM com baixa expressão de Top1 (Rugo et al., 2018).

Atualmente, há dezenas de ensaios clínicos avaliando CTC para prever o efeito da terapia em pacientes com diferentes tipos de câncer e a efetividade de vários medicamentos direcionados a essas células. Por exemplo, em um estudo randomizado multicêntrico avaliou a eficácia do lapatinibe, um medicamento anti-HER2 / EGFR, realizado em pacientes metastáticos, inicialmente negativos para HER2 com posterior HER2+ (Alqaisi et al., 2014; Nielsen et al., 2004).

Embora o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos têm aumentado significativamente as taxas de sobrevida de pacientes com CM, aproximadamente 20-30% desses pacientes diagnosticados precocemente irão apresentar recidiva e evoluirão para óbito (Austreid et al., 2014; Bray et al., 2018).

2.8.1 Marcadores moleculares de células-tronco de câncer de mama

Embora vários estudos buscam identificar CSC através de marcadores de superfície celular, ainda não há correlação em relação ao subtipo molecular. Diversos biomarcadores já foram propostos (Abraham et al., 2007; Ginestier et al., 2007), mas se faz necessário um padrão universal de marcadores que identifiquem especificamente as células-tronco de CM. A heterogeneidade morfológica e molecular do CM, juntamente com variáveis clínicas contribuem para essa complexidade (Symmans et al., 1995). A identificação das CSC é baseada na avaliação de marcadores moleculares, como o CD44 e Ck. A **Figura 4** ilustra os marcadores e suas funções no metabolismo celular tumoral e não tumoral.

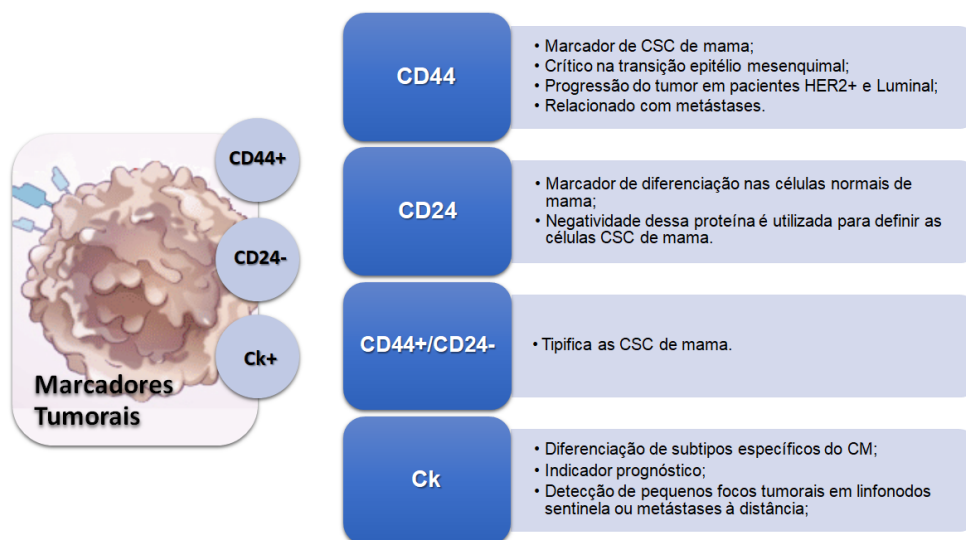


Figura 4: Relação de células-tronco cancerígenas com diferentes marcadores, definindo diferenciação celular e prognóstico. Adaptada de Paula et al. (2017); Leibold et al. (2019); Al-Hajj et al. (2003); Madjd et al. (2009); Xu et al. (2015); Blick et al. (2010); Shao et al. (2012).

A heterogeneidade intra-tumoral implica que um único tumor pode conter várias populações de células tumorais, exibindo diferentes perfis moleculares e propriedades biológicas (Martelotto et al., 2014). De acordo com esse conceito, diferentes fenótipos do CM foram descritos, alguns associados a alta proliferação e desfecho clínico desfavorável (Xiao et al., 2008). É importante definir quais fenótipos têm alto potencial de desenvolvimento de CSC, progressão tumoral e resistência à terapia (Croker et al., 2009).

A expressão do marcador CD44 de células de CM está associado à progressão da doença, maior probabilidade de metástase à distância e diminuição de sobrevida global (Da Cruz et al., 2014). Os marcadores CD44, CD24 e citoqueratina (Ck) também foram utilizados para avaliar células tumorais disseminadas em amostras de medula óssea de pacientes com CM. A maioria das células tumorais disseminadas da medula óssea apresentavam CD44+/ CD24-, associado a um mau prognóstico em pacientes (Balic et al., 2006).

Theodoropoulos et al. (2010) demonstraram células tumorais circulantes detectadas em 67% dos pacientes com CM, 35% dos quais tinham Ck+/CD44+/CD24-. Wanget al. (2012) encontraram a proporção de CD44+/CD24- em sangue periférico de pacientes com CM com mais elevados níveis dos marcadores conforme estágio do tumor e sugeriram, que a presença dos marcadores pode ser usada para orientar a terapia e prever prognóstico.

Paula et al. (2017) caracterizaram CD44+/CD24-/Ck+ em lesões mamárias não malignas e malignas. Os autores descobriram que a intensidade média de fluorescência de CD24 e Ck é significativamente menor em células malignas em comparação com amostras não malignas. Isto está relacionado ao fato de CD24 ser um marcador de diferenciação em células epiteliais da mama normais, sendo a perda de diferenciação uma característica geral das células malignas (Bane et al., 2013). Os autores encontraram também, um aumento gradual na porcentagem de CD44+/CD24-/Ck+ em células não malignas e lesões de carcinoma ductal *in situ* e carcinoma ductal invasor. Alguns estudos estabeleceram a relação CD44+/CD24-com as propriedades invasivas de carcinomas ductais *in situ* (Sheridan et al., 2006; Makki et al., 2014).

Hardt et al. (2012) isolaram CD44+/CD24- de carcinoma primário de mama ER+. Diversos estudos mostram que, essas diferenças biológicas estão associadas a uma variação na resposta ao tratamento e no desfecho clínico da doença (Millar et al., 2009; Haffty et al., 2006).

De acordo com a hipótese de CSC, um subconjunto de células, definidas como células iniciadoras de câncer, apresentam relevância nas metástases tumorais e recorrência do câncer após quimioterapia (Yu et al., 2012; Wang et al., 2015). Esta subpopulação residente em um tumor primário heterogêneo, exibe propriedades invasivas, bem como a capacidade de crescimento (Wolf et al., 2013; Sheridan et al., 2006). Isolado de biópsias sólidas e linhagens de células tumorais, as CSC são atualmente identificadas pela expressão do antígeno de superfície usando marcadores de células-tronco, incluindo CD24 e CD44 (Ponti et al., 2005; Krawczyk et al., 2014).

A metástase envolve deslocamento de células tumorais do tumor primário e intravasamento para o circulação, onde são identificadas como CTC (Zhang et al.,

2013). A presença de CTC no sangue representa uma etapa crucial no processo metastático, conforme indicado pelo seu valor prognóstico para vários tipos de tumores, incluindo o CM. É importante ressaltar que os resultados de uma meta-análise recente evidenciam que a detecção e a quantificação de células tumorais circulantes representa um indicador prognóstico de CM metastático (Cristofanilli et al., 2019).

2.9 Citometria de fluxo

Como mencionado no tópico anterior, os marcadores de superfície celular, incluindo glicoproteínas e Ck, altamente expressos nas CSC podem ser quantificados por meio de citometria de fluxo. A citometria de fluxo é um instrumento sofisticado que mede múltiplas características físicas de uma única célula, como tamanho e granularidade simultaneamente, à medida que a célula flui em suspensão através de um dispositivo de aferição, como mostrado na **figura 5**. Seu funcionamento depende das características de dispersão da luz nas células sob investigação, que podem ser derivadas de corantes ou anticorpos monoclonais direcionados a moléculas extracelulares localizadas na superfície ou moléculas intracelulares no interior da célula. Essa abordagem faz da citometria de fluxo uma ferramenta para análise detalhada de populações complexas em um curto período de tempo. Os dados obtidos podem fornecer informações valiosas sobre aspectos bioquímicos, biofísicos e moleculares das partículas. A dispersão da luz é diretamente relacionada às propriedades estruturais e morfológicas das células, enquanto a emissão de fluorescência deriva de um sonda de fluorescência e é proporcional à quantidade de sonda fluorescente ligada à célula ou componente celular (Macey, 2010; Adan et al., 2017).

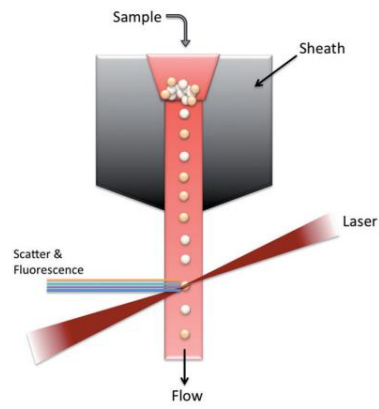


Figura 5: O princípio de um citômetro de fluxo. Fonte: Adan et al. (2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade de cultivo *in vitro* de células progenitoras/células-tronco oriundas de espécimes cirúrgicas de tumores de câncer de mama e investigar a presença de marcadores moleculares do câncer.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o estadió anatomopatológico de biópsias de carcinoma ductal *in situ*;
- Avaliar a expressão imunohistoquímica do ER, PR, HER2 e Ki67 em amostras de biópsias de carcinoma ductal *in situ*;
- Cultivar *in vitro* células progenitoras/células-tronco oriundas de biópsias de carcinoma ductal *in situ*;
- Avaliar alterações *in vitro* na morfologia e padrão de crescimento de cultivos submetidos a digestão celular e cultivos primários;
- Investigar alterações *in vitro* observadas entre cultivos tumorais e não tumorais;
- Avaliar a expressão dos marcadores moleculares CD44/CD24/Ck de células progenitoras/células-tronco em cultivo celular proveniente de biópsias de carcinoma ductal *in situ*;
- Relacionar a expressão dos marcadores moleculares CD44/CD24/Ck de células progenitoras/células-tronco com o padrão de expressão de ER, PR, HER2;
- Relacionar a expressão dos marcadores moleculares CD44/CD24/Ck de células progenitoras/células-tronco com parâmetros de estadiamento do tumor;
- Descrever o desfecho clínico das pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* dois anos após a data da realização da biópsia;

- Relacionar a expressão dos marcadores moleculares CD44/CD24/Ck de células progenitoras/células-tronco com o desfecho clínico das pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* dois anos após a data da realização da biópsia.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Os pacientes (n=6) com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* foram submetidos a cirurgia de mastectomia, ressecção completa da mama, ou quadrantectomia, ressecção de um segmento ou setor da mama, para fins de diagnóstico e/ou tratamento no Hospital Geral de Caxias do Sul. Nenhuma paciente recebeu quimioterapia, terapia endócrina ou radioterapia antes da cirurgia. Decisões de tratamento e do procedimento cirúrgico foram baseados exclusivamente em recomendações médicas.

4.2 Comitê de ética em pesquisa

Esse estudo foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ensino e Pesquisa do Hospital Geral (protocolo 35/2017). Participaram do estudo pacientes do serviço de oncologia (UNACON) do Hospital Geral de Caxias do Sul. Todas as pacientes assinaram o termo de Consentimento Livre Esclarecido previamente ao seu envolvimento no estudo. O Termo de Compromisso e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido constam anexados neste documento.

4.3 Amostras tumorais

As amostras coletadas (n=6) por meio de procedimento cirúrgico de mastectomia ou quadrantectomia em Bloco Cirúrgico do Hospital Geral de Caxias do Sul foram visualmente segregadas em parte tumoral e a margem de segurança, tecido benigno, por um médico patologista. As peças cirúrgicas ressecadas foram encaminhadas para o Laboratório Centro de Patologia Médica localizado em Caxias do Sul para procedimento de fixação, emblocamento e coloração padrão com hematoxilina e eosina para diagnóstico tumoral. As peças parafinizadas foram submetidas a análise

imunohistoquímica, conforme descrição na seção “Análise Imunohistoquímica dos Antígenos ER, PR, HER2, Ki67 em Peça Cirúrgica”.

Pequenos fragmentos benignos e tumorais das peças cirúrgicas, com dimensões de aproximadamente 5 mm, foram suspensos em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium - low glucose (DMEM), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 20% e PS 1% (1 g/mL de estreptomicina, 100 unidades/mL de penicilina. Os espécimes foram encaminhados para o Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA para serem cultivados *in vitro*.

4.4 Classificação dos tumores

A espécime cirúrgica foi classificada conforme o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, que baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros receberam graduações, de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente.

4.5 Análise imunohistoquímica dos antígenos ER, PR, HER2 e Ki67 em peça cirúrgica

As peças cirúrgicas contendo os tumores emblocadas em parafina foram avaliadas para os marcadores ER, PR, HER2 e Ki67. Inicialmente, as amostras tumorais foram seccionadas em 3 µm com micrótomo para avaliação imunohistoquímica. As lâminas foram desparafinizadas com banhos de xilol e hidratadas com concentrações decrescentes de etanol. Após recuperação antigênica, as amostras foram tratadas com os seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal Mab para ER (Dako, Glostrup Dinamarca diluição 1/100), MAb para PR (Dako diluição 1/800), MAb MIB-1 para antígeno Ki-67 (Immunotech, Marselha França, 1/2000) e anti-soropoliclonal (Dako diluição 1/3200) com a proteína HER2 para o gene *her-2-neu*. A análise Imunohistoquímica foi realizada no Laboratório de Centro de Patologia Médica

localizado em Caxias do Sul. A **Figura 6** mostra padrões de expressão proteica para cada marcador e os anticorpos utilizados neste estudo, bem como o sanduíche molecular para evidenciar a marcação imunohistoquímica do antígeno tecidual.

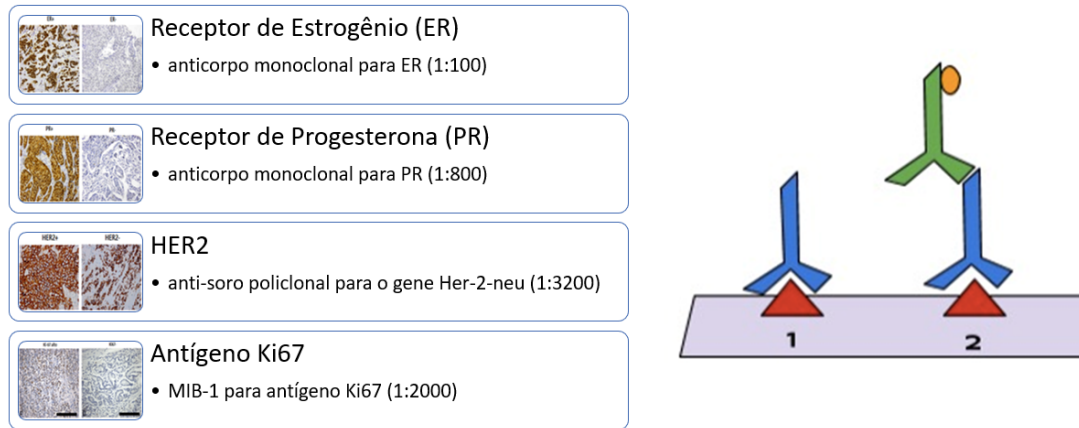


Figura 6: Padrão de marcação imunohistoquímica para ER, PR, HER2 e Ki67. A direita da figura, padrão de marcação molecular com detecção de antígeno (triângulo vermelho), em contato com o anticorpo primário (azul), secundário (verde) e sistema de detecção a base de diaminobenzidina (amarelo). Adaptada de Lee et al. (2011); Principles of immunohistochemistry staining / Cells Signaling Technology (2020).

