UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RENATA DANIELLE SICCHIERI

**Marcadores de células tronco tumorais no câncer de mama
localmente avançado**

Ribeirão Preto
2013

RENATA DANIELLE SICCHIERI

**Marcadores de células tronco tumorais no câncer de mama
localmente avançado**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Sicchieri, Renata Danielle

Marcadores de células tronco tumorais no câncer de mama localmente avançado.

67 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Área de concentração: Biologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi.

1. Câncer de mama
2. Célula tronco tumoral
3. Quimioterapia neoadjuvante
4. Taxanos
5. Fatores Prognósticos

Renata Danielle Sicchieri

Marcadores de células tronco tumorais no câncer de mama localmente avançado.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas.

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha mãe, Maria Aparecida Ninin, por seu incondicional
apoio ao meu estudo, seus exemplos de honestidade,
suas vitórias e sua dedicação e amor à família.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Pedro e Maria, por serem os principais promotores da concretização de meus sonhos.

Ao Raphael por aceitar as horas de ausência e dedicar parte da sua vida a ajudar-me na realização de meus objetivos.

Aos meus irmãos Pedro, Regiane, Viviane e Lidiane, minhas sobrinhas e cunhados, pelo carinho e apoio constante.

Ao Professor Daniel Guimarães Tiezzi pela sua dedicação e seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À Profª Daniela Tirapelli, Prof. Carlos Gilberto Carlotti, Paulo Novais, Fermino Neto e Luana Lourenço, pela ajuda nos procedimentos de laboratório e disponibilidade do laboratório.

À Cristiane Milanezi e ao Prof. João Santana, pela disponibilidade do laboratório.

Ao professor Jurandyr Moreira de Andrade, por sua integral dedicação a este departamento.

Aos colegas Heriton Antonio, Larissa Mouro, Paula Bezerra, Tatiane Mendes, Willian Silveira, Paola Candido, Viviane Bressan, Isabela Carlotti e Raphael Bettero pelas horas de trabalho e pelo apoio nos momentos de ausência.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Banco de Tumores, Renata, Vagner, Andressa, Patrícia e Vitor pelas horas passadas juntos, pela troca de conhecimentos e pelos risos também.

À Ilza Mazzocato, Reinaldo Tavares, Ricardo Perussi, Rosane Casula e Suelen Bezerra, funcionários do departamento de ginecologia e obstetrícia, pela atenção com que sempre nos tratam e os auxílios que nos prestam.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP e seu Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pela oportunidade em realizar minha pós-graduação.

*“Um dia, quando olhares para trás, verás que os
dias mais belos foram aqueles em que lutaste.”*

(Sigmund Freud)

RESUMO

SICCHIERI, R.D. **Marcadores de células tronco tumorais no câncer de mama localmente avançado.** 2013. 67f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O carcinoma de mama é uma doença altamente prevalente e incidente. Em nosso meio, cerca de metade dos casos são diagnosticados em estádios localmente avançados e/ou disseminados. Nesta situação o índice de sucessos terapêuticos é pequeno. Recentemente vem sendo citado na literatura as células tronco tumorais (CTT) como aquelas responsáveis pelas recorrências tumorais, pois este tipo de células seria capaz de repovoar o hospedeiro com células tumorais de mesma origem. Postula-se também que este tipo de células é resistente ao tratamento quimioterápico. Assim, o prognóstico de uma paciente dependeria diretamente da quantidade de CTT presentes em seu tumor na época do tratamento. As expressões de CD44/CD24, CXCR4 e ABCG2 têm sido relatadas como potenciais marcadores de células tronco no câncer de mama (CTCM). A associação entre a quantidade de CTCMs e a resposta à quimioterapia neoadjuvante (QNA) permanece obscura.

Métodos: Foram analisadas prospectivamente a expressão de CD44/CD24, CXCR4 e ABCG2 em 41 pacientes com câncer de mama localmente avançado ou metastático (CMLA) submetidas à QNA. O ensaio de mamíferas (Mammocult®) foi estudado em 25 amostras. Idade média dos pacientes foi de $52,9 \pm 10,3$ anos. De acordo com o estágio clínico (EC), uma paciente foi classificada como IIa, 5 pacientes foram IIb, 10 foram IIIa, 16 foram IIIb, uma foi IIIc e 8 foram IV. O diâmetro médio do tumor clínico foi de $5,6 \pm 3$ centímetros. Os receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (PgR) e HER2 positivos apresentaram as taxas de expressão de 65%, 58% e 46%, respectivamente. A porcentagem mediana de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+ e ESA+/ABCG2+ foram determinados por citometria de fluxo em tumores frescos amostrados após a digestão do tecido. A relação entre as análises de citometria de fluxo e resposta clínica e patológica à terapia foi analisada. **Resultados:** A resposta clínica completa (RCC) e resposta patológica completa (PCR) foram observadas em 15 (36%) e 10 (24%) pacientes respectivamente. Não observamos uma associação significativa entre PCR, ER, PgR ou expressão HER2. Observamos uma associação entre o tamanho clínico com percentual de células ESA+/ABCG2+ dentro do tumor ($p = 0,0481$) e do grau tumoral com a capacidade de formação de esferas ($p = 0,0392$). Nenhuma correlação entre PCR e a população de células CD44+/CD24- dentro do tumor foi observada. Houve uma correlação positiva entre a expressão de ESA+/ABCG2+ e ESA+/CXCR4+ com o número de formação de mamíferas ($p = 0,0007$ e $p = 0,0497$, respectivamente). Esta correlação não foi significativa em comparação com células ESA+/CD44+/CD24-. **Conclusões:** O percentual de células cancerosas ABCG2+ dentro do tumor e do número de formação mamíferas são fatores preditivos de PCR em pacientes submetidos à QNA para CMLA. ABCG2 é um marcador potencial para CTCMs.

Palavras chave: Câncer de mama, Célula tronco tumoral, Quimioterapia neoadjuvante, Taxanos, Fatores prognósticos.

ABSTRACT

SICCHIERI, R.D. **Tumor stem cell markers in locally advanced breast cancer.** 2013. 67f. Dissertation (Masters) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Breast cancer is a disease highly prevalent and incident. In our country, about half of cases are diagnosed in advanced stages locally and / or disseminated. In this situation the therapeutic success rate is small. Recently been reported in the literature cancer stem cells (CSC) as those responsible for tumor recurrence, as this type of cells could repopulate the host cell tumor of the same origin. It is also postulated that this type of cells are resistant to chemotherapy. Thus the prognosis of a patient depend directly on the amount of CSC present in their tumor at the time of treatment. The expressions of CD44/CD24, CXCR4 and ABCG2 have been reported as potential breast cancer stem-like cell (CSLC) markers. The association between the quantity of CSLCs and the response to neoadjuvant chemotherapy (NACT) remains unclear. **Methods:** We prospectively analyzed the expression of CD44/CD24, CXCR4 and ABCG2 in 41 breast cancer patients with locally advanced or metastatic (CMLA) submitted to NAC. The assay mammosferas (Mammocult®) was studied in 25 samples. Mean age of patients was 52.9 ± 10.3 years. According to the clinical stage (CS), one patient was classified as IIa, IIb 5 patients, 10 were IIIa, IIIb were 16, 1 and 8 have been IIIc IV. The mean diameter of tumor therapy was 5.6 ± 3 cm. The estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 showed positive expression rates of 65%, 58% and 46%, respectively. The median percentage of cells ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+ and ESA+/ABCG2+ were determined by flow cytometry in tumors sampled after digestion fresh tissue. The relationship between flow cytometric analysis and clinical and pathological response to therapy was assessed. **Results:** The complete clinical response (CCR) and pathologic complete response (PCR) was seen in 15 (36%) and 10 (24%) patients, respectively. We did not observe a significant association between CRP, ER, PgR and HER2 expression. An association was observed between the size clinical percentage of cells ESA+/ABCG2+ within the tumor ($p = 0.0481$) and tumor grade with the ability to form spheres ($p = 0.0392$). No correlation between PCR and cell population CD44+/CD24-within the tumor was observed. There was a positive correlation between the expression of ESA+/ABCG2+ and ESA+/CXCR4+ with the number of training mammosferas ($p = 0.0007$ and $p = 0.0497$, respectively). This correlation was not significant compared with cells ESA+/CD44+/CD24-. **Conclusions:** The percentage of ABCG2 + cancer cells within the tumor and the number of training mammosferas are predictors of CRP in patients undergoing NAC for CMLA. ABCG2 is a potential marker for CTCs.