4.6 Cultivo celular primário de tumores de mama

Uma amostra de cada tumor de mama foi removida da peça cirúrgica e encaminhada ao Laboratório de Genômica, Proteômica e reparo de DNA. As amostras foram incluídas em meio DMEM imediatamente após a cirurgia. Foi utilizado meio DMEM com baixo conteúdo de glicose, suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 20% e PS (1 g/mL de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina). As células aderentes foram cultivadas a 37 °C a 5% de CO₂ em frascos para cultivo celular com área de 12,5 cm³

4.7 Isolamento de células-tronco

Dois grupos (1 e 2) foram gerados para cada amostra coletada: Grupo 1 – Amostras submetidas ao processo de digestão enzimática com collagenase tipo I (100 mg/mL) e protease (20 mg/mL) para isolamento de células progenitoras em cultivo. A enzima collagenase é amplamente utilizada pois degrada tecidos conjuntivos e promove a dissociação da matriz extracelular. Este mecanismo é potencializado pela enzima protease (Wolters et al., 1992; Soldatow et al., 2013). O processo de dissociação enzimática do tecido foi iniciado dentro de 2 horas pós cirurgia; Grupo 2 – Amostras submetidas apenas ao cultivo celular sem digestão prévia. O esquema abaixo na **Figura 7** representa a forma que a amostragem foi organizada. Além disso, em ambos os grupos os processos foram realizados tanto para o tecido maligno quando para a margem de segurança (tecido benigno) para fins comparativos.

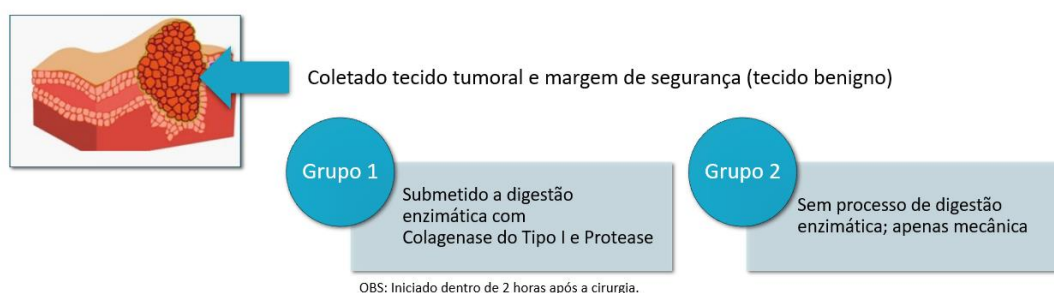


Figura 7: Representação esquemática quanto a organização do quadro amostral deste estudo em grupos: 1) que recebeu a digestão enzimática; 2) sem digestão enzimática.

4.8 Análise morfológica das culturas celulares

A presença das células aderentes, assim como sua confluência foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase Brastec. Para atingir um maior número de cópias, as células foram cultivadas em frascos para cultura de 75 cm³ por aproximadamente 4 e 8 semanas para o grupo 1 e 2, respectivamente, ou até confluência de 80%. Abaixo a **Figura 8** está elucidando um esquema representativo do cultivo de células primárias.

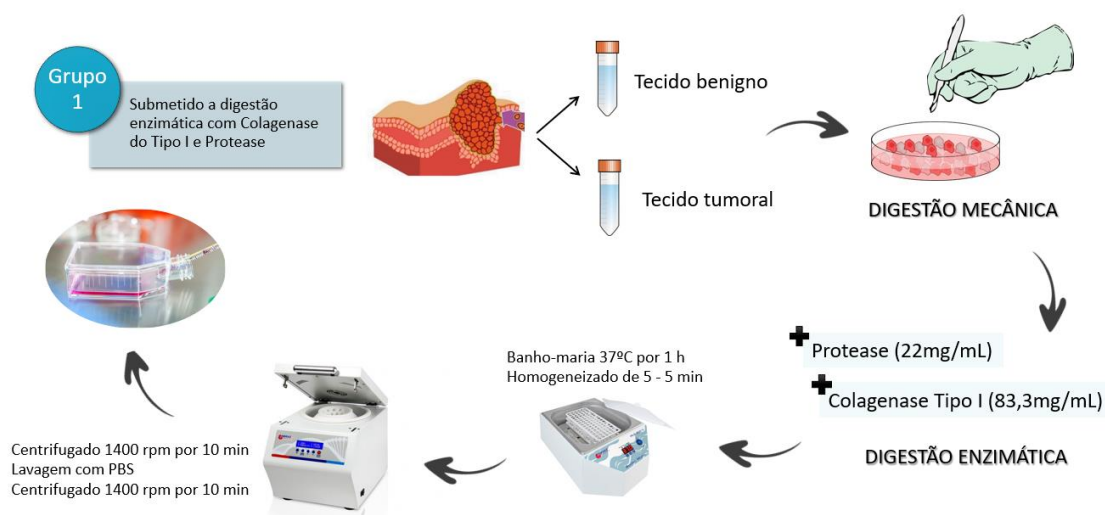


Figura 8: Esquema representativo das amostras que receberam digestão enzimática (Grupo 1). Etapas do cultivo de células primárias desde a coleta dos espécimes de tecido mamário de células displásicas e malignas até o isolamento de células.

4.9 Análise imunofenotípica das células cultivadas

A fim de verificar a presença de CSC e quantificá-las nos diferentes grupos testados, as células em suspensão foram marcadas com os marcadores CD44 APC, CD24 PE e Ck PE (BD Biosciences). A Ck utilizada corresponde a Ck 7 e 8. Foi adicionado às células em suspensão 250 μ L da solução de fixação/permeabilização no tubo por 20 minutos a 4°C. Após, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de BD Perm/Wash™ buffer 1 X (solução de permeabilização). Em seguida, realizou-se a etapa de incubação dos anticorpos por 30 minutos ao abrigo da luz a 4°C, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS. Posteriormente, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), equipado com dois lasers (488 e 633 nm) no laboratório de Microbiologia Aplicada da UCS. O equipamento foi ajustado para as condições de análise de tamanho e complexidade celular e o ajuste de fluorescência foi realizado com auxílio dos controles isotópicos, a fim de eliminar a possibilidade de marcação falso-positiva. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se em torno de 5.000 eventos para cada amostra. Para calibração do equipamento, antes de cada análise, beads de compensação para os fluorocromo

escolhidos foram utilizadas a fim de evitar marcação inespecífica de fluorocromos/marcadores. A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FlowJo (BD Biosciences).

5 RESULTADOS

5.1 Amostras tumorais e classificação dos tumores

Do n amostral inicialmente proposto (n=12), apenas 50% das amostras (n=6) foram recuperadas em condições ideais após cultivo *in vitro*. Inicialmente, foi selecionado um quadro amostral de 20, sendo que destas 12 amostras foram para cultivo, resultando em 6 amostras analisadas ao final. Os fatores de perda estão relacionados ao processo de cultivo, o qual é longo e, desta forma, as amostras tumorais em meio de cultura controlado ficam sujeitas a adversidades como contaminação, morte celular, entre outros fatores. Foram consideradas para avaliação neste estudo apenas amostras que apresentavam padrões morfológicos e fenotípicos ideais para processamento.

As amostras selecionadas após cultivo foram classificadas de acordo com a extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Das amostras em estudo, 33,3% foram classificadas com extensão anatômica T1, onde o tumor apresenta tamanho inferior a 20 mm e 67,3% foram classificadas com extensão anatômica T2, o que corresponde a uma lesão entre 20 e 50 mm de dimensão. 50% das amostras apresentaram acometimento de linfonodos (N1) e apenas uma (16,6%) apresentou metástase à distância (M1). Os dados estão listados na **Tabela 1**. A idade das 6 pacientes avaliadas neste estudo variou de 40 a 71 anos de idade.

Tabela 1: Classificação do Tumores estudados segundo Sistema TNM

Amostra	Idade	Extensão anatômica da doença (T)	Características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N)	Presença ou ausência de metástases à distância (M)
4	71	1	1	0
5	50	2	0	0
9	71	2	1	0
10	47	1	0	0
11	46	2	1	1
12	40	2	0	0

5.2 Análise imunoistoquímica dos antígenos ER, PR, HER2 e Ki67 em peça cirúrgica

A classificação do fenótipo é baseada na avaliação dos ER e PR, superexpressão de HER2 e índice de proliferação celular Ki67, um anticorpo monoclonal que detecta um antígeno nuclear. De acordo com os diferentes fenótipos obtidos, são definidos cinco subtipos: luminal A (ER+, PR+, HER2- e Ki67 < 14%), luminal B-HER2- (ER+ e/ou PR+, HER2- e Ki67 ≥ 14%), luminal B-HER2+ (ER+ e/ou PR+, HER2+ e Ki67 ≥ 14%), triplo negativo (ER-, PR-, HER2- e > 30%) e HER2 superexpresso (ER-, PR-, HER2+ e ≥ 14%). Os tumores luminais têm sido associados a prognósticos mais favoráveis, enquanto os subtipos triplo negativo e a superexpressão de HER2 a prognósticos mais reservados.

A **Tabela 2** mostra os subtipos de tumores utilizados neste estudo, comparando a presença ou ausência de receptor de estrogênio, de progesterona, HER2 e Ki67. Entre as amostras avaliadas 100% expressam ER e PR. Quanto ao HER2, 33,3% das amostras

expressaram este receptor, sendo que um deles superexpressa (+3) e foi classificado como HER2+ (amostra 9). Todas as amostras foram positivas para Ki67. No entanto, a amostra 10 apresentou expressão de Ki67 inferior a 10% e foi classificada como Luminal A. As demais amostras apresentaram expressões superiores a 20%, indicando subtipo Luminal B.

Tabela 2: Análise imunohistoquímica das amostras tumorais estudadas quanto a presença de receptores de estrogênio, progesterona, HER2 e marcador de proliferação Ki67

Amostra	Receptor de estrogênio	Receptor de progesterona	CerbB2 (Her2)	Ki67	Fenótipo
4	Positivo 80%	Positivo 20%	Positivo (2+/4+)	Positivo 20%	Luminal B HER2-
5	Positivo 90%	Positivo em 90%	Negativo (1+/3+)	Positivo 40%	Luminal B HER2-
9	Positivo 90%	Positivo em 40%	Positivo (3+)	Positivo 60%	HER2+
10	Positivo em 95%	Positivo em 20%	Negativo	Positivo 10 %	Luminal A HER2-
11	Positivo 70%	Positivo 80%	Negativo	Positivo 20%	Luminal B HER2-
12	Positivo 95%	Positivo 20%	Negativo	Positivo 25%	Luminal B HER2-

5.3 Cultivo celular primário de tumores de mama e isolamento de células-tronco: análise morfológica das culturas celulares

A aderência das células aos frascos de cultivo, bem como o crescimento celular e o aumento da população mostrou estar relacionado ao tipo celular, benigno ou tumoral. A **Figura 9** compara uma amostra de cultivo primário de células tumorais com uma não tumoral. Pode-se observar um aumento na confluência nos cultivos de células malignas em relação as benignas.

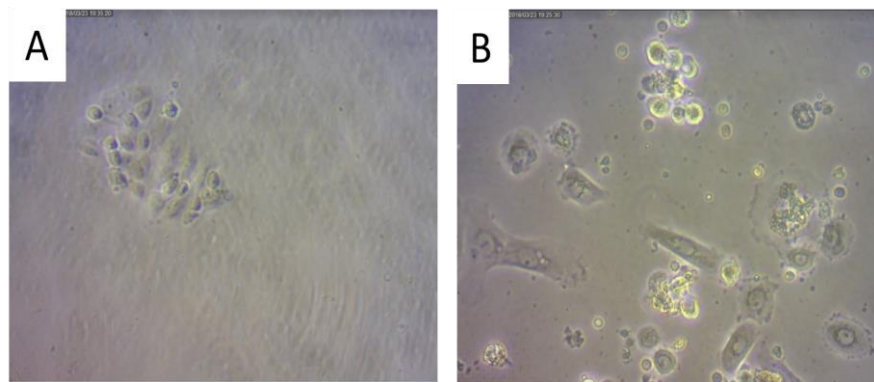


Figura 9: Cultivo primário *in vitro* de células não tumorais (A) e tumorais (B) obtidos por processo não enzimático referente a amostra 12. Imagens capturadas em aumento de 200x, 48 h após início do cultivo.

A **Figura 10** evidencia diferenças no padrão de crescimento *in vitro* de células que foram submetidas a processo de isolamento enzimático em relação as células que não receberam tratamento com enzimas. É possível observar que os cultivos isolados por meio do processo enzimático (isolamento), tanto de células malignas quanto benignas, exibiram um comportamento de replicação celular acelerado em relação ao processo mecânico (cultivo primário).

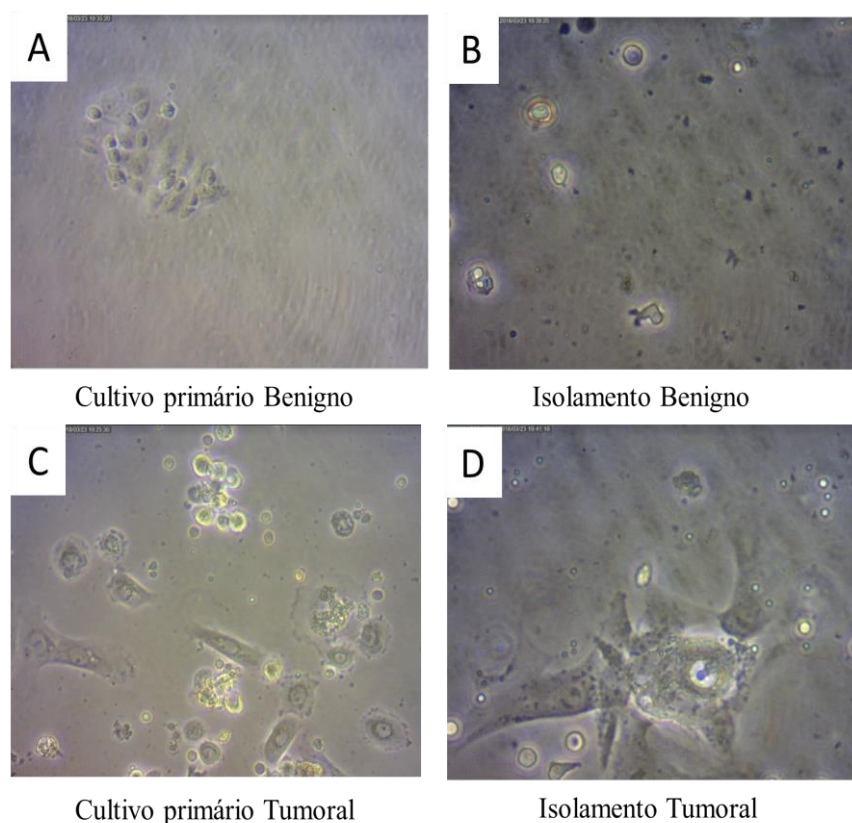


Figura 10: Comparação de cultivos celulares *in vitro* submetidos a diferentes condições. Nas linhas constam as células benignas (A e B) e malignas (C e D), enquanto nas colunas constam as células submetidas a processos mecânicos (A e C) e processos enzimáticos (B e D). As figuras são referentes a amostra 12. Imagens capturadas em aumento de 200x, em 48 h após início do cultivo.