Keywords: Breast cancer, stem cell tumor, neoadjuvant chemotherapy, taxanes, Prognostic factors.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ABCG2	Membro de número 2 da subfamília G dos ABC-transportadores
ABC-transportadores	Proteínas transmembrana que utilizam a energia do ATP
ALDH	Aldeído-desidrogenase
APC	Allophyco-cyanin
ATP	Trifosfato de adenosina
BCRP	Breast cancer resistance protein
CD24	Proteína de adesão
CD326	Glicoproteína transmembrana
CD44	Glicoproteína transmembrana
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CMLA	Câncer de mama localmente avançado
CS	Clinical stage
CSCs	Cancer stem cells
CSLC	Cancer stem-like cell
CTCM	Célula tronco no câncer de mama
CTTs	Células tronco tumorais
CXCL12	Quimiocina ligante
CXCR4	Receptor de quimiocina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESA/EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ERBB2	Gene referente ao HER2
ESA	Epithelial Specific Antigen
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
LAMBC	Breast cancer locally advanced or metastatic
MAMMOCULT®	Medium for culture of mammospheres
MEM	Meio mínimo essencial
NACT	Neoadjuvant chemotherapy
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Resposta patológica completa
PE	Phycoerythrin
PE CY7	Phycoerythrin
PERCP CY5,5	Peridinin-chlorophyll proteins
QNA	Quimioterapia neoadjuvante
RCC	Resposta clínica completa
RE	Receptor de estrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterone
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
TEM	Transição Epitélio Mesenquimal
TISSUE-TEK® OCT	Material para a incorporação e congelamento de tecido

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Dois modelos de heterogeneidade dos tumores sólidos. Na esquerda observa-se que as células neoplásicas apresentam diferentes fenótipos, tem um extenso potencial proliferativo e exibem potencial para formação de novos tumores. Na direita observa-se que a maioria das células tumorais apresenta um potencial proliferativo limitado e apenas um subgrupo específico de células mantém um elevado potencial proliferativo e são capazes de dar origem a novos tumores. Adaptado de (Reya, Morrison <i>et al.</i> , 2001).	21
FIGURA 2: Teoria das células-tronco tumorais: iniciação, desenvolvimento e recaída do tumor. Um evento oncogênico inicial que ocorre em uma célula normal pode criar uma célula pré-cancerosa, ou resultar diretamente em transformação maligna. O evento oncogênico provavelmente requer um número de eventos epigenéticos. No momento do diagnóstico clínico, o tumor heterogêneo contém células que têm, ou são capazes de ativar seu programa celular tronco e pode ser capaz de fugir a terapia padrão. Qualquer célula-tronco cancerosa que evade à terapia é capaz de se dividir, diferenciar-se e repovoar um novo tumor. Adaptado de (Bomken, Fiser <i>et al.</i> , 2010).	23
FIGURA 3: Representação esquemática da promoção do tumor e efeitos provocados pelos fibroblastos estromais em um carcinoma mamário humano. Os fibroblastos derivados do estroma de SDF-1 aumenta o crescimento tumoral, não só por estimular a angiogênese através do recrutamento de EPCs circulantes na massa tumoral, mas também por estimulação direta parácrina de células tumorais através do receptor CXCR4 expresso por células do carcinoma. Adaptado de (Orimo e Weinberg, 2006).	27
FIGURA 4: Critérios de inclusão e exclusão.	32
FIGURA 5: Gráfico tipo “dot plots” mostrando o padrão das células do carcinoma invasivo de mama quando se observa o tamanho e granulosidade das células.	39
FIGURA 6: Seleção (gate) das células ESA positivas e cruzamento das informações dos anticorpos CD44, CD24, ABCG2 e CXCR4.	41
FIGURA 7: Ensaio de mamosferas.	42

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Associação dos marcadores de superfície celular com a capacidade de formação de esferas.	51
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Características fenotípicas das células-tronco do câncer de mama. Marcadores de superfície celular que são expressos pelas células tronco tumorais do câncer de mama. Adaptado de(Morrison, Schmidt <i>et al.</i> , 2008).	24
TABELA 2: Propriedades dos transportadores ABC e nomenclatura dos seus respectivos genes de acordo com Comitê de Nomenclatura do Genoma Humano. Adaptado de (Schinkel e Jonker, 2003).	26
TABELA 3: Características gerais das pacientes segundo estadiamento clínico e receptores hormonais.	34
TABELA 4: Anticorpos utilizados em cada tubo de amostra associado ao respectivo fluorocromo.	37
TABELA 5: Anticorpos utilizados associados aos respectivos fluorocromos e seus fabricantes.	38
TABELA 6: Avaliação da resposta clínica no tumor primário em pacientes submetidas à quimioterapia primária.	43
TABELA 7: Porcentagem média dos marcadores de superfície celular e da capacidade de formação de esferas.	46
TABELA 8: Correlação da expressão dos marcadores de superfície celular ESA/CD44/CD24, CXCR4 e ABCG2, com a idade.	47
TABELA 9: Correlação da expressão dos marcadores de superfície celular ESA/CD44/CD24, CXCR4 e ABCG2, com o tamanho clínico do tumor.	47
TABELA 10: Associação dos marcadores de superfície celular com o grau histopatológico do tumor.	48
TABELA 11: Associação dos marcadores de superfície celular com a expressão de HER2.	48
TABELA 12: Associação dos marcadores de superfície celular com os Receptores de Estrôgeno.	49
TABELA 13: Associação dos marcadores de superfície celular com os Receptores de Progesterona.	49
TABELA 14: Associação dos marcadores de superfície celular com o status axilar.	50
TABELA 15: Associação dos marcadores de superfície celular com a resposta patológica completa.	50

TABELA 16: Correlação dos marcadores de superfície celular com a capacidade de formação de esferas. 51

TABELA 17: Associação da resposta patológica com os fatores de predição 52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Células tronco tumorais	20
1.2. ABCG2.....	25
1.3. CXCR4.....	26
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Seleção de pacientes.....	31
3.2. Características das pacientes	33
3.3. Técnica para obtenção das amostras	33
3.4. Amostra de tecidos para citometria de fluxo e cultura celular	35
3.4.1. Digestão Enzimática	35
3.4.2. Contagem de células em câmara de Neubauer	35
3.4.3. Citometria de fluxo	36
3.4.4. Marcação celular para citometria de fluxo	37
3.4.5. Avaliação das amostras.....	38
3.4.5.1. Identificação das células tumorais a partir do gráfico de dispersão.....	38
3.4.6. Cultura de células	42
3.5. Protocolo de tratamento neoadjuvante	43
3.6. Resposta ao tratamento.....	43
3.7. Análise dos dados e estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Análise da expressão dos marcadores de superfície celular ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/ CXCR4+ e ESA+/ABCG2+	46
4.2. Células ESA+/ CD44+ / CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e ESFERAS em carcinomas de mama	47
4.3. Associação da expressão de ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e ESFERAS com a resposta patológica e a capacidade de formação de esferas	50
4.4. Associação dos fatores de predição com a resposta patológica.....	52

5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE.....	65

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna que mais frequentemente acomete as mulheres em todo o mundo (Siegel, Naishadham *et al.*, 2012). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer, cerca de 52.680 casos novos são esperados para o ano de 2012. A taxa de incidência bruta, em nosso país chega a 52 casos a cada 100 mil mulheres. Apesar do câncer de mama ter um bom prognóstico quando diagnosticado e tratado em estágios iniciais, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (INCA, 2011).