Devido a coleta de amostras ocorrer em períodos distintos e, portanto, apresentando condições de cultivos diferentes, não foi possível correlacionar o fenótipo de pior prognóstico da amostra 9 com a exibição de um padrão de crescimento mais agressivo em relação às demais amostras.

A **Figura 11** evidencia um exemplo de amostra (12) com diferentes fases de crescimento em cultura, representando o dia 1, 2, 5 e 7 após o início do cultivo. Nesta imagem é possível verificar um aumento de confluência das células à medida que o tempo de cultivo é incrementado. Da mesma forma, é possível verificar que a

morfologia celular se modifica para um fenótipo mais alongado com o tempo, característica importante no processo de isolamento de células-tronco.

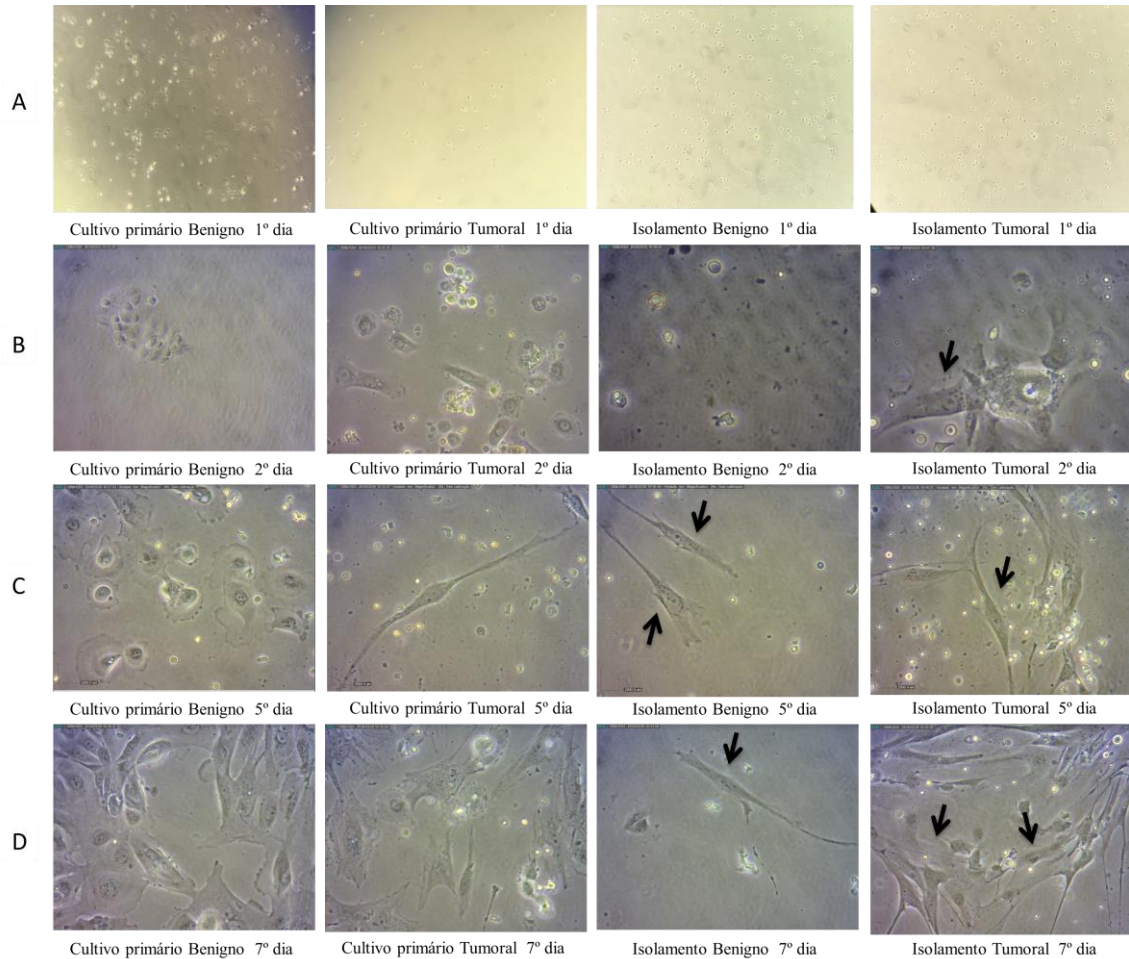


Figura 11: Amostra 12 em diferentes tempos de cultivo. (A) 1 dia; (B) 2 dias; (C) 5 dias; (D) 7 dias após o início do cultivo. As alterações fenotípicas características de célula-tronco podem ser visualizadas nas imagens. Células mais alongadas estão apontadas com setas. O grupo 1 (submetido à processo enzimático de isolamento de células-tronco/progenitoras) corresponde as colunas 3 e 4 da figura, nomeadas como “Isolamento Benigno ou Tumoral”. O grupo 2 (submetido apenas à processo mecânico) corresponde as colunas 1 e 2 da figura, nomeadas como “Cultivo Primário Benigno ou Tumoral”. Imagens capturadas em aumento de 200x.

5.4 Análise imunofenotípica das células cultivadas

Após a realização das biópsias e do cultivo celular (n=6), as amostras celulares foram preparadas para o ensaio de citometria de fluxo. Inicialmente havia sido proposto a realização de 4 tipos de cultivos celulares diferentes para cada amostra objetivando a análise por citometria, os quais incluem isolamento tumoral e isolamento benigno (processo enzimático) e cultivo primário tumoral e cultivo primário benigno (processo mecânico). A análise imunofenotípica de todas as amostras apresentou marcação para apenas 2-3% da população alvo que compreendeu de 5-10 mil eventos. Dado à necessidade de processamento das amostras e à obtenção de um elevado número de eventos para a execução da técnica de citometria, não foi possível realizar os ensaios para todas as condições propostas. Portanto, a avaliação dos marcadores moleculares CD44/CD24/Ck foi passível de realização em isolamento benigno nas amostras 4 e 10 e em isolamento tumoral nas amostras 4, 5, 9, 10 e 11. Quanto ao cultivo primário, foi realizada a identificação dos marcadores na condição benigna nas amostras 4, 5 e 10 e na condição tumoral nas amostras 4 e 10. A **figura 12** representa um fluxograma referente a quais amostras foi realizada a citometria de fluxo.

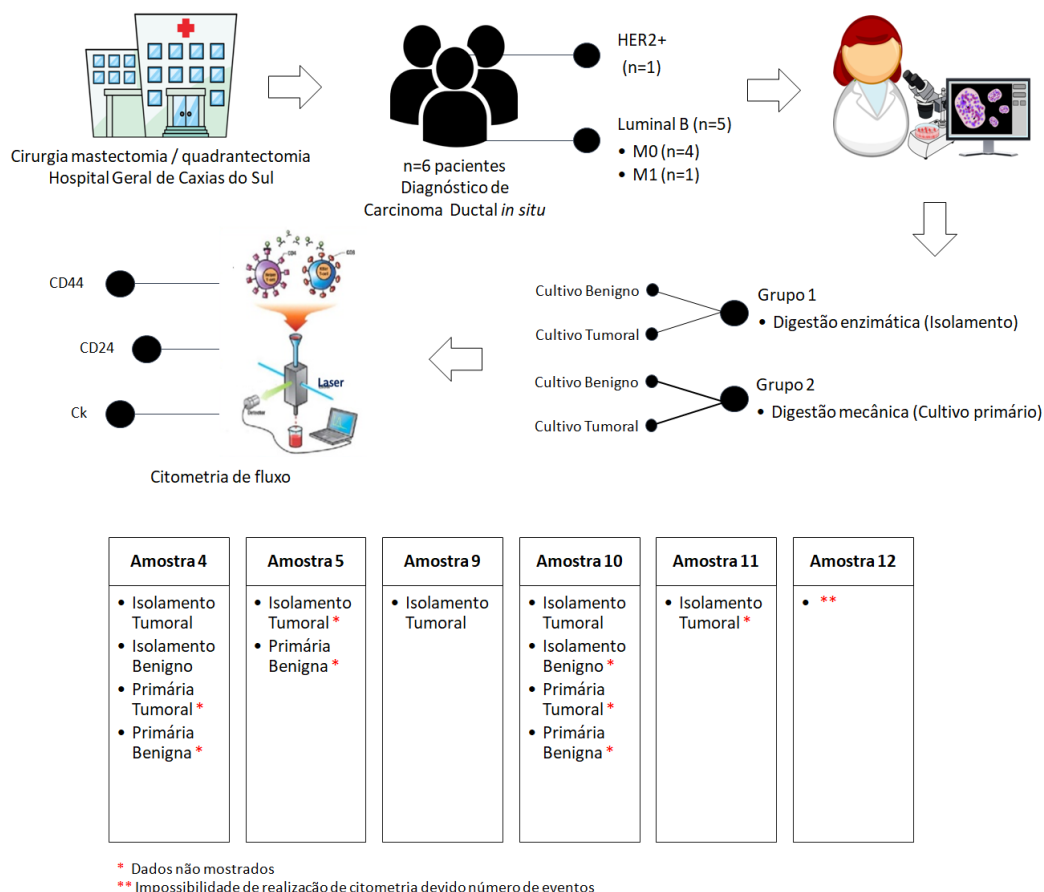


Figura 12: Fluxograma das amostras submetidas à citometria de fluxo. Seis pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal *in situ* foram submetidas à cirurgia de quadrantectomia ou mastectomia no Hospital Geral de Caxias do Sul. A biópsia realizada possibilitou classificar os tumores de acordo com expressão hormonal em Luminal A (n=1), Luminal B (n=4) e HER2+ (n=1). Entre os tumores Luminais B, 1 amostra apresentou metástase à distância. Um fragmento dos espécimes cirúrgicos foi submetido ao cultivo celular em 4 condições diferentes: processamento enzimático visando isolamento tumoral e isolamento benigno, e processamento mecânico visando cultivo primário tumoral e cultivo primário benigno. Posteriormente somente para algumas amostras foi realizada a identificação dos marcadores de superfície celular CD44/CD24/Ck conforme ilustra a figura.

Após cultivo *in vitro*, as células em suspensão apresentaram padrões fenotípicos de marcação para cada amostra. A **Figura 13** mostra diferenças no padrão de marcação entre amostra maligna e benigna do mesmo paciente (amostra 4). Todas as imagens são oriundas do padrão gerado pela citometria de fluxo. Pode-se observar um aumento de CD44 e Ck e redução de CD24 na amostra de isolamento tumoral quando comparado com a amostra benigna, com seus respectivos percentuais na **Tabela 3**.

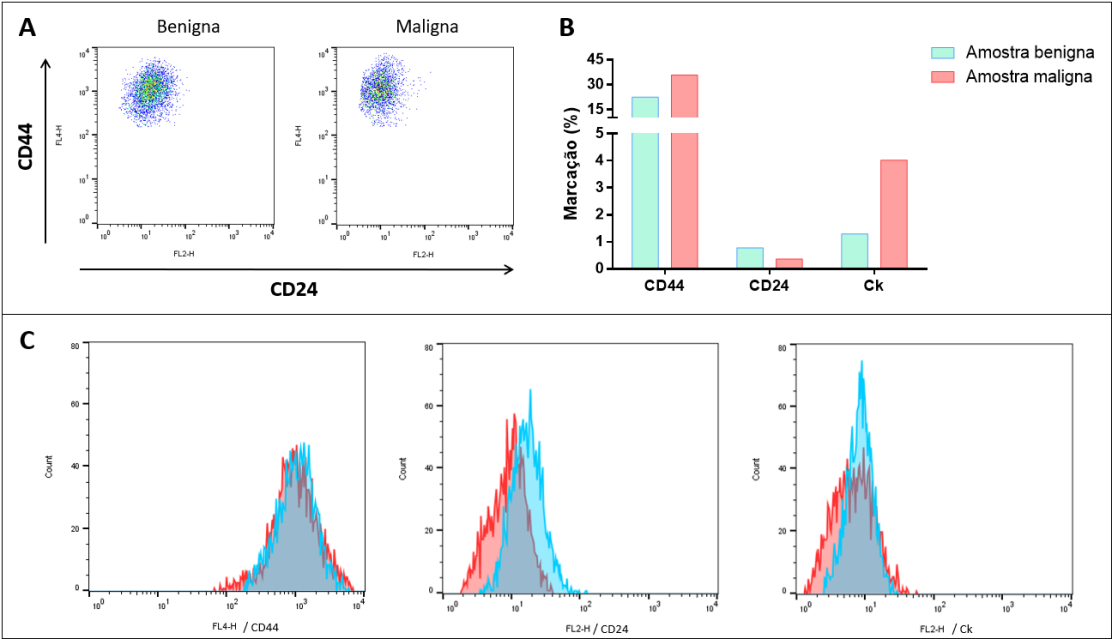


Figura 13: Identificação dos marcadores de superfície celular CD44/CD24/Ck em amostra de isolamento tumoral e benigno de mama. Os gráficos representam amostra da paciente 4 diagnosticada com carcinoma ductal *in situ* Luminal B. (A) Dispersão de CD44 (APC/FL4-H) versus CD24 (PE/FL2-H). (B) Percentuais de CD44, CD24 e Ck. (C) Sobreposição dos marcadores CD44 (APC/FL4-H), CD24 (PE/FL2-H) e Ck (PE/FL2-H) com 2000 eventos selecionados da população de interesse.

Tabela 3: Análise imunofenotípica da amostra de isolamento tumoral e isolamento benigno do paciente 4 quanto ao percentual dos marcadores CD44/CD24/Ck.

Marcadores		Resultados (%)
CD44	Benigna	22,48
	Maligna	35,76
CD24	Benigna	24,07
	Maligna	0,37
Ck	Benigna	1,29
	Maligna	4,02

Observou-se marcação de CD44, CD24 e Ck nas amostra 4, 9 e 10 (**Figura 14**). Como é possível visualizar na **Tabela 4**, a amostra 10 (Luminal A) apresentou aumento para CD44/CD24/Ck em relação as demais amostras. A amostra 9 (HER2+) apresentou menor expressão dos marcadores CD24 e Ck em comparação com os percentuais obtidos na amostra 4 (Luminal B).

Tabela 4: Análise imunofenotípica das amostras de isolamento tumoral 10 (Luminal A), 4 (Luminal B) e 9 (HER2+) quanto ao percentual dos marcadores CD44/CD24/Ck.