O tratamento atual do câncer de mama em estágios avançados inclui o uso de quimioterapia neoadjuvante ou quimioterapia primária. O objetivo desta abordagem terapêutica é a redução do volume do tumor propiciando cirurgias menos agressivas e aumentando as taxas de cirurgia conservadora. As taxas de resposta clínica à quimioterapia neoadjuvante variam de 60% a 80%, sendo que cerca de 3% a 30% das pacientes apresentam resposta patológica completa, definida pela ausência de neoplasia invasora residual (Rajan, Poniecka *et al.*, 2004). Estudos mostram que pacientes que apresentam resposta objetiva, em especial resposta patológica completa, apresentam um ganho de sobrevida quando comparadas com pacientes sem resposta ao tratamento neoadjuvante (Abrial, Penault-Llorca *et al.*, 2005; Sachelarie, Grossbard *et al.*, 2006). A observação de que a maioria das pacientes submetidas ao tratamento neoadjuvante permanecem com tumor residual no momento da cirurgia definitiva sugere que a resistência inata ou adquirida aos agentes citotóxicos é

bastante comum entre as neoplasias epiteliais malignas da mama (Sachelarie, Grossbard *et al.*, 2006). Assim, esse grupo de pacientes fornece recursos para a investigação de fatores que possam ser usados como indicadores de sobrevida (fatores prognósticos) ou indicadores de resposta à quimioterapia (fatores preditivos).

Alguns fatores prognósticos do câncer de mama já foram estudados e hoje são utilizados para definição do tratamento sistêmico da doença. Características como o tamanho do tumor, o número de linfonodos axilares comprometidos, o tipo e o grau histológico, a presença de invasão linfovascular peritumoral, a presença de receptores hormonais e a expressão da proteína HER-2 são os fatores de prognóstico utilizados na atualidade (Soerjomataram, Louwman *et al.*, 2008). No entanto, estudos recentes têm mostrado que o câncer de mama compreende um grupo heterogêneo de tumores, com comportamentos biológicos diferentes, e com características moleculares distintas (Razzak, Lin *et al.*, 2008). A heterogeneidade tumoral é um fator determinante da falha do tratamento da doença. A identificação de fatores biológicos responsáveis pela falta de resposta ou resposta ineficaz ao tratamento sistêmico se faz necessária para a seleção dos melhores esquemas de quimioterapia e para o desenvolvimento de terapias alvo-específicas que possam otimizar a resposta e reduzir a mortalidade pela doença. O modelo hierárquico, fundamentado pela existência de células tronco tumorais (CTTs) pode explicar a heterogeneidade tumoral e é uma hipótese aceitável para explicar a falha do tratamento da doença.

1.1. Células tronco tumorais

Células de uma mesma neoplasia apresentam diferentes capacidades funcionais e proliferativas bem como se encontram em diferentes estágios de diferenciação (Bonnet e Dick, 1997; Reya, Morrison *et al.*, 2001). Este modelo hierárquico, onde diferentes subpopulações no tumor exercem diferentes atividades biológicas tem sido proposto após a identificação de uma pequena população de células com capacidade de iniciação e auto renovação tanto em neoplasias hematológicas como em tumores sólidos (Bonnet e Dick, 1997; Al-Hajj, Wicha *et al.*, 2003). Como estas características funcionais são descritas em células primordiais, os autores nomearam esta subpopulação celular de *cancer stem cells*, ou células tronco tumorais (CTTs) (Al-Hajj, Wicha *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostram que os tumores sólidos apresentam uma composição celular bastante heterogênea e que apenas uma pequena parcela dessas células apresenta capacidade de se proliferar e gerar novos tumores. Esta capacidade tem sido elucidada por três modelos. No modelo estocástico, durante a expansão clonal ocorre uma seleção de clones mais resistentes ao ambiente hostil que a neoplasia está se desenvolvendo (hipóxia, resposta imune entre outros fatores hostis) e desta forma são geradas, aleatoriamente, células com diferentes fenótipos. No modelo hierárquico, temos a idéia de uma célula tronco tumoral com capacidade de auto renovação e diferenciação. As células progenitoras (filhas de células tronco tumorais) sofrem diferenciação formando populações fenotipicamente distintas (Figura 1). Existe ainda uma terceira explicação que é a plasticidade celular. Durante a expansão clonal, células malignas têm a capacidade de diferenciar ou indiferenciar. Essa modificação

fenotípica é suportada pela transição epitélio mesenquimal (TEM) e é influenciada pelas condições do microambiente tumoral (tensão de oxigênio, resposta imune e ambientes hostis) e não apenas pelo seu componente epitelial (Reya, Morrison *et al.*, 2001; Kenny, Lee *et al.*, 2007; Mani, Guo *et al.*, 2008; Bomken, Fiser *et al.*, 2010; Correia e Bissell, 2012).

Figura 1: Dois modelos de heterogeneidade dos tumores sólidos. Na esquerda observa-se que as células neoplásicas apresentam diferentes fenótipos, tem um extenso potencial proliferativo e exibem potencial para formação de novos tumores. Na direita observa-se que a maioria das células tumorais apresenta um potencial proliferativo limitado e apenas um subgrupo específico de células mantém um elevado potencial proliferativo e são capazes de dar origem a novos tumores. Adaptado de (Reya, Morrison *et al.*, 2001).

No câncer de mama, as CTTs podem ser identificadas pela expressão de proteínas de membrana celular. A utilização de citometria de fluxo para a fenotipagem e caracterização desta população tem sido descrita por alguns autores. Al-Hajj e colaboradores descreveram que a população de células com fenótipo $ESA^+/CD44^+/CD24^-$ são enriquecidas de células com alta capacidade de iniciação e auto renovação tumoral. Essa subpopulação de células do câncer de mama com alta expressão de CD44 e baixa expressão de CD24 ($CD44^+/CD24^-$) foi isolada em efusões pleurais e foi demonstrado ter

maior capacidade de gerar tumores em modelos xenográficos, quando comparadas com outras subpopulações celulares (Al-Hajj, Wicha *et al.*, 2003).

Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que a presença de CTTs nos tumores sólidos pode ser responsável pela falta de resposta ao tratamento neoadjuvante (Yu, Yao *et al.*, 2007; Li, Lewis *et al.*, 2008). Estes estudos demonstram que a porcentagem de células com fenótipo $CD44^{+}/CD24^{-}$ aumenta durante o tratamento neoadjuvante em pacientes com câncer de mama. Esta mesma observação é encontrada em estudos *in vitro* com linhagens celulares de diversas neoplasias malignas expostas à radiação ionizante (Phillips, McBride *et al.*, 2006; Fillmore e Kuperwasser, 2008). Adicionalmente, muitos estudos têm demonstrado que células tumorais circulantes isoladas de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de câncer apresentam fenótipos compatíveis com os de CTTs encontrados no tumor primário (Theodoropoulos, Polioudaki *et al.*, 2010). A observação da existência de uma subpopulação de células com capacidade de auto renovação e de gerar novas neoplasias em tumores primários e no sangue periférico de pacientes metastáticos associada com evidências de que essas células possuem alta resistência aos agentes citotóxicos é um forte indício de que a presença ou a quantidade de células com características tronco tumorais no tumor primário pode ser um importante fator de predição de resposta à quimioterapia neoadjuvante (Figura 2).

Figura 2: Teoria das células-tronco tumorais: iniciação, desenvolvimento e recaída do tumor. Um evento oncogênico inicial que ocorre em uma célula normal pode criar uma célula pré-cancerosa, ou resultar diretamente em transformação maligna. O evento oncogênico provavelmente requer um número de eventos epigenéticos. No momento do diagnóstico clínico, o tumor heterogêneo contém células que têm, ou são capazes de ativar seu programa celular tronco e pode ser capaz de fugir a terapia padrão. Qualquer célula-tronco cancerosa que evade à terapia é capaz de se dividir, diferenciar-se e repovoar um novo tumor. Adaptado de (Bomken, Fiser *et al.*, 2010).

Outros marcadores para a identificação de CTTs têm sido descrito. Em neoplasias hematológicas, a alta atividade das proteínas transportadoras de membrana do tipo ABC (*side population*) pode ser utilizada como fator de seleção de células com características tronco hematopoiéticas (Wu, Wei *et al.*, 2007). No câncer de mama, a expressão ou a atividade da aldeído-desidrogenase (ALDH) pode selecionar uma subpopulação celular mais enriquecida de CTTs que a imunofenotipagem com CD44 e CD24. Adicionalmente, a expressão desta enzima está diretamente relacionada com piora de prognóstico em carcinomas inflamatórios da mama (Ginestier, Hur *et al.*, 2007).

A identificação de populações de CTTs permitiria identificar moléculas expressas nestas células que poderiam funcionar como alvo terapêutico eliminando essa crucial população trazendo mais efetividade no tratamento do câncer de mama (AL-HAJJ et al., 2004). Tabela 1 lista alguns marcadores de superfície celulares já descritos em câncer de mama.

Tabela 1: Características fenotípicas das células-tronco do câncer de mama. Marcadores de superfície celular que são expressos pelas células tronco tumorais do câncer de mama. Adaptado de (Morrison, Schmidt *et al.*, 2008).

FATOR	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
ABCG2	ABCG2 (ATP-binding cassette G2) é uma classe de transportadores de drogas capazes de bombear drogas citotóxicas para fora da célula.	(Zhou, Schuetz <i>et al.</i> , 2001)
CD 44	Está envolvido na adesão celular, motilidade e metástases.	(Ponti, Costa <i>et al.</i> , 2005) e (Al-Hajj, Wicha <i>et al.</i> , 2003)
EpCAM/ESA	Molécula de adesão de célula epitelial. Antígeno de superfície epiteliais mamárias que é expresso em tecidos e tumores.	(Dontu, Al-Hajj <i>et al.</i> , 2003)
ALDH1	Aldeído desidrogenase-1 desempenha um papel na diferenciação das células-tronco e sua atividade prediz piores resultados clínicos.	(Ginestier, Hur <i>et al.</i> , 2007)
CXCR4	É um receptor de quimiocinas envolvidos na metástase e sua expressão é aumentada em mamosferas.	(Muller, Homey <i>et al.</i> , 2001) e (Dontu, Abdallah <i>et al.</i> , 2003)
RE	Receptor estrogênio é expresso em células de câncer de mama, progenitores mamários, e células tronco tumorais de mamas cancerosas.	(Clarke, 2005) e (Dontu, El-Ashry <i>et al.</i> , 2004)

1.2. ABCG2

A proteína ABCG2 é membro da família dos ABC-transportadores que são proteínas transmembrana que utilizam a energia do trifosfato de adenosina (ATP) para realizar determinados processos biológicos, incluindo translocação de vários substratos através de membranas e transporte não relacionados ao processo, como a tradução do RNA e reparo do DNA. Elas transportam uma grande variedade de substratos através de membranas extra e intracelular, incluindo produtos metabólicos, lipídios, esteróis e drogas; sendo que este processo pode ocorrer contra o gradiente de concentração. Os transportadores ABC estão envolvidos na resistência do tumor, fibrose cística, multirresistência bacteriana, e uma série de outras doenças hereditárias (Schinkel e Jonker, 2003; Dean, 2009; Ni, Bikadi *et al.*, 2010). Existem 48 ABC-transportadores presentes nos humanos os quais são agrupados em 7 subfamílias (A, B, C, D, E, F e G) e possuem funções e propriedades variadas como demonstrado na Tabela 2 .

A proteína ABCG2 é o membro de número 2 da subfamília G dos ABC-transportadores. Também denominada BCRP (*breast cancer resistance protein*), ela funciona como um mecanismo de defesa celular à exposição às drogas devido sua capacidade de transportar um grande número de substratos incluindo uma série de drogas citotóxicas e seus metabólitos através da membrana celular (Schinkel e Jonker, 2003) e está diretamente associada à resistência ao tratamento do câncer de mama (Doyle, Yang *et al.*, 1998). Ela tem sido identificada em CTTs de uma série de tumores sólidos incluindo o carcinoma da mama (Diestra, Scheffer *et al.*, 2002; Benderra, Faussat *et al.*, 2004). Esta característica intrínseca da proteína proporciona resistência à quimioterapia em neoplasias malignas e podem ser

responsáveis pela manutenção de CTTs viáveis em sítios distantes do tumor primário após o tratamento com quimioterapia.

Tabela 2: Propriedades dos transportadores ABC e nomenclatura dos seus respectivos genes de acordo com Comitê de Nomenclatura do Genoma Humano. Adaptado de (Schinkel e Jonker, 2003).

Proteína	Nome do Gene	Nomes Alternativos	Tamanho (aa)	Localização
MDR1 P-gp	ABCB1	PGY1, GP170	1280	Apical
MRP1	ABCC1	MRP	1531	Basolateral
MRP2	ABCC2	cMOAT, cMRP	1545	Apical
MRP3	ABCC3	MOAT-D, cMOAT-2	1527	Basolateral
MRP4	ABCC4	MOAT-B	1325	Apical
MRP5	ABCC5	MOAT-C, pABC11	1437	Basolateral
BCRP	ABCG2	MXR, ABCP	655	Apical

1.3. CXCR4

A proteína CXCR4 é um receptor de quimiocina e um provável marcador da disseminação de células neoplásicas para órgãos específicos. As quimiocinas (do grego, *kinos* = movimento) são uma família de citocinas, ou proteínas secretadas por células. Seu nome é derivado da sua habilidade de induzir quimiotaxia em células responsivas. A função principal das quimiocinas é agir como quimio-atraente para guiar a migração celular. Células que são atraídas por quimiocinas seguem um sinal de aumento da concentração até o local fonte. Muitas quimiocinas controlam células do sistema imune durante o processo de imuno-vigilância. Outras têm um papel importante no desenvolvimento, promovendo angiogênese ou guiando células para

tecidos específicos. Ainda há quimiocinas que são inflamatórias, liberadas a partir de uma ampla variedade de células em resposta a infecções bacterianas, virais, e após a inoculação de agentes que causam danos físicos tais como sílica ou cristais de urato. O receptor CXCR4 desencadeia seus efeitos biológicos através da interação com a quimiocina ligante, CXCL12 (SDF-1), uma molécula endógena com potente atividade quimiotática (Muller, Homey *et al.*, 2001; Dontu, Abdallah *et al.*, 2003; Balkwill, 2004; Kulbe, Levinson *et al.*, 2004; Laurence, 2006). O complexo CXCR4-SDF1 induz uma mudança de conformação do receptor resultando na ativação da proteína G. Este mecanismo ativa uma série de vias de sinalizações intracelulares que desencadeiam inúmeros efeitos biológicos, como sobrevivência, proliferação e invasão celular contribuindo com o desenvolvimento do câncer. Estes efeitos podem resultar de uma ação autócrina, parácrina ou indireta (Luker e Luker, 2006) (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática da promoção do tumor e efeitos provocados pelos fibroblastos estromais em um carcinoma mamário humano. Os fibroblastos derivados do estroma de SDF-1 aumenta o crescimento tumoral, não só por estimular a angiogênese através do recrutamento de EPCs circulantes na massa tumoral, mas também por estimulação direta parácrina de células tumorais através do receptor CXCR4 expresso por células do carcinoma. Adaptado de (Orimo e Weinberg, 2006).

A expressão de CXCR4 em CTTs tem sido sugerida como um mecanismo importante para a disseminação metastática (Muller, Homey *et al.*, 2001; Murphy, 2001). Ele é o receptor de quimiocinas mais comumente expresso por células tumorais e foi identificado em mais de 20 tipos de tumores (Zlotnik, 2004). O seu ligante está expresso em altos níveis em alguns tecidos específicos como pulmão, fígado, medula óssea e linfonodos que são sítios frequentes de metástase do carcinoma da mama. Adicionalmente, o bloqueio do CXCR4 inibe a disseminação metastática *in vivo* e a sua expressão está relacionada com pior prognóstico em pacientes com câncer de mama sem metástase para linfonodos axilares (Smith, Luker *et al.*, 2004; Liang, Yoon *et al.*, 2005; Blot, Laberge-Le Couteulx *et al.*, 2008).