Marcadores		Resultados (%)
CD44	Amostra 10 (Luminal A)	99,87
	Amostra 4 (Luminal B)	38,84
	Amostra 9 (HER2+)	32,57
CD24	Amostra 10 (Luminal A)	1,67
	Amostra 4 (Luminal B)	1,96

	Amostra 9 (HER2+)	0,19
Ck	Amostra 10 (Luminal A)	14,23
	Amostra 4 (Luminal B)	1,59
	Amostra 9 (HER2+)	0,18

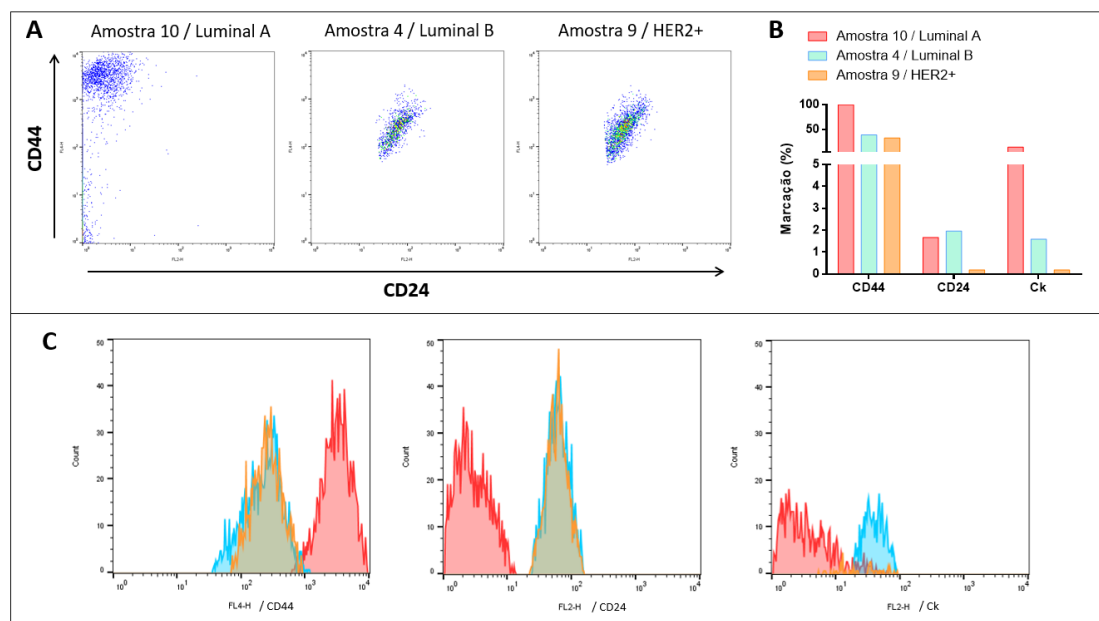


Figura 14: Identificação dos marcadores de superfície celular CD44/CD24/Ck em amostras tumorais de mama. Os gráficos representam amostras das pacientes 10, 4 e 9 diagnosticadas com carcinoma ductal *in situ* Luminal A, Luminal B e HER2+, respectivamente. (A) Dispersão de CD44 (APC/FL4-H) versus CD24 (PE/FL2-H). (B) Percentuais de CD44, CD24 e Ck. (C) Sobreposição dos marcadores CD44 (APC/FL4-H), CD24 (PE/FL2-H) e Ck (PE/FL2-H) entre as amostras 10, 4 e 9 com 1300 eventos selecionados da população de interesse.

5.5 Relação da expressão dos marcadores moleculares de células-tronco/progenitoras com o padrão de expressão imunohistoquímica e estadiamento do tumor

A relação da expressão dos marcadores moleculares de células-tronco/progenitoras (CD44/CD24/Ck) com o padrão de expressão imunohistoquímica (ER, PR e HER2) foi avaliada.

A amostra 9 classificada como HER2+ apresentou menor expressão da glicoproteína CD24 e de Ck em relação a amostra 4, classificada como Luminal B. Ainda, os baixos índices de Ck se relacionam com o acometimento de linfonodos sentinelas (N1) avaliado pelo estadiamento do tumor em ambas as amostras 4 e 9. Também, foi possível associar os baixos índices de Ck da amostra 9 com um pior prognóstico, HER2+. Este resultado também é suportado pelo fato da amostra 10 possuir um Ck elevado e não apresentar acometimento de linfonodos.

5.6 Análise do desfecho clínico dos pacientes

Foram coletadas informações, por meio de prontuários eletrônicos, a respeito do desfecho clínico dos pacientes, como mostrado na **Tabela 5**. Neste estudo, de acordo com o grau do tumor, apenas 1 amostra foi classificada como grau 1 (amostra 12), também denominada como grau baixo, onde as células se assemelham a células benignas. Dois tumores foram classificados como grau 2 ou grau intermediário (amostras 5 e 10) e 3 amostras foram classificadas como grau 3 ou grau alto (amostras 4, 9 e 11), identificadas como células com características morfológicas mais distintas das células normais.

Outro fator apresentado na tabela 5 é o estadiamento clínico (EC), no qual uma paciente foi classificada com estadiamento clínico IA (amostra 10), que corresponde a T1N0M0, sendo em geral tumores > 1 mm e < 5 mm na sua maior dimensão, ausência de metástases em linfonodos e à distância. Duas pacientes foram classificadas com EC IIA (amostras 5 e 12), podendo ser T0N1M0, T1N1M0 ou T2N0M0, tumores > 20 mm e < 50 mm na sua maior dimensão, com comprometimento de linfonodos ou não e ausência de metástases à distância. Duas amostras foram classificadas com EC IIB

(amostras 4 e 11), podendo ser T2N1M0 ou T3N0M0, que corresponde a tumores maiores que o EC IIA, além de comprometimento de linfonodos ou não e ausência de metástases à distância. Apenas uma amostra foi classificada com EC IIIA, que corresponde a T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 ou T3N2M0, tumores > 50 mm, com acometimento de linfonodos e ausência de metástases à distância. Embora por análise do sistema TNM, na Tabela 1, tenha-se relatado que a paciente 11 apresentou metástase à distância, a análise de estadiamento clínico confrontou o achado anterior e determinou ausência de metástases à distância.

Nota-se que todas as pacientes após cirurgia de quadrantectomia ou mastectomia foram submetidas a tratamento oncológico adjuvante. As pacientes das amostras 4 e 10 receberam 6 ciclos a cada 21 dias de quimioterapia adjuvante protocolo CMF com os medicamentos ciclofosfamida, metotrexato e fluoruracila. Enquanto que, as pacientes das amostras 5 e 11 receberam 4 ciclos a cada 21 dias de quimioterapia adjuvante protocolo AC com os medicamentos doxorrubicina (Adriblastina RD[®]) e ciclofosfamida seguido de 12 ciclos de paclitaxel semanal. O protocolo TC com os medicamentos docetaxel (Taxotere[®]) e ciclofosfamida, por 4 ciclos a cada 21 dias, foi empregado para as pacientes das amostras 9 e 12. Além da quimioterapia citotóxica convencional, a paciente 9, HER2+ foi submetida terapia anti-HER2.

Todas as pacientes estão em vigência de terapia endócrina adjuvante com anastrozol ou tamoxifeno devido à positividade para ER. Não foi necessária realização de radioterapia para as pacientes 5 e 12 devido à realização de mastectomia total. As demais pacientes foram submetidas à radioterapia, uma vez que nelas foi executada cirurgia conservadora de mama.

Tabela 5: Classificação das amostras de acordo com a classificação imunohistoquímica, grau tumoral, estadiamento clínico, tratamento quimioterápico adjuvante, hormonioterapia adjuvante e radioterapia.

Amostra	Fenótipo	Grau	EC	Quimioterapia Adjuvante	Hormonioterapia Adjuvante	Radioterapia adjuvante
4	Luminal B HER2-	3	IIB	CMF C6 (ciclofosfamida / metotrexato / fluoruracila)	Anastrozol	25 frações 5000 cgy+ boost leito tumoral 1000 cgy
5	Luminal B HER2-	2	IIA	AC C4 (doxorrubicina / ciclofosfamida) + paclitaxel semanal C12	Anastrozol	não fez radioterapia
9	Luminal HER2+	3	IIIA	TC C4 (docetaxel / ciclofosfamida) + trastuzumabe	Anastrozol	25 frações
10	Luminal A HER2-	2	IA	CMF C6 (ciclofosfamida / metotrexato / fluoruracila)	Tamoxifeno	20 frações
11	Luminal B HER2-	3	IIB	AC C4 (doxorrubicina / ciclofosfamida) + paclitaxel semanal C12	Tamoxifeno	25 frações
12	Luminal B HER2-	1	IIA	TC C4 (docetaxel / ciclofosfamida)	Tamoxifeno	não fez radioterapia

Legenda: Imunohistoquímica (Luminal A, Luminal B ou HER2+); grau tumoral (1-3); estadiamento clínico (EC) (I-IV); tratamento quimioterápico adjuvante: ciclofosfamida, metotrexato e fluoruracila (Protocolo CMF), doxorrubicina (Adriblastina RD®) e ciclofosfamida (Protocolo AC) + paclitaxel, docetaxel (Taxotere®) e ciclofosfamida (TC) hormonioterapia adjuvante e radioterapia.

6 DISCUSSÃO

O CM é uma doença altamente prevalente, representando a maior causa de morte por câncer. Sabe-se que seus diferentes subtipos, Luminal A e B, Luminal HER2+ e Triplo negativo, podem predizer o desfecho clínico das pacientes. Neste contexto, estudos evidenciaram a relação entre o CM e CSC, contribuindo para o desenvolvimento, progressão da doença, e capacidade de conduzir metástases. Essa relação pode ser conduzida por meio do estudo de biomarcadores de CSC. Além disso, pouco se conhece sobre a aplicabilidade clínica desses biomarcadores, que poderiam ser correlacionados com os subtipos moleculares do CM e predizer o desfecho clínico da doença.

Neste estudo foram avaliadas pacientes com diagnóstico de câncer ductal de mama, classificadas de acordo com sua malignidade e diferenciadas em relação a expressão de receptores hormonais em subtipo luminal A, luminal B ou HER2 positivo. Foram identificados os marcadores CD44/CD24/Ck, relacionados com a capacidade de invasão do tumor e migração em cultivo de células primárias de amostras de lesões não malignas e malignas de mama. A presença e/ou ausência destes marcadores está relacionada com os dados de estadiamento do tumor e subtipo molecular, podendo contribuir para o diagnóstico e prognóstico da doença, além da estratificação das pacientes de acordo com o risco de desenvolvimento de metástases.

Amostras de pacientes submetidos a cirurgia de quadrantectomia e mastectomia para fins de diagnóstico são classificadas de acordo com sua malignidade utilizando o Sistema TNM. Trata-se de uma escala visual de extensão da doença para determinar o estágio geral do tumor (Giuliano et al., 2017). Neste estudo foram incluídos espécimes com dimensão entre 20 e 50 mm, sem acometimento de linfonodo, ou acometimento em linfonodos axilares móveis.

Para suporte do diagnóstico, as análises imunohistoquímicas dos receptores hormonais e HER2 são conduzidas em biópsias tumorais e da margem de segurança da mama congeladas. Juntamente com os dados anatomopatológicos, a classificação

imunohistoquímica orienta a condução do tratamento oncológico (Goldhirsch et al., 2013; 2016).

A população do estudo foi prevalentemente distribuída no subtipo Luminal B/HER2-, pois apresentaram positividade para receptor de estrogênio e progesterona e índices elevados de Ki67, sem expressar HER2. Os tumores do subtipo Luminal B possuem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São tumores de pior prognóstico comparados aos Luminais A (Goldhirsch et al., 2013). Vale ressaltar que uma amostra tumoral avaliada neste estudo foi classificada como Luminal A (ER+, PR+, HER2- e baixos índices de Ki67). O ER é expresso em 75% dos casos de CM. É mais frequentemente relacionado com mulheres pós-menopausa e há uma sobrevida de 99% dos casos. A presença deste receptor torna o CM sensível à terapia hormonal, apresentando uma forte correlação com menor grau tumoral, baixos níveis de amplificação do HER2, expressão do RP, menor incidência de metástases ósseas e em tecidos moles, e taxas mais lentas de recorrência da doença (Murphy et al., 2016). As pacientes Luminais B deste estudo se beneficiaram da terapia endócrina direcionada para ER, com o uso de tamoxifeno ou inibidores da aromatase. Esse tratamento pode reduzir a recorrência local, recorrência distante e taxas de mortalidade (EBCTCG, 2005; 2011).

Em contrapartida, uma paciente foi classificada como Luminal HER2+, uma vez que além de expressar ER e PR, também apresentou marcação para HER2. O HER2 é expresso em aproximadamente 40% dos CM e acredita-se ser responsável por tumores mais agressivos e de mau prognóstico (Nuciforo et al., 2015). Em comparação com o subtipo Luminal B, é um tumor de pior prognóstico, associado a uma maior frequência de recorrência local-regional (Albert et al., 2010; Arvold et al., 2011). A superexpressão do gene HER2 é um forte marcador preditivo de resposta à terapia anti-HER2, como por exemplo, trastuzumabe, pertuzumabe e lapatinibe (Alqaisi et al., 2014; Wang; Xu, 2019). Neste estudo não houve casos classificados como Triplo negativo.

Após análises para estadiamento do tumor, faz-se importante avaliar características nessas células que possam predizer a capacidade de conduzir metástases,

como por exemplo a expressão de biomarcadores de superfície celular. Estas análises podem ser feitas em biópsias de mama. Entretanto exigem que as espécimes não tenham sido submetidas ao processo de congelamento, um maior tamanho de amostra, bem como realização de novos procedimentos invasivos desnecessários para coleta de amostras (Paula et al., 2017). Visando contornar essas limitações impostas pela avaliação imunofenotípica à fresco, este estudo realizou cultivo *in vitro* de células primárias adicionado de um processo enzimático a fim de isolar células-tronco de mama. Observamos, de fato, diferenças morfológicas e no tempo de replicação celular utilizando este processo, em relação ao cultivo primário. Este modelo torna-se útil para a compreensão do potencial proliferativo e apoptótico de CSC, sua capacidade de migração e invasão.

Como o câncer pode ser relacionado como uma doença de células-tronco, estudos sugerem que as CSC são originadas do próprio tecido e podem sofrer mutações somáticas. As CSC diferem das células benignas quanto ao grau de dependência do microambiente. Enquanto as células não tumorais são inteiramente dependentes de sinais do microambiente a fim de regular o seu estado proliferativo sob condições normais ou de reparo, as CSC exibem uma maior capacidade proliferativa por apresentarem células mais autossuficientes. Outra diferença das CSC em relação as benignas são seus padrões de glicosilação e seus marcadores de superfície celular. Muitos fatores solúveis do microambiente do tumor estão envolvidos na manutenção do fenótipo das CSC e o entendimento dessas células pode auxiliar na desenvolvimento de alvos para o tratamento do CM (Meads et al., 2009, Abdel-Salam et al., 2019).

As CSC podem ser identificadas, isoladas e caracterizadas através da expressão de diferentes biomarcadores celulares, entre eles glicoproteínas de superfície e citoqueratinas. A EMT é um processo celular de invasão dos tecidos adjacentes na qual há uma diminuição na adesão entre as células e estas adquirem mobilidade e atividades proteolíticas, mudando de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal. As características fenotípicas diferentes contribuem para proliferação, invasão, metástase e recorrência tumoral, bem como resistência a medicamentos (Makdissi 2006; Xu et al., 2015). A relação entre EMT e CSC de mama tem recentemente surgido com evidências

de que a transição de células epiteliais mamárias através da EMT gera células com propriedades de CSC (Blick et al., 2010).