A expressão nuclear da proteína CXCR4 é positiva em 22% das células ductais normais, em 45% dos tumores ductais *in situ* e 67% dos carcinomas invasivos da mama. A elevada expressão nuclear do CXCR4 esteve associada com metástase à linfonodos, e, a forte marcação citoplasmática de CXCR4 esteve associada a tumores de maior grau histológico, RE negativo, RP negativo e ERBB2 positivo. Uma menor sobrevida foi observada em pacientes com forte expressão nuclear e citoplasmática deste receptor (Salvucci, Bouchard *et al.*, 2006).

Pesquisas com marcadores moleculares de metástases mostraram a migração direcionada de células tumorais de mama, que superexpressam a proteína CXCR4, a órgãos-alvo que expressam altos níveis de CXCL12. Constataram também que esta quimiocina induz a polimerização da actina e, que a incubação das células tumorais com anticorpo anti-CXCR4 ou anti-CXCL12 bloqueia a capacidade de quimiotaxia e invasão mediada pelo CXCL12 (Muller, Homey *et al.*, 2001).

Sendo o câncer de mama uma neoplasia composta por uma população celular heterogenia, onde essas populações celulares são fenotipicamente distintas

e apresentam diferentes comportamentos biológicos. Essa heterogeneidade fenotípica é um fator determinante na resistência ao tratamento e na disseminação tumoral. A identificação da presença de uma população celular com característica de célula tronco pode explicar a heterogeneidade tumoral bem como a falha do tratamento baseada em fatores não genéticos. Desta forma, a busca por marcadores que possam identificar a presença de CTTs se faz necessária para compreendermos melhor os mecanismos de progressão e disseminação tumoral, abrindo oportunidades para o desenvolvimento de terapias alvo-específicas.

2. OBJETIVOS

O objetivo do estudo é analisar a relação da presença de potenciais marcadores de CTTs no tumor primário de pacientes com câncer de mama localmente avançado sobre a resposta ao tratamento neoadjuvante bem como estudar fatores biológicos específicos das células primordiais que possam estar envolvidos na disseminação metastática e resistência a drogas citotóxicas.

2.1. Objetivos específicos

Correlacionar a quantidade de células $ESA^+/CD44^+/CD24^-$ no tumor primário com a resposta patológica ao tratamento neoadjuvante;

Correlacionar a quantidade de células $ESA^+/CD44^+/CD24^-$ com os subtipos histológicos do carcinoma ductal invasivo determinados pela expressão de receptores hormonais, HER2 no tumor primário;

Analisar a presença de células com alta expressão da proteína ABCG2 nas células ESA^+ e estudar a correlação com a resposta ao tratamento neoadjuvante e presença de metástase axilar após o tratamento;

Estudar a presença de células com alta expressão da proteína CXCR4 em células ESA^+ e analisar a correlação com a presença de metástase na axila após o tratamento neoadjuvante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção de pacientes

Foram incluídas prospectivamente no período de Agosto de 2010 a Abril de 2012, amostras de 74 pacientes com suspeita de diagnóstico de carcinoma de mama localmente avançado que foram submetidas à core biopsy e/ou biopsia incisional da mama, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Os critérios de inclusão proposto para este projeto são pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama e que foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante. Assim foram excluídas: 11 pacientes que foram submetidas à cirurgia primária, oito pacientes que fizeram hormonioterapia, três pacientes seguiram outro esquema de quimioterapia, três amostras foram insuficientes comprometendo a qualidade da citometria de fluxo, três pacientes eram portadoras de CDIS, duas pacientes optaram por seguir tratamento em outro serviço, uma paciente foi a óbito por se tratar de doença metastática, uma paciente apresentou diagnóstico de tumor Filoides e uma não era carcinoma; constituindo assim 41 pacientes que se enquadram para o projeto proposto (Figura 4).

Figura 4: Critérios de inclusão e exclusão.

3.2. Características das pacientes

Dentre as pacientes que se enquadram no projeto proposto, a média de idade das mesmas é de $52,9 \pm 10,3$ anos sendo que 24 delas (60%) estão na menopausa. Segundo o estadiamento clínico, a maioria das pacientes é considerada como portadoras de carcinoma localmente avançado (II, III e IV). O diâmetro clínico do tumor primário é de $5,6 \pm 3$ cm. Segundo as características patológicas, a maioria dos CDI foi classificada como grau II (56%). Sete tumores foram classificados como grau I (17%) e onze como grau III (26%). Em 65% dos tumores encontramos expressão positiva do receptor de estrogênio e em 58% a expressão do receptor de progesterona foi positiva. A superexpressão do HER2 foi encontrada em 46% dos tumores. A tabela 3 resume as características das pacientes.

3.3. Técnica para obtenção das amostras

A coleta do material das biopsias incisionais foi realizada no Centro Cirúrgico Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e as amostras de core biopsy guiadas por ultrassom coletadas no Centro de Diagnóstico por Imagem do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Imediatamente após o fragmento ser retirado, a amostra era então colocada em frasco Falcon® (BD Biosciences®) estéril contendo meio para cultura celular MEM (Gibco®) e refrigerada em gelo e imediatamente levada ao laboratório para ser processada, onde a mesma era então subdividida em três partes: uma congelada em Tissue tek® (OCT) que posteriormente servirá para verificação da presença de receptores para hormônios,

porcentagem de células positivas para KI67, extração de RNA e DNA; a amostra restante dividida em outras duas metades, sendo uma para o estudo de citometria de fluxo e a outra para cultura de células. Todo o material foi processado.

As amostras utilizadas foram provenientes do banco de tumor de mama do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, aprovado pela comissão de ética deste hospital sob nº 2467/09. Todas as pacientes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa antes da inclusão. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi aplicado no momento da coleta e/ou visita (retorno de rotina) da paciente ao ambulatório de Mastologia.

Tabela 3: Características gerais das pacientes segundo estadiamento clínico e receptores hormonais.

IDADE (média em anos)	52,9
MENOPAUSA	
SIM	24
NÃO	16
ESTADIAMENTO CLÍNICO	
IIa	01
IIb	05
IIIa	10
IIIb	16
IIIc	01
IV	08
GRAU HISTOLÓGICO	
I	07
II	23
III	11
RECEPTOR DE ESTÓGENO	
POSITIVO	27
NEGATIVO	14
RECEPTOR DE PROGESTERONA	
POSITIVO	24
NEGATIVO	17
RECEPTOR DE HER2	
POSITIVO	19
NEGATIVO	22

3.4. Amostra de tecidos para citometria de fluxo e cultura celular

3.4.1. Digestão Enzimática

Os fragmentos separados para aplicação desta técnica foram fragmentados em pedaços menores com auxílio de uma lâmina de bisturi e incubados por 1 hora a 37°C em meio de cultura MEM (Gibco®) contendo 100 U/mL de Collagenase Tipo IV (Gibco®) para a digestão enzimática, conforme recomendação do fabricante. Após digestão, o material era todo colocado em um filtro de nylon (Cell Strainer 100µm – BD Biosciences®) acoplado a um tubo Falcon® (BD Biosciences®) e pressionado levemente com uma espátula plástica ao mesmo tempo em que era adicionado MEM com 20% de Soro Fetal Bovino para inativação da Collagenase® na quantidade suficiente para que todo o material digerido atravessasse o filtro formando no fundo do tubo uma suspensão celular em meio MEM. A suspensão era então colocada em centrífuga refrigerada e centrifugada à 1100 rpm à 4°C por 5 minutos. O líquido sobrenadante era então vertido e descartado e o sedimento ressuspendido em 1000µl de MEM.

Uma porcentagem do material foi retirada para contagem de células e análise da viabilidade celular por método de exclusão em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripán.

3.4.2. Contagem de células em câmara de Neubauer

Após a suspensão celular ser bem homogeneizada, 6µl desta suspensão celular foi transferida para um pequeno tubo acrescentando-se 54µl de azul de tripan 0,2% obtendo-se assim uma diluição 1/10. Uma alíquota deste conteúdo foi retirada

com a pipeta, e ao final o valor encontrado foi multiplicado por 1×10^4 ml (ordem de grandeza da câmara). As células viáveis então foram identificadas e contadas nas 4 áreas de um lado da câmara de contagem. O valor médio encontrado nos quatro quadrantes era então multiplicado pelo fator de diluição, no caso 10. Encontramos aproximadamente um valor médio de 1×10^6 células por amostra processada.