Uma vez que células cancerígenas apresentam capacidade de autorrenovação e diferenciação celular, uma pequena população, conhecida como CSC, teria a capacidade de replicar formando novos tumores (Kumar et al., 2014). De fato, a análise molecular proposta por Liu e colaboradores (2011), revela que as CSC de CM podem exibir perfis imunofenotípicos distintos em comparação com os seus tumores de origem.

Estudos mostram que o processo EMT promove nessas células a expressão de CD44. O CD44, uma glicoproteína de superfície celular complexa e crítica na EMT, funciona como uma molécula de adesão celular. O CD44 foi inicialmente identificado como um receptor de componentes da matriz extracelular como o ácido hialurônico e de linfócitos, que participa de processos fisiológicos e patológicos, incluindo adesão celular, angiogênese, inflamação e desenvolvimento de tumores (Xu et al., 2015). Esse marcador tem sido relacionado com metástases tumorais e recentemente surgiu como um marcador de CSC de mama. A expressão da glicoproteína de superfície CD44 combinada com baixa expressão ou ausência da glicoproteína de superfície CD24 (CD44+/CD24-) tipifica as CSC de mama, demonstrado primeiramente por Al-Hajj et al., em 2003.

O CD24 é uma sialoglicoproteína de superfície celular que interage com P selectinas. A negatividade dessa proteína é utilizada para definir as células CSC de mama. Entretanto, maiores níveis de CD24 são indicativos de pobre prognóstico em diversos tipos de carcinoma, incluindo o de mama (Blick et al., 2010; Xu et al., 2015).

Neste cultivo celular *in vitro* foi possível a detecção de diferentes marcadores de superfície celular relacionados à agressividade do tumor. Primeiramente constatou-se uma maior proporção dos marcadores CD44+/CD24- nas células malignas quando comparado as células benignas. Os valores de CD44 encontrados na amostra maligna foram maiores em relação a benigna, enquanto que menores valores de CD24 foram observados, como o evidenciado por outros autores (Paula et al., 2017; Abdel-Salam et al., 2019). Este resultado é suportado pela teoria da transição epitélio-mesenchimal, onde

estudos descreveram que nas células malignas há diminuição da expressão de CD24 e aumento da expressão de CD44 (Blick et al., 2010; Paula et al., 2017).

Estudos têm mostrado a presença dos marcadores de superfície celular CD44 e CD24 em células tumorais de CM. Wenzhe et al. (2017) demonstrou em cultivo de células imortalizadas MDA-MB-231 (conhecida pela presença de ER, mas ausência de PR e HER2) expressão do marcador de superfície CD44 de 99,9% e CD24 de 0,8%. Paula e colaboradores (2017) detectaram uma menor fluorescência do marcador CD24 em amostras malignas à fresco em comparação com não-malignas, o que evidencia o fato de CD24 ser um marcador de diferenciação nas células epiteliais normais da mama e que no tumor há a perda de diferenciação, caracterizando células malignas. Ainda, encontraram um aumento no percentual de CD44+/CD24- e o correlacionaram com EMT em amostras de carcinoma ductal maligno.

Foi observado um aumento na proporção dos marcadores CD44+/CD24- para amostra com o subtipo Luminal A em relação as amostras do subtipo Luminal B e subtipo HER2+. Os marcadores CD24 e Ck para a amostra HER2+ vão ao encontro aos dados disponíveis na literatura (Blick et al., 2010; Shao et al., 2012), apresentando valores mais baixos do que na Luminal B. Entretanto, menores valores da glicoproteína CD44 nas amostras Luminal B e HER2+ em relação a Luminal A foram inesperados, uma vez que na literatura consta que tumores de pior prognóstico como um HER2+ apresentariam maior expressão de CD44 (Paula et al., 2017; Abdel-Salam et al., 2019).

Além das glicoproteínas de superfície outro biomarcador associado a diferentes subtipos moleculares do CM é a Ck. A Ck representa um dos tipos de filamentos intermediários constituintes das células eucarióticas. Vinte tipos diferentes de Ck foram identificados em células de mamíferos (Ck 1 a 20) (Shao et al., 2012), sendo que a expressão delas diferem nas células basais (Ck 5, 6 e 14) e células epiteliais luminais (Ck 7, 8, 18 e 19) da glândula mamária humana. Ainda, as células luminais podem ser positivas ou negativas para ER, PR e HER2 (Bharti Rattan et al., 2012). Durante o desenvolvimento de malignidade, o perfil de Ck original da célula é frequentemente mantido. Como resultado, diferentes tipos de CM são às vezes caracterizados de acordo com uma célula mamária de origem, com base na expressão diferencial dos padrões de

Ck (Shao et al., 2012; Chu; Weiss, 2002). Na prática, a avaliação dos perfis de Ck é usada para a detecção de pequenos focos tumorais em linfonodos sentinela ou metástases à distância. A expressão de Ck é também útil na diferenciação de subtipos específicos do CM e como um indicador prognóstico (Shao et al., 2012; Chu; Weiss, 2002).

Em relação à expressão de Ck, foi demonstrado neste estudo um aumento dos níveis de Ck 7 e 8 nas células malignas quando comparado aos níveis encontrados nas células benignas. De fato, Shao et al. (2012), descreve que as Ck 7 e 8 são marcadoras de células epiteliais luminais de glândula mamária. A expressão de Ck encontrada na amostra HER2+ foi menor do que os níveis expressos pelos subtipos Luminais A e B. Os baixos índices obtidos para Ck podem estar associados a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (Bharti Rattan et al., 2012), de encontro com o relatado na literatura de que o HER2 teria um prognóstico mais desfavorável em relação ao Luminais A e B. Além disso, uma vez que o perfil de Ck é utilizado para a detecção de pequenos focos tumorais em linfonodos sentinela (Shao et al., 2012), pode-se relacionar a expressão de Ck encontrada nas amostras 4 e 9 com o acometimento de linfonodos grau I (N1), descrito no estadiamento do tumor.

Um estudo conduzido por Shao et al. (2012), com análise de 575 casos de CM, observou a expressão de Ck em diferentes subtipos moleculares. O estudo revelou uma taxa de expressão de Ck 7 e 8 acima de 90% em todos os subtipos moleculares. Ck 18 e 19 também mostraram uma taxa de expressão > 90% em subtipos Luminal A, Luminal B e HER2+. Além disso, houve diminuição na expressão de Ck 5 e 6 no subtipo Luminal A. A expressão de Ck 20 foi encontrada em <10% de todos os subtipos moleculares. Apesar de sua baixa frequência comparado com outras Cks, a Ck 20 apresentou maior taxa de expressão no subtipo HER2+ (9% para a Ck 20 vs 6% para Ck 5 e 6 e 0% para Ck 14). Uma correlação positiva com o subtipo HER2+ foi demonstrada apenas para expressão de Ck 20, mas não para as outras.

No estudo de Bharti Rattan et al. (2012), a incidência da positividade Ck 8 e 18 foi de 85% dos casos. Como a maioria dos tumores surgem das células epiteliais luminais, observou-se que a medida que o grau aumentava, a positividade para Ck 8 e

18 também aumentava, com 56% dos casos de tumores grau III expressando Ck 8 e 18. No entanto, independentemente do grau do tumor, se for positivo para Ck 8 e 18, este apresenta bom prognóstico, em comparação com os tumores negativos para Ck 8 e 18. Uma expressão elevada de Ck 18 indica um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama e essa expressão apresenta maior impacto no prognóstico em comparação com outros fatores, como estado linfonodal e tamanho do tumor. As células altamente metastáticas estão associadas a uma perda da expressão Ck 8 e 18 e sua expressão é um fator prognóstico que prevê a sobrevida global.

No carcinoma invasivo de mama há positividade para Ck 7, 8, 18 e 19, indicando uma diferença do fenótipo glandular em relação ao fenótipo basal. Este dado está associado a positividade para ER, idade avançada da paciente e bom prognóstico. Em contrapartida, a expressão do marcador Ck mostrou significativa relação com um prognóstico ruim, negatividade do ER e uma idade mais jovem da paciente (Bharti Rattan et al., 2012). De fato, ambas as pacientes 4 e 9 avaliadas neste estudo possuem idade avançada (71 anos) e possuem baixos índices de Ck.

Os resultados obtidos no presente estudo apresentaram valores inferiores aos encontrados na literatura para marcadores avaliados por citometria de fluxo. Alguns fatores podem ter contribuído para essas discrepâncias. Sabe-se que o crescimento excessivo de células indiferenciadas produz uma perda das características fenotípicas do tecido do qual as células foram isoladas. A cultura primária geralmente é heterogênea, apresenta-se com crescimento restrito e limitada vida útil (Philippeos, 2011). O meio de cultura celular pode representar uma fonte significativa de variabilidade para os cultivos pois pode afetar negativamente o crescimento celular, a viabilidade, a produtividade ou ainda, interferir na expressão proteica (McGillicuddy et al., 2018). Além disso, como os cultivos celulares primários apresentam um número limitado de passagens, determinadas pelo número de replicações, o excesso de passagens ocasiona a perda de importantes características funcionais das células (Philippeos, 2011). Ademais, foram analisados neste estudo 5 a 10 mil eventos na análise imunofenotípica, no entanto a população de células-alvo compreendia 2 a 3% dos eventos analisados, colaborando para um percentual baixo de CSC. Juntos, estes fatores suportam os baixos índices encontrados neste estudo.

A fim de determinar o prognóstico e o tratamento clínico mais adequado para essas pacientes, deve ser considerado também o grau tumoral. A classificação quanto ao grau tumoral baseia-se na diferenciação celular, evidenciada por microscopia (OncoGuia, 2020; INCA, 2020). A avaliação do grau tumoral faz-se importante porque cânceres com mais alterações tendem a crescer e se disseminar mais rapidamente. As pacientes Luminais deste estudo enquadraram-se nos 3 tipos diferentes de escala tumoral, ou seja, possuíram baixo (12), intermediário (5 e 10) e alto (4 e 11) grau de diferenciação celular. A amostra de pior prognóstico HER2+ (9) foi caracterizada com grau 3 (alto índice de diferenciação celular). De acordo com a classificação de risco de Saint Gallen, amostras grau 3 são mais graves e podem se proliferar mais rapidamente (Goldhirsch et al., 2013). De fato, cânceres de alto grau tendem a altas taxas de proliferação e têm um prognóstico pior, portanto podem precisar de tratamentos diferentes do que os cânceres de baixo grau (OncoGuia, 2020; INCA, 2020).

Os valores do estadiamento do tumor (sistema TNM) não são os únicos que determinam o real estágio da doença. O estadiamento clínico é uma estimativa da extensão da doença com base nos resultados do exame físico, exames de imagem e biópsia de tumor (OncoGuia, 2020; INCA, 2020). Neste estudo, de acordo com o estadiamento clínico, a paciente Luminal A recebeu a classificação de melhor prognóstico, sendo em geral tumores maiores que 1 mm e menores que 5 mm na sua maior dimensão, ausência de metástases em linfonodos e à distância. As pacientes Luminais B foram classificadas com estadiamento clínico variando de IIA – IIB. Essa classificação corresponde a tumores maiores que 20 mm na sua maior dimensão, com comprometimento de linfonodos ou não e ausência de metástases à distância. Além disso, a paciente classificada como HER2+ recebeu o estadiamento clínico IIIA, de pior prognóstico que se caracteriza por tumores maiores que 50 mm, com acometimento de linfonodos e ausência de metástases à distância. Ressalta-se que embora a análise do sistema TNM tenha relatado que a paciente 11 apresentou metástase à distância, o estadiamento clínico contraria e evidencia ausência de metástases à distância. Este dado indica o quão é importante a análise do estadiamento clínico, uma vez que revisa os dados obtidos no sistema TNM auxiliando no diagnóstico e tratamento.

Todos as pacientes que cederam amostra para este estudo, fizeram uso de tratamento quimioterápico citotóxico padrão, incluindo ciclofosfamida, metotrexato e fluoruracila (CMF), doxorrubicina (Adriblastina RD[®]) e ciclofosfamida (AC) com paclitaxel, e docetaxel (Taxotere[®]) e ciclofosfamida (TC) (Fujii et al., 2015). Entre os protocolos quimioterápicos utilizados, AC é o mais comumente prescrito. Entretanto, 2 tipos de regimes sem antraciclinas (doxorrubicina), como TC ou regimes contendo platinas, podem ter eficácia similar ou maior. Ainda, o tratamento com TC parece ser superior ao AC com relação a sobrevida e menor toxicidade. Vale ressaltar que, para escolha da terapia quimioterápica outros fatores são avaliados, incluindo função hepática, renal e performance da paciente (Fujii et al., 2015). Nota-se que, por apresentar expressão de HER2, a paciente 9 se beneficiou de terapia anti-HER2 com trastuzumabe, além da adjuvância convencional (Alqaisi et al., 2014; Nielsen et al., 2004).

O protocolo padrão para CM de baixo risco é o CMF, no qual se enquadram tumores menores do que 20 mm, sem invasão vascular ou linfática e tumores HER2- (MOC, 2010), como as pacientes 4 (IIB) e 10 (IA). No entanto, devido estar relacionado com risco de cardiotoxicidade em pacientes idosos, o uso deste protocolo deve ser ponderado em pacientes com alguma cardiopatia associada (MOC, 2010). Esse risco pode ser reduzido com a substituição por taxanos (Biganzoli et al., 2012).

De fato, as pacientes 5, 9, 11 e 12 fizeram uso de taxanos. Taxanos em ciclo semanais apresentam ganho independentemente da expressão de ER, idade, grau de envolvimento linfonodal ou estado menopausal (MOC, 2010). Como submetido nas pacientes 5 e 11, a administração semanal de paclitaxel mostra superioridade em relação a docetaxel quanto a sobrevida livre de doença, tanto para pacientes ER+ quanto ER- (MOC, 2010). Em contrapartida, as pacientes 5 e 12 fizeram uso de protocolo TC. Docetaxel e ciclofosfamida mostraram superioridade em relação a doxorrubicina e ciclofosmamida com aumento na sobrevida livre de doença e sobrevida global (Biganzoli et al., 2012).

Protocolos de tratamento contendo antraciclinas, como a doxorrubicina e taxanos como o paclitaxel e docetaxel, são indicados para pacientes com acometimento

de linfonodos (Puhalla et al., 2008), como evidenciado nas pacientes 4, 9 e 11. Estudo de Jones et al. (2006) mostrou maior sobrevida livre de doença para protocolo com AC em relação ao TC. Em relação a toxicidade, mostrou surgimento de edema, mialgia, artralgia e neutropenia febril, náuseas e vômitos com aplicação de TC, principalmente em mulheres mais velhas. No entanto, mesmo com altas taxas de neutropenia febril, TC provou ser melhor tolerado, independentemente da idade. Apesar dos taxanos serem associados com alta toxicidade, a terapia em conjunto com antraciclinas é recomendada para pacientes idosos saudáveis e de alto risco.