3.4.3. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um processo que utiliza o laser para mensurar características de partículas biológicas como células ou partes celulares. Os citômetros de fluxo fazem uma leitura de partículas ou células suspensas em meio líquido conforme elas atravessam uma fonte de luz. O princípio central da citometria de fluxo é que luz é dispersa e fluorescência é emitida, quando o laser atinge as partículas suspensas em movimento. A luz dispersa e a fluorescência emitida são mensuradas em cada partícula que passa através da fonte de excitação.

As células ou partículas a serem analisadas em citometria de fluxo devem estar suspensas uma a uma em um meio líquido. Isso permite a formação de um fluxo único de células que atravessam o feixe de laser em uma corrente líquida. Após a aquisição dos dados referentes à dispersão da luz e à fluorescência, para cada partícula, as informações resultantes podem ser analisadas utilizando um computador e softwares específicos que estão associados ao citômetro (Jaroszeski e Radcliff, 1999).

Para caracterização das células tumorais utilizamos o anticorpo anti-ESA (ESA - eBiosciences®) e as CTTs foram identificadas com anticorpos anti-CD44 (BD Biosciences®), anti-CD24 (BD Biosciences®). Utilizamos ainda os anticorpos anti-ABCG2 (Millipore®) e anti-CXCR4 (eBiosciences®) para fenotipagem destas

proteínas nas células tumorais. As células foram adquiridas em FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA) e as análises foram realizadas usando o software FlowJo (TreeStar, USA).

3.4.4. Marcação celular para citometria de fluxo

Três tubos, apropriados para citometria, foram separados para cada amostra e em cada um foi colocado o volume de suspensão correspondente a aproximadamente 1×10^5 células. Após acrescentamos 5µl de cada anticorpo, marcado com o respectivo fluorocromo. No tubo 1 colocamos o anticorpo CD326 (ESA) marcado com PercpCy5,5, CD24 marcado com PE, CD44 marcado com APC e CXCR4 marcado com PECy7. No tubo 2 colocamos CD-326 (ESA) marcado com PercpCy5,5, CD24 marcado com PE, CD44 marcado com APC e ABCG2 marcado com FITC. No tubo 3 utilizamos os isotipos controle FITC, PE, APC, Percpcy5,5 e PECy7 (Tabela 4 e 5).

Tabela 4: Anticorpos utilizados em cada tubo de amostra associado ao respectivo fluorocromo.

Tubo 1	CD326 (ESA) - Percp Cy 5,5
	CD24 - PE
	CD44 - APC
	CXCR4 - PE Cy 7
	LIN – FITC
Tubo 2	CD326 (ESA) - Percp Cy 5,5
	CD24 - PE
	CD44 - APC
	ABCG2 – FITC
Tubo 3	Controle IgG FITC
	Controle IgG PE
	Controle IgG APC
	Controle IgG Percp Cy 5,5
	Controle IgG PE Cy7

Tabela 5: Anticorpos utilizados associados aos respectivos fluorocromos e seus fabricantes.

Anticorpos	CD326 (ESA) - Percp Cy 5,5	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.347199)
	CD24 - PE	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.555428)
	CD44 - APC	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.559942)
	CXCR4 - PE Cy 7	eBioscience, San Diego, CA, USA (cat. 25.9999-42)
	LIN - FITC	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.340546)
	ABCG2 – FITC	Millipore, Temecula, CA, USA (cat.MAB4155F)
Controles	Controle IgG FITC	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.555748)
	Controle IgG PE	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.555749)
	Controle IgG APC	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.555751)
	Controle IgG Percp Cy 5,5	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.550795)
	Controle IgG PE Cy7	BD Pharmingen, San Jose, CA, USA (cat.557872)

Após repousar protegido da luz, em temperatura ambiente por 30 minutos, adicionamos 1000µl de PBS. A suspensão era então centrifugada à 4°C em velocidade de 1100 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspensionado e fixado em PBS formol à 2%.

Os tubos contendo a suspensão celular marcada com os anticorpos ligados aos respectivos fluorocromos eram lidos em citômetro da marca BD FACS CANTO II®. Os dados foram armazenados no disco rígido da unidade de processamento ligada ao citômetro, em arquivos de nome semelhante ao registro do paciente do serviço de arquivo médico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SAME-FMRP). Esses arquivos foram copiados em uma unidade móvel de armazenamento para realização de cópia de segurança e posteriormente analisados através do software FlowJo® versão 8.8.6.

3.4.5. Avaliação das amostras

3.4.5.1. Identificação das células tumorais a partir do gráfico de dispersão

Ao observar o gráfico de dispersão das amostras de tumor invasivo de mama, avaliando a morfologia celular (tamanho e granulosidade), o que observamos foi um padrão semelhante em todos os casos (Figura 5).

Figura 5: Gráfico tipo “dot plots” mostrando o padrão das células do carcinoma invasivo de mama quando se observa o tamanho e granulosidade das células.

Com objetivo de identificar dentro de toda a população celular, qual é aquela que realmente representava a população de células tumorais, selecionamos então a população com padrão de células tumorais, excluindo a população de linfócitos, que se apresenta bem definida, de acordo com seu tamanho e granulosidade. A marcação positiva para os anticorpos ESA nesta população de células do tumor comprometido fez-nos entender que ela se tratava de células epiteliais, onde certamente se encontravam as células tumorais. Para avalizarmos que estávamos selecionando a população de células tumorais, adicionalmente foi feita uma seleção (gate) na população que acreditávamos ser de linfócitos e a confirmação com a positividade para o anticorpo LIN, que é um coquetel para marcação de linfócitos, assim garantimos a exclusão da população hematopoiética.

Assim pudemos identificar graficamente apenas as células ESA positivas, observando que elas, em sua maior parte, encontraram-se espalhada por toda porção superior do gráfico (células maiores e/ou mais granulosas), mostrando que essas células ESA positivas compreendem uma população celular bastante heterogênea, de tamanho e granulosidade diversas.

Assim, passamos a considerar todo esse grupo celular como de interesse e realizamos então, dentro deste, uma análise conjunta dos anticorpos CD44 e CD24, buscando identificar em cada amostra a porcentagem de células CD44+/CD24-. Deste modo, foi realizada uma seleção (gate) das células ESA positivas e nestas células cruzamos as informações dos anticorpos CD44 e CD24. O gráfico originado mostra 4 populações celulares. No quadrante inferior esquerdo encontram-se as células CD44-/CD24-, no quadrante superior esquerdo as células CD44+/CD24-, no quadrante inferior direito as células CD44-/CD24+ e no quadrante superior direito as células positivas tanto para CD44 quanto para CD24 (Figura 6).

Analizamos ainda a expressão das proteínas ABCG2 e CXCR4 na população de células positivas para o ESA, já que esses marcadores de superfície celular têm sido descritos como potenciais marcadores de células iniciadoras de tumor no câncer de mama (Figura 6).

Figura 6: Seleção (gate) das células ESA positivas e cruzamento das informações dos anticorpos CD44, CD24, ABCG2 e CXCR4.

3.4.6. Cultura de células

Após a contagem das células em Câmara de Neubauer utilizando o corante para viabilidade celular Azul de Tripán, um valor aproximado de 1×10^5 de células eram colocadas em cultura em placas de 6 wells com meio MammoCult® mais suplementos, conforme orientação do fabricante, para formação de mamosferas e após 7 dias estas células eram então centrifugadas e o sobrenadante desprezado. O pelet de células era então ressuspensionado em 500µl de meio e desta suspensão com uma pipeta aspirava-se 50µl da suspensão celular e colocada em um well de uma placa de 96 wells e contado as esferas e este valor multiplicado por 10 obtendo-se assim o valor total de esferas (Figura 7).

Figura 7: Ensaio de mamosferas.

3.5. Protocolo de tratamento neoadjuvante

Todas as pacientes foram submetidas ao esquema de tratamento proposto pelo protocolo do Setor de Mastologia e Oncologia Ginecológica do HCFMRP-USP. O esquema EC-D consiste de 4 ciclos de epirrubicina $75\text{mg}/\text{m}^2$ e ciclofosfamida $600\text{mg}/\text{m}^2$ em infusão endovenosa no D1 a cada 21 dias seguidos de 4 ciclos de docetaxel $100\text{mg}/\text{m}^2$ também no D1 a cada 21/21 dias. Nos casos com indicação de trastuzumabe, o tratamento foi iniciado juntamente com a primeira dose do docetaxel. A dose de ataque foi $6\text{mg}/\text{kg}$ de peso e mais três doses de manutenção de $4\text{mg}/\text{kg}$ a cada 21/21 dias. Assim, dentre as 20 pacientes que terminaram o esquema de quimioterapia neoadjuvante dez pacientes foram tratados com CE-T, oito foram tratados com EC-TH (HER2 +) e dois foram tratados com FEC75 combinação como quimioterapia neoadjuvante.

3.6. Resposta ao tratamento

A resposta ao tratamento neoadjuvante foi baseada na avaliação clínica e histológica. Para a avaliação clínica, nos baseamos no produto da medida clínica do maior diâmetro do tumor e o maior diâmetro perpendicular a este, estimados por um paquímetro de precisão (HAYWARD *et al.*, 1977). A tabela 6 mostra a relação da resposta clínica com o produto dos diâmetros do tumor.

Tabela 6: Avaliação da resposta clínica no tumor primário em pacientes submetidas à quimioterapia primária.

Resposta clínica		Produto do diâmetro dos tumores
Resposta objetiva	Completa	tumor não evidente clinicamente
	Parcial	redução maior que 50%
Sem resposta		redução menor que 50% ou aumento menor que 25%
Progressão		aumento maior que 25%

A resposta patológica foi definida conforme a presença de doença invasora residual. Pacientes com ausência de carcinoma invasor ou presença de neoplasia microinvasiva no sítio do tumor primário foram consideradas como resposta patológica completa (pRC). Esta definição de resposta patológica completa com um termo designado "near pCR", onde apenas resíduos focais invasivos tumorais eram encontrado no tecido mamário removido tem sido proposta por alguns autores (Kuroi, Toi *et al.*, 2006; Kolacinska, Chalubinska *et al.*, 2012).

3.7. Análise dos dados e estatística

O teste de Mann–Whitney U, Kruskal–Wallis e o teste Exato de Fisher foram utilizados para as análises estatísticas. Comparações entre as características das pacientes com duas variáveis e a porcentagem de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+ e ESA+/ABCG2+ dentro do tumor foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney (status axilar, ER, PR e expressão da proteína HER2) e o teste Kruskal- Wallis para o estágio patológico e grau histológico, além da correlação bivariada (idade, status menopausal, tamanho do tumor patológico e percentual de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+ e ESA+/ABCG2+ dentro do tumor). O teste exato de Fisher foi utilizado para as duas amostras independentes ABCG2 e pCR. O software JMP - 9.0 foi utilizado para as análises estatísticas acima mencionadas.

4. RESULTADOS

Foram incluídas 74 pacientes com câncer de mama (diagnóstico histológico de carcinoma ductal invasor) que foram submetidas ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante. Dentre as pacientes que se enquadram no projeto proposto a média de idade das mesmas é de $52,9 \pm 10,3$ anos sendo que 24 delas (60%) estão na menopausa. Segundo o estadiamento clínico, a maioria das pacientes é considerada como portadoras de carcinoma localmente avançado (II, III e IV). O diâmetro clínico do tumor primário é de $5,6 \pm 3$ cm. Segundo as características patológicas, a maioria dos CDI foi classificado com grau II (56%). Sete tumores foram classificados como grau I (17%) e 11 como grau III (26%). Em 65% dos tumores encontramos expressão positiva do receptor de estrogênio e em 58% a expressão do receptor de progesterona foi positivo. A superexpressão do HER2 foi encontrada em 46% dos tumores. A resposta clínica completa (RCC) e resposta patológica completa (PCR) foi observada em 15 (36%) e 10 (24%) pacientes respectivamente.

A expressão dos marcadores CD44, CD24 nas células ESA+ foi analisada nas 41 amostras. Os marcadores CXCR4 e ABCG2 foram analisados em 36 amostras. De modo geral a média da porcentagem de células com fenótipo ESA+/CD44+/CD24- foi de $2,18\% \pm 4,5\%$. Já a média das populações com fenótipos ESA+/CXCR4+ foi de $8,41\% \pm 10,9\%$ e das populações de ESA+/ABCG2+ foi de $4,95\% \pm 5,04\%$, e a porcentagem média da formação de esferas para cada 1000 células foi de $4,07\% \pm 4,8\%$ (Tabela 7).

Tabela 7: Porcentagem média dos marcadores de superfície celular e da capacidade de formação de esferas.

MARCADORES	MÉDIA
ESA+/CD44+/CD24-	2,18% +/- 4,5 %
ESA+/CXCR4+	8,41% +/- 10,97 %
ESA+/ABCG2+	4,95% +/- 5,04 %
ESFERAS	4,07 % +/- 4,8 %

4.1. Análise da expressão dos marcadores de superfície celular ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/ CXCR4+ e ESA+/ABCG2+

Não encontramos nenhuma correlação entre a porcentagem de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e a capacidade de formação de esferas com a idade das pacientes ($r = -0,04$; $r = -0,20$; $r = -0,10$; e $r = 0,01$ com $p = 0,7$; $p = 0,2$; $p = 0,5$ e $p = 0,9$; respectivamente) (Tabela 8).

Também não encontramos nenhuma correlação entre a porcentagem de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+ e a capacidade de formação de esferas com o tamanho clínico do tumor ($r = 0,14$; $r = -0,08$ e $r = -0,02$; com $p = 0,3$; $p = 0,6$ e $p = 0,9$; respectivamente) (Tabela 9).

No entanto, quando correlacionamos o tamanho clínico do tumor com o marcador ESA+/ABCG2+ encontramos uma relação $r = -0,33$; porém com $p = 0,04$ (Tabela 8).

Tabela 8: Correlação da expressão dos marcadores de superfície celular ESA/CD44/CD24, CXCR4 e ABCG2, com a idade.

MARCADORES	IDADE	
	Correlação	P
ESA+/CD44+/CD24-	-0,04	0,7
ESA+/CXCR4+	-0,20	0,2
ESA+/ABCG2+	-0,10	0,5
ESFERAS/ 1000	0,01	0,9

Tabela 9: Correlação da expressão dos marcadores de superfície celular ESA/CD44/CD24, CXCR4 e ABCG2 com o tamanho clínico do tumor.

MARCADORES	TAMANHO CLÍNICO	
	Correlação	P
ESA+/CD44+/CD24-	0,14	0,3
ESA+/CXCR4+	-0,08	0,6
ESA+/ABCG2+	-0,33	0,0481*
ESFERAS/ 1000	-0,02	0,9

4.2. Células ESA+/ CD44+ / CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e ESFERAS em carcinomas de mama

Na análise univariada, não observamos uma associação das células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ com o grau tumoral ($p = 0,3$; $p = 0,4$ e $p = 0,1$; respectivamente). Observamos uma associação apenas com a capacidade de formação de esferas ($p = 0,0392$) (Tabela 10).

Tabela 10: Associação dos marcadores de superfície celular com o grau histopatológico do tumor.

MARCADORES	GRAU			p
	I	II	III	
ESA+/CD44+/CD24-	0,81	0,02	0,64	0,3
ESA+/CXCR4+	6,18	2,17	8,73	0,4
ESA+/ABCG2+	6,22	2,62	3,76	0,1
ESFERAS/ 1000	5	2,8	1	0,0392*

Na análise univariada, não observamos uma associação das células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e a capacidade de formação de esferas com a expressão da proteína HER2 (p = 0,8; p = 1; p = 0,6 e p = 0,3; respectivamente) (Tabela 11).

Tabela 11: Associação dos marcadores de superfície celular com a expressão de HER2.