A terapia hormonal adjuvante com tamoxifeno ou anastrozol foi indicada para todas as pacientes deste estudo, uma vez que todas apresentaram positividade para os receptores hormonais estrogênio e progesterona (EBCTCG, 2005; 2011). A quimioterapia adjuvante endovenosa adicionada de tamoxifeno têm apresentado melhores resultados, principalmente para ER+, independentemente da idade (MOC, 2010). No entanto, vale ressaltar que linhagens de CM hormônio positivas, MCF7 e T47D, têm apresentado resistência à terapia com tamoxifeno (Ojo et al., 2018), o que instiga saber se este protocolo de tratamento apresentará benefício as pacientes alvo deste estudo. Todas as pacientes permanecem em vigência do tratamento endócrino.

A radioterapia adjuvante desempenha um papel essencial no tratamento do CM e está relacionada com redução nas taxas de recorrência locorregional, melhorando a sobrevida global dos pacientes (Grantzau; Overgaard, 2014). A maioria das pacientes deste estudo foram submetidas à radioterapia, uma vez que neles foi executada cirurgia conservadora de mama. Não foi necessária radioterapia para as pacientes 5 e 12 devido realização de mastectomia total. Com o advento dos diagnósticos e cirurgias precoces, um maior número de pacientes é submetido à cirurgia conservadora da mama e, portanto, recebem radioterapia como parte de seu tratamento adjuvante (Grantzau; Overgaard, 2014).

Um melhor entendimento molecular do CM permite otimizar o diagnóstico da doença. Neste trabalho foi possível relacionar o grau de expressão dos marcadores de superfície com o padrão de expressão imunohistoquímica e com o estadiamento do tumor. De fato, a paciente HER2+ apresentou baixa expressão de CD24 e Ck, sugerindo

a hipótese de um pior prognóstico. Em relação ao desfecho clínico, sabe-se que a ocorrência de metástases a distância geralmente se dá 5 anos após o diagnóstico (Fehrenbacher et al., 2014). Futuramente poderemos relacionar, de forma mais efetiva, se a expressão de CD44+/CD24-/Ck- está relacionada com o surgimento de metástase ou cura completa dessas pacientes.

A elucidação dos marcadores de CSC de CM ajuda a prever o desfecho clínico das pacientes, bem como servir no desenvolvimento de medicamentos personalizados com melhores taxas de resposta clínica. Este estudo apoia a relação dos biomarcadores com estadiamento e análise imunohistoquímica de receptores hormonais e HER2. No entanto, é necessário uma maior coorte amostral para que recomendações definitivas sejam feitas para inclusão da avaliação desses marcadores de superfície.

7 CONCLUSÃO

Este estudo relacionou marcadores de CSC (CD44, CD24 e Ck) de pacientes com carcinoma ductal *in situ* com o estadiamento do tumor, subtipo molecular, pior prognóstico e conduta no desfecho clínico das pacientes.

- As pacientes avaliadas neste estudo foram diagnosticadas com carcinoma ductal de mama e classificadas de acordo com sua malignidade utilizando o Sistema TNM;
- As amostras tumorais foram diferenciados em relação a expressão de receptores hormonais em subtipo Luminal A (n=1), Luminal B (n=4) ou HER2 positivo (n=1);
- Um fragmento da biópsia foi efetivamente submetido ao cultivo primário de células através de processo mecânico ou enzimático;
- Observou-se diferenças morfológicas e uma otimização do tempo de replicação celular no processo enzimático, que objetivou o isolamento de células pluripotentes/células-tronco.
- O isolamento de células tornou útil a observação do potencial proliferativo entre células benignas e malignas, bem como a diferença na expressão de marcadores de superfície CD44+/CD24-/Ck-.
- Observou-se uma maior expressão de CD44 em relação as demais amostras, enquanto que uma menor expressão dos marcadores de superfície CD24 e Ck foi observada em amostra HER2+, em relação aos subtipos Luminais A e B.
- Foi possível relacionar os marcadores CD24- e Ck- de CSC de CM com o subtipo molecular, uma vez que houve menor expressão de CD24 e Ck na amostra HER2+ quando comparado aos Luminais A e B. Também, foi possível associar os baixos índices de Ck da amostra 9 com um pior prognóstico, HER2+.
- Os baixos índices de Ck se relacionam com o acometimento de linfonodos sentinelas (N1) avaliado pelo estadiamento do tumor em ambas as amostras HER2+ e Luminal B, enquanto que na amostra Luminal A, sem acometimento de linfonodos, foi encontrado maior expressão de Ck.

- Descrevemos como ocorreu o tratamento oncológico das pacientes avaliadas neste estudo e mencionamos indicadores para escolha das terapias.
- Devido a transcorrência de apenas 2 anos desde o início deste estudo, é difícil relacionar dados de desfecho clínico das pacientes com os marcadores moleculares de CSC de CM até o momento. Muitos fatores interferem no desfecho clínico. Além da expressão hormonal e HER2, a escolha do tratamento quimioterápico por exemplo, é baseada no grau tumoral, no estadiamento do tumor, no status e performance da paciente (Fujii et al., 2015). Ainda, sabe-se que a ocorrência de metástases a distância para tumores Luminais geralmente se dá 5 anos após o diagnóstico (Fehrenbacher et al., 2014). Futuramente poderemos relacionar, de forma mais efetiva, se a expressão de CD44+/CD24-/Ck- está relacionada com o surgimento de metástase ou cura completa das pacientes.

8 PERSPECTIVAS

Este trabalho apresentou resultados preliminares otimistas com perspectivas de aprimoramento. Devido a técnica de citometria estar em aprimoramento, não foi possível concluir a identificação de maior percentual de CSC em amostras tumorais e / ou amostras submetidas a processo enzimático para isolamento de CSC.

Além disso, o pequeno número de casos utilizados neste estudo não permite associar dados de estadiamento do tumor, status do receptor hormonal ou heterogeneidade inter e intra-tumoral. Uma coorte maior de casos, incluindo tumores primários e metástases correspondentes, permitiria uma melhor compreensão do papel dos marcadores CD44/CD24/Ck na progressão do tumor e na capacidade metastática.

O conhecimento e acompanhamento do desfecho clínico após 5 anos do diagnóstico das pacientes em estudo é importante, uma vez que seria possível relacionar os achados encontrados com as medidas tomadas na prática clínica, recidiva locorregional, presença de metastases e dados de sobrevida global.

BIBLIOGRAFIA

Abdulkarim B. S., Cuartero J., Hanson J., et al. Increase risk of locoregional recurrence for women with T1-2N0 triple-negative breast cancer treated with modified radical mastectomy without adjuvant radiation therapy compared with breast-conserving therapy. *J. Clin. Oncol.* 2011.

Abraham B. K., Fritz P., McClellan M., et al. Prevalence of CD44⁺/CD24⁻ cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin. Cancer Res.* 2005.

Abreu M., Cabezas-Sainz P., Pereira-Veiga T., et al. Looking for a Better Characterization of Triple-Negative Breast Cancer by Means of Circulating Tumor Cells. *J. Clin. Med.* 2020.

Afzal M., Ameenuzzafar, Alharbi K. S., et al. Nanomedicine in treatment of breast cancer - A challenge to conventional therapy. *Semin. Cancer Biol.* 2019.

Albert J. M., Gonzalez-Angulo A. M., Guray M., et al. Estrogen/Progesterone Receptor Negativity and HER2 Positivity Predict Locoregional Recurrence in Patients With T1a,bN0 Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol.* 2010.

Al-Hajj M., Wicha M. S., Benito-Hernandez A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003.

Adan A., nel Alizada G., Kirazlı Y. et al., Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2017.

Ali H. R., Chlon L., Pharoah P. D., et al. Patterns of immune infiltration in breast cancer and their clinical implications: a gene-expression-based retrospective study. *PLoS Med.* 2016.

Alqaisi A., Chen L., Romond E., et al. Impact of estrogen receptor (ER) and human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) co-expression on breast cancer disease characteristics: implications for tumor biology and research. *Breast Cancer Res Treat.* 2014.

Arpino G., Generali D., Sapino A., et al. Corrigendum to “Gene expression profiling in breast cancer: A clinical perspective”. *Breast*. 2016.

Arvold N.D., Taghian A.G., Niemierko A., et al. Age, breast cancer subtype approximation, and local recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. 2011.

ASCO Guidelines on Breast Cancer. <https://www.asco.org/practice-guidelines/quality-guidelines/guidelines/breast-cancer>. Accessed January 17, 2017

Austreid E., Lonning P.E., Eikesdal H.P., et al. The emergence of targeted drugs in breast cancer to prevent resistance to endocrine treatment and chemotherapy. *Expert Opin. Pharmacother*. 2014.

Balic M., Lin H., Young L., et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res*. 2006.

Bane A., Vilorio-Petit A., Pinnaduwa D., et al. Clinical-pathologic significance of cancer stem cell marker expression in familial breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2013.

Bense R. D., Qiu S. Q., de Vries E. G. E., et al. Considering the biology of late recurrences in selecting patients for extended endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Treat. Rev*. 2018.

Bessonova L., Taylor T. H., Mehta R. S., et al. Second Breast Cancer Associated with Hormone-Receptor and HER2/neu Status of the First Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011.

Biganzoli L., Wildiers H., Oakman C., et al. Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). *Lancet Oncol*. 2012.

Borger J., Kemperman H., Hart A., et al. Risk Factors in Breast-Conservation Therapy. *J Clin Oncol*. 1994.

Bouvet M., Babiera G. V., Tucker S. L., et al. Does Breast Conservation Therapy in Young Women with Breast Cancer Adversely Affect Local Disease Control and Survival Rate? The M. D. Anderson Cancer Center Experience. *Breast J.* 1997.

Bragado P., Estrada Y., Parikh F., et al. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. *Nat. Cell Biol.* 2013.

Braun S., Vogl F. D., Naume B., et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005.

Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world wide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018.

Capra A. M., Quesenberry C. P., Fulton R., et al. Distant invasive breast cancer recurrence risk in human epidermal growth factor receptor 2-positive T1a and T1b node-negative localized breast cancer diagnosed from 2000 to 2006: a cohort from an integrated health care delivery system. *J. Clin. Oncol.* 2014.

Carlson P., Dasgupta A., Grzelak C. A., et al. Targeting the perivascular niche sensitizes disseminated tumour cells to chemotherapy. *J. Nat. Cell Biol.* 2019.

Castle J., Morris K., Pritchard S., et al. Challenges in enumeration of CTCs in breast cancer using techniques independent of cytokeratin expression. *Plos One.* 2017.

Celià-Terrassa T. Mammary Stem Cells and Breast Cancer Stem Cells: Molecular Connections and Clinical Implications. *J. Biomedicines.* 2018.

Cheang M. C. U., Chia S. K., Voduc D., et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009.

Chiotaki R., Polioudak H., Theodoropoulos P.A. Stem cell technology in breast cancer: current status and potential applications. *Journal Stem Cells and Cloning: Advances and Applications.* 2016.

Chlebowski R.T., Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: The women's health initiative randomized trial. JAMA. 2003.

Christowitz C., Davis T., Isaacs A., et al. Mechanisms of doxorubicin-induced drug resistance and drug resistant tumour growth in a murine breast tumour model. BMC Cancer. 2019.

Clarke R.B. Steroid receptors and proliferation in the human breast. Steroids. 2003.

Colleoni M., Viale G., Zahrieh D., et al. Chemotherapy Is More Effective in Patients with Breast Cancer Not Expressing Steroid Hormone Receptors: A Study of Preoperative Treatment. Clin Cancer Res. 2004.

Cristofanilli M., Pierga J.Y., Reuben J., et al. The clinical use of circulating tumor cells (CTCs) enumeration for staging of metastatic breast cancer (MBC): International expert consensus paper. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2019.

Crocker A. K., Goodale D., Chu J., et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. J Cell Mol Med. 2009.

Cronin K. A., Lake A. J., Scott S., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: national cancer statistics. Cancer. 2018.

Curigliano G., Goldhirsch A. The triple-negative subtype: new ideas for the poorest prognosis breast cancer. Journal Natl Cancer Inst Monogr. 2011.

Da Cruz P.A., Marques O., Rosa A. M., et al. Co-expression of stem cell markers ALDH1 and CD44 in non-malignant and neoplastic lesions of the breast. Anticancer Res. 2014.

De Azambuja E., Cardoso F., de Castro G., et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. Br J Cancer. 2007.

De Laurentiis M., Arpino G., Massarelli E., et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005.

Deome K. B., Faulkin L. J., Bern H.A., et al. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* 1959.

Demicheli R., Ardoino I., Boracchi P., et al. Mortality and recurrence patterns of breast cancer patients diagnosed under a screening programme versus comparable non-screened breast cancer patients from the same population: analytical survey from 2002 to 2012. *Tumor Biol.* 2014.

Dowsett M., Smith I. E., Ebbs S.R., et al. Prognostic Value of Ki67 Expression After Short-Term Presurgical Endocrine Therapy for Primary Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2007.

Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG) EBCTCG. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005.

Estimativas de Câncer no Brasil/INCA (06/02/2020). 2020.

Farmer P., Bonnefoi H., Becette V., et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene.* 2005.

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *Int Journal Cancer.* 2015.

Ferraris C., Gennaro M., Hrushesky W.J., et al. Recurrence and mortality according to estrogen receptor status for breast cancer patients undergoing conservative surgery.

Ipsilateral breast tumour recurrence dynamics provides clues for tumour biology within the residual breast. BMC Cancer. 2010.

Fisher B., Anderson S., Bryant J., et al. Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. N Engl J Med. 2002.

Foulkes W. D., Smith I. E. and Reis-Filho J. S. Triple-negative breast cancer. N Engl J Med. 2010.

Fountzilas G., Dafni U., Bobos M., et al. Differential Response of Immunohistochemically Defined Breast Cancer Subtypes to Anthracycline-Based Adjuvant Chemotherapy with or without Paclitaxel. In: Aziz, SA., editor. PLoS One. Vol. 7. 2012.

Freedman G. M., Fowble B. L. Local recurrence after mastectomy or breast-conserving surgery and radiation. Oncology (Williston Park). 2000.

Fujii T., Le Du F., Xiao L., et al. Effectiveness of an Adjuvant Chemotherapy Regimen for Early Stage Breast Cancer: A Systematic Review and Network Meta-analysis. JAMA Oncol. 2015.

Gandini S., DeCensi A., Guerrieri-Gonzaga A., et al. Prognostic significance of Ki-67 labeling index after short-term presurgical tamoxifen in women with ER-positive breast cancer. Ann Oncol. 2011.

Gerdes J., Li L., Schlueter C., et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol. 1991.

Gerdes J., Schwab U., Lemke H., et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J cancer. 1983.

Ginestier C., Hur M. H., Charafe-Jaufret E., et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007.

Giuliano A. E., Connolly J. L., Edge S. B., et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2017.

Goddard E. T., Bozic I., Riddell S. R., et al. Dormant tumour cells, their niches and the influence of immunity. *Nat. Cell Biol*. 2018.

Goldhirsch A., Winer E. P., Coates A. S., et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*. 2013.

Grantzau T., Overgaard J. Risk of second non-breast cancer after radiotherapy for breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 762,468 patients. *Radiotherapy and Oncology*. 2014.

Haffty B. G., Brown F., Carter D., et al. Evaluation of HER-2 neu oncoprotein expression as a prognostic indicator of local recurrence in conservatively treated breast cancer: a case-control study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996.

Haffty B. G., Yang Q., Reiss M., et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006.

Haffty B. G. Molecular and genetic markers in the local-regional management of breast cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2002.

Hammond M. E. H., Hayes D. F., Dowsett M., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010.

Hardt O., Wild S., Oerlecke I. et al. Highly sensitive profiling of CD44+/ CD24– breast cancer stem cells by combining global mRNA amplification and next generation sequencing: evidence for a hyperactive PI3K pathway. *Cancer Lett.* 2012.

Harper K. L., Sosa M. S., Entenberg D., et al. Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. *Nature.* 2016.

Harris G.C., Denley H.E., Pinder S.E., et al. Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2003.

Harris J.R., Schnitt S.J., Park C.C., et al. Outcome at 8 Years After Breast-Conserving Surgery and Radiation Therapy for Invasive Breast Cancer: Influence of Margin Status and Systemic Therapy on Local Recurrence. *J Clin Oncol.* 2000.

Harvey J.M., Clark G.M., Osborne C.K., et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999.

Hosseini H., Obradović M. M., Hoffmann M., et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature.* 2016.

<http://www.oncoguia.org.br/cancer-home/cancer-de-mama/20/12/Instituto> OncoGuia, 2020

Jager J. J., Volovics L., Schouten L. J., et al. Loco–regional recurrences after mastectomy in breast cancer: prognostic factors and implications for postoperative irradiation. *Radiother Oncol.* 1999.

Jatoi I., Anderson W.F., Jeong J.H., et al. Breast Cancer Adjuvant Therapy: Time to Consider Its Time-Dependent Effects. *J Clin Oncol.* 2011.

Jie X. X., Zhang X. Y., Xu C. J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget.* 2017.

Jonat W., Arnold N. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Ann Oncol.* 2011.

Jones S. E., Savin, M. A., Holmes F. A., et al. Phase III Trial Comparing Doxorubicin Plus Cyclophosphamide With Docetaxel Plus Cyclophosphamide as Adjuvant Therapy for Operable Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2006.

Kalykaki A., Agelaki S., Kallergi G., et al. Elimination of EGFR-expressing circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer treated with gefitinib. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014.

Kamińska A., Szyborski T., Witkowska E., et al. Detection of Circulating Tumor Cells Using Membrane-Based SERS Platform: A New Diagnostic Approach for ‘Liquid Biopsy’. *Nanomaterials.* 2019.

Kang Y., Pantel K. Tumor cell dissemination: Emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell.* 2013.

Kerkvliet N., Nadkarni K. V., Morris V. L., et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 2000.

Krawczyk N., Meier-Stiegen F., Banys M., et al. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Biomed Res Int.* 2014.

Kumar P., Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2016.

Kyndi M., Sørensen F. B., Knudsen H., et al. Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, HER-2, and Response to Postmastectomy Radiotherapy in High-Risk Breast Cancer: The Danish Breast Cancer Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology.* 2008.

Lafourcade A., His M., Baglietto L., et al. Factors associated with breast cancer recurrences or mortality and dynamic prediction of death using history of cancer recurrences: The French E3N cohort. *BMC Cancer*. 2018.

Lakhani S. R., Ellis I. O., Schnitt S. J., et al. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. 2012.

Lan Q., Peyvandi S., Duffey N., et al. Type I interferon/IRF7 axis instigates chemotherapy-induced immunological dormancy in breast cancer. *Oncogene*. 2019.

Lange CA. Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. *Steroids*. 2008.

Lawson D. A., Kessenbrock K., Davis R. T., et al. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat. Cell Biol*. 2018.

Lehmann B. D., Bauer J. A., Chen X., et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011.

Lehmann-Che J., Hamy A. S., Porcher R., et al. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDFP15. *Breast Cancer Res*. 2013.

Li X., Lewis M. T., Huang J. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal Natl Cancer Inst*. 2008.

Li Y., Latterra J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Journal Cancer Res*. 2012.

Lim S. B., Di Lee W., Vasudevan J., et al. Liquid biopsy: One cell at a time. *NPJ Precis. Oncol*. 2019.

Lim S. B., Lim C. T., Lim W. T. Single-Cell Analysis of Circulating Tumor Cells: Why Heterogeneity Matters. *Cancers*. 2019.

Linde N., Fluegen G., and Aguirre-Ghiso, J. A. The Relationship Between Dormant Cancer Cells and Their Microenvironment. *Adv. Cancer Res.* 2016.

Liu H. G., Chen C., Yang H., et al. Cancer stem cell subsets and their relationships. *Journal Transl Med.* 2011.

Liu C. J., Chu D., Cannell E. M., et al. Comprehensive Mutation and Copy Number Profiling in Archived Circulating Breast Cancer Tumor Cells Documents Heterogeneous Resistance Mechanisms. *Cancer Res.* 2018.

Liu Y., Liu Q., Wang T., et al. Circulating tumor cells in HER2-positive metastatic breast cancer patients: A valuable prognostic and predictive biomarker. *BMC Cancer.* 2013.

Lowery A. J., Kell M. R., Glynn R. W., et al. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: A systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res Treat.* 2012.

Luzzi K. J., MacDonald I. C., Schmidt E. E., et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* 1998.

Macey M.G. Principles of flow cytometry. *Flow cytometry: principles and applications* In: Macey MG, ed. Totowa (NJ): Humana Press. 2010.

Madjd Z., Mehrjerdi A. Z., Sharifi A. M., et al. CD44⁺ cancer cells express higher level of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Journal Cancer Immun.* 2009.

Magee B., Swindell R., Harris M., et al. Prognostic factors for breast recurrence after conservative breast surgery and radiotherapy: Results from a randomised trial. *Radiother Oncol.* 1996.

Makki J., Myint O., Wynn A. A., et al. Expression distribution of cancer stem cells, epithelial to mesenchymal transition, and telomerase activity in breast cancer and their association with clinicopathologic characteristics. *Clin Med Insights Pathol.* 2014.

- Malone K. E., Begg C. B., Haile R. W., et al. Population-Based Study of the Risk of Second Primary Contralateral Breast Cancer Associated With Carrying a Mutation in BRCA1 or BRCA2. *J Clin Oncol*. 2010.
- Markowitz S. D., Bertagnolli M. M. Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009.
- Martelotto L. G., Ng C. K., Piscuoglio S., Weigelt B, Reis-Filho JS. Breast cancer intra-tumor heterogeneity. *Breast Cancer Res Treat*. 2014.
- Massagué J., and Obenauf A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016.
- McNally S., Stein T. Overview of mammary gland development: A comparison of mouse and human. In: *methods in Molecular biology*. 2017.
- Meads M. B., Gatenby R. A., Dalton W. S. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat RevCancer*. 2009.
- Millar E. K. A., Graham P. H., O'Toole S. A., et al. Prediction of local recurrence, distant metastases, and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel. *J Clin Oncol*. 2009.
- MOC - Manual de Oncologia Clínica do Brasil. 2010.
- Mohsin S. K., Weiss H., Havighurst T., et al. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol*. 2004.
- Moloney B. M., O'Loughlin D., Abd Elwahab S., Kerin M. J. Breast Cancer Detection- A Synopsis of Conventional Modalities and the Potential Role of Microwave Imaging. *Diagnostics (Basel)*. 2020.
- Moran M.S. Radiation therapy in the locoregional treatment of triple-negative breast cancer. *Lancet Oncol*. 2015.

Murphy C.G., Dickler M.N. Endocrine resistance in hormoneresponsive breast cancer: mechanisms and therapeutic strategies. *Endocr Relat Cancer*. 2016.

Naume B., Synnestvedt M., Falk R. S., et al. Clinical outcome with correlation to disseminated tumor cell (DTC) status after DTC-guided secondary adjuvant treatment with docetaxel in early breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2014.

Naumov G. N., MacDonald I. C., Weinmeister P. M., et al. Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer Res*. 2002.

Nguyen P. L., Taghian A. G., Katz M. S., et al. Breast Cancer Subtype Approximated by Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER-2 Is Associated With Local and Distant Recurrence After Breast-Conserving Therapy. *J Clin Oncol*. 2008.

Nielsen T. O., Hsu F. D., Jensen K., et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004.

Nishimura R., Osako T., Okumura Y., et al. Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis. *Breast Cancer*. 2010.

Nuciforo P., Radosevic-Robin N., Ng T., et al. Quantification of HER family receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015.

Oliphant M. U. J., Kong D., Zhou H., et al. Two Sides of the Same Coin: The Role of Developmental pathways and pluripotency factors in normal mammary stem cells and breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2020.

O'Rourke S., Galea M. H., Morgan D., et al. Local recurrence after simple mastectomy. *Br J Surg*. 1994.

Obedian E., Haffty B. G. Negative margin status improves local control in conservatively managed breast cancer patients. *Cancer J Sci Am*. 2000.

Ojo D., Lin X., Wu Y., et al. Polycomb complex protein BMI1 confers resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive breast cancer. *Cancer Letters*. 2018.

Oskarsson T., Batlle E., Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell*. 2014.

Owens T. W., Naylor M. J. Breast cancer stem cells. *Front Physiol*. 2013.

Pack L. R., Daigh L. H., Meyer, T. Putting the brakes on the cell cycle: mechanisms of cellular growth arrest. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2019.

Pan H., Gray R., Braybrooke J., et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N. Engl. J. Med*. 2017.

Panoff J. E., Hurley J., Takita C., et al. Risk of locoregional recurrence by receptor status in breast cancer patients receiving modern systemic therapy and post-mastectomy radiation. *Breast Cancer Res Treat*. 2011.

Pantel K., Hayes, D. F. Disseminated breast tumour cells: biological and clinical meaning. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2018.

Paula L. M., De Moraes L. H., Do Canto A. L., et al. De Azevedo Cabevari R. Analysis of molecular markers as predictive factors of lymph node involvement in breast carcinoma. *Oncol Lett*. 2017.

Pegram M. D., Konecny G., Slamon D. J. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res*. 2000.

Perou C. M, Sorlie T., Eisen M. B, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000.

Pestrin M., Salvianti F., Galardi F., et al. Heterogeneity of PIK3CA mutational status at the single cell level in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Mol. Oncol*. 2015.

Pierce L. J., Merino M. J., D'Angelo T., et al. Is c-erb B-2 a predictor for recurrent disease in early stage breast cancer? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994.

Pietras R. J, Poen J. C, Gallardo D., et al. Monoclonal Antibody to HER-2/neuReceptor Modulates Repair of Radiation- induced DNA Damage and Enhances Radiosensitivity of Human Breast Cancer Cells Overexpressing This Oncogene. *Cancer Res*. 1999.

Pisansky T. M., Ingle J. N., Schaid D. J., et al. Patterns of tumor relapse following mastectomy and adjuvant systemic therapy in patients with axillary lymph node-positive breast cancer. Impact of clinical, histopathologic, and flow cytometric factors. *Cancer*. 1993.

Philippeos C., Hughes R. D., Dhawan A., et al. Introduction to Cell Culture. *Human Cell Culture Protocols*. 2011.

Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005.

Prat A., Cheang M. C. U., Martín M., et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol*. 2013.

Puhalla S., Mrozek E., Young D., et al. Randomized Phase II Adjuvant Trial of Dose-Dense Docetaxel Before or After Doxorubicin Plus Cyclophosphamide in Axillary Node-Positive Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2008.

Ragaz J., Olivotto I. A., Spinelli J. J., et al. Locoregional Radiation Therapy in Patients With High-Risk Breast Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy: 20-Year Results of the British Columbia Randomized Trial. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2005.

Recht A., Gray R., Davidson N. E., et al. Locoregional failure 10 years after mastectomy and adjuvant chemotherapy with or without tamoxifen without irradiation: Experience of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*. 1999.

Reis-Filho J. S, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011.

Ring A., Smith I., Ashley S., et al. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*. 2004.

Romond E. H., Perez E. A., Bryant J., et al. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2005.

Rugo H. S., Cortes J., Awada A., et al. Change in Topoisomerase 1-Positive Circulating Tumor Cells Affects Overall Survival in Patients with Advanced Breast Cancer after Treatment with Etoposide Pegol. *Clin. Cancer Res. O. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2018.

Samanta D., Semenza, G. L. In Vitro Assays of Breast Cancer Stem Cells. *Hypoxia*. 2018.

Sanpaolo P., Barbieri V., Genovesi D. Prognostic value of breast cancer subtypes on breast cancer specific survival, distant metastases and local relapse rates in conservatively managed early stage breast cancer: A retrospective clinical study. *Eur J Surg Oncol*. 2011.

Schwartz, R. S., Erban, J. K. Timing of Metastasis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017.

Shackleton M., Vaillant F., Simpson K. J., et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*. 2006 .

Shao M. M., Chan S. K., Yu A. M. C., et al. Keratin expression in breast cancers. *Virchows Archiv*. 2012.

Shaw J. A., Guttery D. S., Hills A. et al. Mutation Analysis of Cell-Free DNA and Single Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with High Circulating Tumor Cell Counts. *Clin. Cancer Res. O. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2017.

Sheridan C., Kishimoto H., Fuchs R. K., et al. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006.

Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer Journal Clin.* 2016.

Slamon D. J., Clark G. M., Wong S.G., et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987.

Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci.* 2001.

Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003.

Staaf J., Ringnér M., Vallon-Christersson J., et al. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol.* 2010.

Stålhammar G., Fuentes Martinez N., Lippert M., et al. Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer. *Mod Pathol.* 2016.

Soldatow V. Y., LeCluyse E. L., Griffith L. G., et al. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb).* 2013.

Stingl J., Eirew P., Ricketson I., et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature.* 2006.

Stuart-Harris R., Caldas C., Pinder S. E., et al. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008.

Symmans W. F., Liu J., Knowles D. M., et al. Breast cancer heterogeneity: evaluation of clonality in primary and metastatic lesions. *Hum Pathol.* 1995.

Tellez-Gabriel M., Cochonneau D., Cadé M., et al. Circulating Tumor Cell-Derived Pre-Clinical Models for Personalized Medicine. *Cancers.* 2018.

Theodoropoulos P. A., Polioudaki H., Agelaki S., et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. *Cancer Lett.* 2010.

Touboul E., Buffat L., Belkacémi Y., et al. Local recurrences and distant metastases after breast-conserving surgery and radiation therapy for early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999.

Touny L. H. T., Vieira A., Mendoza A., et al. Combined SFK/MEK inhibition prevents metastatic outgrowth of dormant tumor cells. *J. Clin. Invest.* 2014.

Trihia H., Murray S., Price K., et al. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors—a surrogate marker? *Cancer.* 2003.

Tsoutsou P. G., Vozenin M. C., Durham A. D., et al. How could breast cancer molecular features contribute to locoregional treatment decision making? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017.

Tun N., Villani G., Ong K., et al. Risk of having BRCA1 mutation in high-risk women with triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Clin Genet.* 2014.

Uhr J. W., Pantel, K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011.

Valastyan S., Weinberg, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011.

Van de Vijver M. J., He Y. D., van't Veer L. J., et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2002.

Van der Leij F., Elkhuizen P. H. M., Bartelink H., et al. Predictive Factors for Local Recurrence in Breast Cancer. *Semin Radiat Oncol.* 2012.

Van Dongen J. A., Voogd A. C., Fentiman I. S., et al. Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European organization for research and treatment of cancer 10801 trial. *J Natl Cancer Inst.* 2000.

Van Seijen M., Lips E. H., Thompson A. L., et al. Ductal carcinoma in situ: totreatornottotreat, thatisthequestion. *British Journal of Cancer.* 2019.

Vanharanta, S.; Massague, J. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell.* 2013.

Vera-Badillo F. E., Templeton A. J., De Gouveia P., et al. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014.

Vici P., Pizzuti L., Natoli C., et al. Triple positive breast cancer: A distinct subtype? *Cancer Treat Rev.* 2015.

Voduc K. D., Cheang M. C. U., Tyldesley S., et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol.* 2010.

Voogd A. C., Peterse J. L., Crommelin M. A., et al. Histological determinants for different types of local recurrence after breast-conserving therapy of invasive breast cancer. *Eur J Cancer.* 1999.

Vuong D., Simpson P. T., Green B., et al. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch.* 2014.

Wang J., Xie X., Wang X., et al. Locoregional and distant recurrences after breast conserving therapy in patients with triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Surg Oncol.* 2013.

Wang N., Shi L., Hu Y. et al. Detection of circulating tumor cells and tumor stem cells in patients with breast cancer by using flow cytometry. *Tumor Biol.* 2012.

Wang T., Shigdar S., Gantier M. P., et al. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies. *Oncotarget.* 2015.

Wang Y., Guo L., Feng L., Single nucleotide variant profiles of viable single circulating tumour cells reveal CTC behaviours in breast cancer. *Oncol. Rep.* 2018.

Weidenfeld K., Barkan D. EMT and stemness in tumor dormancy and outgrowth: are they intertwined processes? *Front. Oncol.* 2018.

Wells A., Griffith L., Wells J. Z., et al. The dormancy dilemma: quiescence versus balanced proliferation. *Cancer Res.* 2013.

Wieduwilt M. J., Moasser M. M. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008.

Wilson L. D., Beinfeld M., McKhann C. F., et al. Conservative surgery and radiation in the treatment of synchronous ipsilateral breast cancers. *Cancer.* 1993.

Wolf J., Dewi D. L., Fredebohm J., et al. Mammosphere formation RNAi screen reveals that ATG4A promotes a breast cancer stem-like phenotype. *Breast Cancer Res.* 2013.

Wolff A., Hammond M., Hicks D., et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013.

Wolters G. H. J., Vos-Scheperkeuter G. H., van Deijnen J. H. M., et al. Analysis of the role of collagenase and protease in the enzymatic dissociation of rat pancreas for islet isolation. *Diabetologia.* 1992.

Xiao Y., Ye Y., Yearsley K., et al. The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype. *Am J Pathol.* 2008.

Xiaoxian L., Gabriela M. Oprea I., et al. New Developments in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2017.

Xu, Shengnan Y., Qian L., et al. Recent advances of highly selective CDK4/6 inhibitors in breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology.* 2017.

Yafei W., Jigang Z., Xue Z., et al. Cancer Stem Cells: A Potential Breakthrough in HCC-Targeted Therapy. *Front Pharmacol.* 2020.

Yang L., Shi P., Zhao G., et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2020.

Yin W., Jiang Y., Shen Z., et al. Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: A meta-analysis of published randomized controlled trials. *PLoS One.* 2011.

Yu Y., Ramena G., Elble R. C. The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors. *Front Biosci.* 2012.

Zhang L., Ridgway L. D., Wetzel M. D., et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. *Sci. Transl. Med.* 2013.

ANEXOS

Anexo I

 MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			
1. Projeto de Pesquisa: Cultura Primária de Células Tumorais de Câncer de Mama e Avaliação de Marcadores de Células Progenitoras			
2. Numero de Participantes da Pesquisa: 20			
3. Área Temática: Genética Humana: (Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro.) Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas , Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: EMYLE DA SILVA BRUM			
6. CPF: (	7. Endereço (Rua, n.º): Boulevard		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone:	10. Outro Telefone:	11. Email:
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo. Data: ____ / ____ / ____ Assinatura			
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS		13. CNPJ:	14. Unidade/Órgão:
15. Telefone: (54) 3218-2100	16. Outro Telefone:		
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução. Responsável: _____ CPF: _____ Cargo/Função: <u>Coordenador</u> Data: <u>22</u> / <u>3</u> / <u>18</u> Assinatura			
PATROCINADOR PRINCIPAL			

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS TUMORAIS DE CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS PROGENITORAS

I. Objetivos do estudo

O câncer de mama ocupa posição de destaque mundial e é a maior causa de mortalidade por câncer no sexo feminino. Sabe-se que existem subtipos moleculares mais agressivos. No entanto, os tratamentos convencionais para o câncer de mama, independente da identificação desses subtipos, ainda são baseados em quimioterapia, não existindo nenhuma terapia alvo bem esclarecida. Nessa pesquisa, o nosso objetivo é avaliar a cultura de células cancerosas e displásicas de mama para avaliar as propriedades funcionais das células em tumores primários e caracterizar o perfil molecular das células selecionadas em comparação com as dos tumores primários. Os tecidos de tumores de mama serão coletados a partir de um pequeno fragmento residual do material proveniente da ressecção do tumor e será submetido imediatamente a cultura de células. Esse fragmento será devidamente separado entre o tumor e a margem da peça cirúrgica (não tumoral), e então mais uma vez dividido para cultivo primário e uma terceira parte submetida a um processo enzimático para isolamento de células pluripotentes. Os resultados obtidos poderão ser aplicados para o melhor entendimento desses subtipos moleculares e para no futuro definir terapias mais específicas e individualizadas.

Deste modo, você é convidado a participar de um estudo no qual você cederá uma pequena quantidade de tecido removido na cirurgia de retirada do tumor, assim iremos ter conhecimento se os resultados obtidos *in vitro* poderão fornecer informações sobre qual terapia apresentaria os melhores resultados para o tratamento do câncer de mama.

É muito importante a obtenção de novas informações neste estudo, pois isto poderá reduzir o tempo de internação no hospital, além disso, possivelmente aumentar as chances de cura. As informações recolhidas deste estudo serão úteis para no futuro ajudar o tratamento do câncer e melhorar as perspectivas para pessoas que necessitam do tratamento.

O objetivo deste estudo é avaliar a cultura de células cancerosas e displásicas de mama para avaliar as propriedades funcionais das células em tumores primários e caracterizar o perfil molecular das células selecionadas em comparação com as dos tumores primários.

II. Os procedimentos a serem realizados

Para sua preparação para a biópsia da mama, em caso de história de coagulopatia ou em uso de anticoagulantes, será solicitado a você exames laboratoriais. Serão realizados testes gerais como exames de sangue que visem avaliar a função hepática (fígado) e renal, assim como exames que visem melhor definir o acometimento de órgãos específicos por comorbidades que o paciente possa ter como, por exemplo, um ecocardiograma (ultrassom do coração) para avaliar a função cardíaca. Caso for detectado em você alguma alteração nos exames pré-operatórios ou problema de saúde iremos lhe encaminhar para tratamento médico.

O procedimento para ressecção do tumor será realizada pelo seu médico Dr. Maximiliano Cassilha Kneubil que é especialista em Cirurgia Reconstructora da Mama e Oncoplástica. Esse procedimento já está programado para o seu diagnóstico e tratamento do seu problema de saúde. Desse modo não será necessário a realização de outro procedimento. A amostra destinada para esse projeto será retirada na cirurgia. Esse material é destinado ao congelamento e uma pequena fração do material será destinada para o nosso estudo. Todos os procedimentos serão realizados em ambiente hospitalar e sob anestesia geral. Alguns dos fatores que o médico irá considerar incluem

tipo de lesão, tamanho, localização, quantidade de tumores e outros problemas clínicos e preferências pessoais da paciente.

É importante ressaltar que a coleta de tecido não necessita de nenhuma interferência, a mais, para você. O material utilizado para a pesquisa é encaminhado para diagnóstico, será aproveitada uma pequena porção do material coletado, será colocado em recipiente estéril com soro fisiológico e encaminhado ao Laboratório de Proteômica, Genômica e Reparo de DNA no Instituto de Biotecnologia da UCS para estudo.

III. Os desconfortos ou riscos esperados

A cirurgia para ressecção consiste num procedimento invasivo, pode trazer preocupação com a estética, desconforto e dor local. Excluindo outras implicações que podem ocorrer em qualquer procedimento, esta pesquisa não causará nenhum incômodo a mais para você. O procedimento de coleta do material não aumentará a média de tempo do procedimento.

Rubricas:

Participante da pesquisa e/ou responsável: _____

Pesquisador Responsável: _____

IV. Os benefícios que se pode obter

Com esta pesquisa você poderá contribuir para entendermos se os resultados obtidos *in vitro* poderão fornecer informações sobre qual terapia apresentaria os melhores resultados para o tratamento do câncer de mama e para no futuro ajudar o tratamento do câncer e melhorar as perspectivas para pessoas que necessitam do tratamento.

Permitindo que os médicos possam auxiliar as pessoas num tratamento mais rápido, eficaz, menos agressivo e com efeitos colaterais minimizados.

V. Garantia de resposta a qualquer pergunta

Os pesquisadores, o patrocinador do estudo e a equipe médica responsável garantem a você prestar acompanhamento e assistência médica integral e gratuita pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes direta ou indiretamente da participação no estudo, além de responder as suas perguntas e esclarecer suas dúvidas.

O Dr. Maximiliano Cassilha Kneubil irá lhe acompanhar gratuitamente independente do resultado final ser satisfatório, insatisfatório ou apresentar complicação. No caso de complicações cirúrgicas serão utilizados todos os meios médicos para evitar, reverter ou minimizar as sequelas, entre os quais incluem-se exames de diagnóstico, utilização de fármacos específicos para manejo da complicação e indicação de cirurgia sempre que necessária, os quais serão disponibilizados a você gratuitamente.

VII. Liberdade para abandonar a pesquisa sem prejuízo para si e esclarecimento sobre retenção e descarte de material coletado

O tecido mamário coletado somente será usado durante o período de vigência de 02 (dois) anos do projeto, assim neste período você terá liberdade em abandonar a pesquisa, sem que isso envolva qualquer prejuízo para si, incluindo seu direito de procurar obter indenização por quaisquer danos eventuais relacionados a esta pesquisa, retirar seu consentimento, e poderá solicitar que o material doado seja encaminhado para a destruição. Não será solicitado o patenteamento ou a utilização comercial com fins lucrativos de seu tecido mamário coletado que ficará armazenado sob a responsabilidade do Pesquisador Responsável Profa. Dra. Mariana Roesch Ely e institucional da Universidade de Caxias do Sul.

Além disso, você terá acesso gratuito às informações associadas ao seu material biológico humano armazenado e utilizado. A sua amostra de material biológico,

armazenada, somente será utilizada em novas pesquisas com sua autorização e após sua assinatura em um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (modelo semelhante de documento que você está lendo agora). O material biológico armazenado é seu e você pode solicitar em qualquer momento o descarte dele e que não seja mais usado nesta pesquisa. Você será informado sobre a perda ou após o término desta pesquisa da destruição (descarte em lixo hospitalar) de suas amostras biológicas.

VIII. Sigilo e privacidade

O Pesquisador Principal, o patrocinador do estudo e a equipe médica responsável garantirão sua integridade e segurança, prevendo procedimentos que assegurem a sua confidencialidade e a privacidade, protegendo a sua imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a você que não utilizaremos suas informações para seu prejuízo, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros.

Os pesquisadores certificaram-me que durante o desenvolvimento desta pesquisa será mantido todo o sigilo, de acordo com os preceitos da ética médica. Os dados desta pesquisa são confidenciais. É garantida a privacidade das pessoas que dela participarem.

Os arquivos com as informações obtidas nesta pesquisa estarão disponíveis somente para a equipe envolvida com este estudo e as vias assinadas de consentimento serão guardadas em ambiente seguro e seu nome em nenhum momento será revelado em publicações ou apresentações. Somente os dados obtidos com o estudo serão publicados nos meios científicos, com sigilo absoluto do seu nome.

IX. Liberdade para se retirar da pesquisa a qualquer momento durante o período de desenvolvimento

Você terá liberdade em abandonar a pesquisa, a qualquer momento sem que isso acarrete qualquer prejuízo para si ou na continuidade do seu tratamento.

X. Compromisso com informação atualizada do estudo

Durante este estudo e no que refere a sua pessoa, você tem o direito de ser informado e atualizado do andamento do seu tratamento e da pesquisa. Caso você tiver novas perguntas sobre este estudo, pode chamar a Pesquisadora Responsável Profa. Dra. Mariana Roesch Ely (54) 98121-6804 o Pesquisador Responsável Dr. Maximiliano Cassilha Kneubil no telefone (54) 99698-2800, Pesquisadora envolvida Emyle da Silva Brum (54) 99922-6545 ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul (CEP/UCS) criado para aprovar ética e cientificamente as pesquisas envolvendo seres humanos, bem como, acompanhar e contribuir com o seu desenvolvimento. O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul (CEP/UCS) localiza-se na Rua Francisco Getúlio Vargas, nº 1130, Sala 106, Bloco M., Caxias do Sul – RS, CEP 95070-560, telefone (54) 3218-2829, horário de atendimento de segunda-feira a sexta-feira das 8h às 11h30min e das 13h30min às 18h.

XI. Declaração de publicação e consentimento de coleta e utilização do tecido adiposo coletado

Eu,.....
(participante ou responsável) autorizo a coleta, o armazenamento e a utilização do tecido mamário coletado, e fui informado(a) dos objetivos de maneira clara e detalhada de que meu material será utilizado para o propósito desta pesquisa. Também fui informado(a) que o tecido mamário coletado será armazenado e isto somente será permitido com minha autorização e após minha assinatura em um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido somente após aprovação do sistema CEP-CONEP. Recebi explicações do procedimento e tratamento que receberei, esclarecendo todas as minhas dúvidas. O Pesquisador Responsável Dr. Maximiliano Cassilha Kneubil certificou-me que durante o desenvolvimento desta pesquisa será mantido todo o sigilo, de acordo com os preceitos da ética médica e que irá me acompanhar gratuitamente pelo tempo que for necessário independente de o resultado final da cirurgia ser satisfatório,

insatisfatório ou apresentar complicação. Declaro ainda, que os dados obtidos com o estudo podem ser publicados nos meios científicos, com sigilo absoluto do meu nome e com toda minha segurança.

Declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo Pesquisador Responsável, Pesquisador Cirurgião Responsável e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas.

_____	_____	_____
Assinatura	Paciente ou Responsável	Data

_____	_____	_____
Assinatura	Pesquisador Cirurgião Responsável	Data

Este formulário foi lido para.....pelo
Pesquisador Cirurgião Responsável Dr. Maximiliano CassilhaKneubilenquanto eu
estava presente.

_____	_____	_____
Assinatura	Nome da Testemunha	Data

XII. Assinatura do Pesquisador Responsável, local e telefone a ser encontrado a qualquer momento

Assinatura do Pesquisador Responsável:_____

Nome do Pesquisador Responsável: Mariana Roesch Ely

Local a ser encontrado: Rua Francisco Getúlio Vargas, nº 1130, Sala 206, Bloco 57. Caxias do Sul – RS, CEP 95070-560. Telefone: (54) 32182100/2682.

Rubricas:

Participante da pesquisa e/ou responsável: _____

Pesquisador Responsável: _____