MARCADORES	HER2		p
	Negativo	Positivo	
ESA+/CD44+/CD24-	0,48	0,31	0,8
ESA+/CXCR4+	3,76	3,05	1
ESA+/ABCG2+	3,82	3,33	0,6
ESFERAS/ 1000	2,5	3,5	0,3

Em pacientes RE-positivo e RE-negativo, o percentual médio de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e a capacidade de formação de esferas foi de 0,35; 3,05; 4,7 e 3, nas pacientes RE-positivas; e 0,47; 3,76; 1,4 e 1,1 nas pacientes RE-negativas com (p = 0,9; p = 1; p = 0,1 e p = 0,1) (Tabela 12).

Tabela 12: Associação dos marcadores de superfície celular com os Receptores de Estrôgeno.

MARCADORES	RE		p
	Negativo	Positivo	
ESA+/CD44+/CD24-	0,47	0,35	0,9
ESA+/CXCR4+	3,76	3,05	1
ESA+/ABCG2+	1,4	4,7	0,1
ESFERAS/ 1000	1,1	3	0,1

Em pacientes RP-positivo e RP-negativo, o percentual médio de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e a capacidade de formação de esferas foi de 0,48; 2,43; 3,82 e 3, nas pacientes RP-positivas, e de 0,3; 4,9; 3,33 e 1,35 nas pacientes RP-negativas com ($p = 0,8$; $p = 0,7$; $p = 0,6$ e $p = 0,1$) (Tabela 13).

Não observamos uma associação das células ESA+/CD44+/CD24, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e a capacidade de formação de esferas com o status axilar ($p = 0,4$; $p = 0,6$; $p = 0,7$ e $p = 0,4$) (Tabela 14).

Tabela 13: Associação dos marcadores de superfície celular com os Receptores de Progesterona.

MARCADORES	RP		p
	Negativo	Positivo	
ESA+/CD44+/CD24-	0,3	0,48	0,8
ESA+/CXCR4+	4,9	2,43	0,7
ESA+/ABCG2+	3,33	3,82	0,6
ESFERAS/ 1000	1,35	3	0,1

Tabela 14: Associação dos marcadores de superfície celular com o status axilar.

MARCADORES	AXILA		p
	Negativa	Positiva	
ESA+/CD44+/CD24-	0,28	0,58	0,4
ESA+/CXCR4+	4,9	2,36	0,6
ESA+/ABCG2+	4	3,15	0,7
ESFERAS/ 1000	1,75	4	0,4

4.3. Associação da expressão de ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e ESFERAS com a resposta patológica e a capacidade de formação de esferas

Alguns marcadores de superfície, tais como ABCG2, e CXCR4, foram relatados como potenciais marcadores tumorais de iniciação células no câncer de mama.

Não observamos associação entre a PCR com percentual de células ESA+/CD44+/CD24-, ESA+/CXCR4+, ESA+/ABCG2+ e a capacidade de formação de esferas do tumor (Tabela 15).

Tabela 15: Associação dos marcadores de superfície celular com a resposta patológica completa.

MARCADORES	RESPOSTA PATOLÓGICA COMPLETA		p
	NÃO	SIM	
ESA+/CD44+/CD24-	0,64	0,28	0,1
ESA+/CXCR4+	2,43	3,68	0,7
ESA+/ABCG2+	3,86	1,26	0,2
ESFERAS/ 1000	2,8	2,5	0,7

Houve uma correlação positiva entre o número de formação de mamosferas com a expressão de ESA+/ABCG2+ ($r = 0,63$ e $p = 0,0007$) e entre a expressão de ESA+/CXCR4+ ($r = 0,40$ e $p = 0,0497$). Esta correlação não foi significativa em comparação com os demais marcadores celulares (Tabela 16 e Gráfico 1).

Tabela 16: Correlação dos marcadores de superfície celular com a capacidade de formação de esferas.

MARCADORES	ESFERAS	
	CORRELAÇÃO	P
ESA+/CD44+/CD24-	-0,20	0,3
ESA+/CXCR4+	0,40	0,0497*
ESA+/ABCG2+	0,63	0,0007*

Gráfico 1: Associação dos marcadores de superfície celular com a capacidade de formação de esferas.

4.4. Associação dos fatores de predição com a resposta patológica

Ao analisarmos os fatores de predição com a resposta patológica não encontramos associação com o grau histológico, com RP, com HER2 e com a percentagem de células ESA+/CD44+/CD24- ($p = 0.1$; $p = 0.2$; $p = 0.2$ e $p = 0.2$; respectivamente). No entanto, encontramos uma associação em relação ao RE e com a percentagem de células ESA+/ABCG2+ ($p = 0.03$ e 0.04 ; respectivamente).

Tabela 17: Associação da resposta patológica com os fatores de predição.

		pRC	SR	p
Grau	1	0	6	0.1
	2	5	16	
	3	4	6	
RE	Positivo	3	21	0.03
	Negativo	6	8	
RP	Positivo	3	18	0.2
	Negativo	6	11	
HER2	Positivo	6	12	0.2
	Negativo	3	17	
ESA+/CD44+/CD24-	≤ 0.3	6	11	0.2
	> 0.3	3	13	
ESA+/ABCG2+	≤ 1.3	5	5	0.04
	> 1.3	4	23	

Baseando-se nas pacientes com e sem resposta patológica completa foi construídas uma tabela ROC (Receiver Operating Characteristic) para cada uma das três variáveis. Observamos que a quantidade e/ou percentagem de células ESA+/ABCG2+ é o teste que apresentou maior acurácia. A elaboração da curva ROC de sensibilidade e especificidade dá como melhor ponto de corte o valor 1,26% de ESA+/ABCG2+ (AUC = 0,64, com sensibilidade = 0,55 e especificidade = 0,83).

Utilizando este ponto de corte, categorizamos os tumores como de maior ou menor quantidade de células ESA+/ABCG2+. Observamos assim, que pacientes com tumores com maior quantidade destas células tem uma chance menor de apresentar resposta patológica completa (teste exato de Fisher; $p = 0,04$; 14% com pRC com alta expressão de ESA+/ABCG2+ e 50% com pRC com alta expressão de ESA+/ABCG2+).

5. DISCUSSÃO

A presença de células iniciadoras de tumor dentro de tumores sólidos surgiu como uma hipótese alternativa para a causa da reincidência do câncer. As células que expressam CD44 e não expressam o CD24 (fenótipo CD44+/CD24-) foram descritas como capazes de induzir a formação de tumor quando injetada em camundongos. As células CD44+/CD24- apresentam um comportamento de célula primordial, dando origem às novas células tumorais que apresentam características diversas, assim como as do tumor que às deu origem (AL-HAJJ et al., 2003).

Alguns relatos mostraram que marcadores de superfície celular podem identificar essa população e sua prevalência dentro do tumor. Além disso, nenhuma correlação entre essa variação e o resultado clínico tinha sido relatada, apesar de alguns estudos mostrarem controversa associação entre a presença de células iniciadoras de tumor e características clínicas patológicas. Nós demonstramos uma alta variação da porcentagem de células CD44+/CD24- em pacientes com câncer de mama. No entanto não encontramos associação da expressão do CD44/CD24 com a resposta das pacientes ao tratamento neoadjuvante.

No presente estudo demonstramos uma associação do grau tumoral com a capacidade de formação de esferas ($p = 0,03$) e do tamanho clínico com a quantidade de células com marcação ESA+/ABCG2+ ($p = 0,04$). Recentemente em 2011, (Giatromanolaki, Sivridis et al., 2011) encontraram uma associação do fenótipo CD44+/CD24- com o padrão triplo negativo dos carcinomas de mama (RE-, RP- e cerb- B2-). O câncer de mama triplo negativo apresenta um comportamento clínico mais agressivo do que os demais tumores deste órgão e, conseqüentemente, a sobrevida das pacientes que apresentam esse tipo de tumor é inferior a da

população geral das pacientes com essa patologia (Dawson, Provenzano *et al.*, 2009). Os autores entenderam que o fato dos carcinomas triplo negativos apresentarem menor resposta relativa ao tratamento quimioterápico pode estar associado a maior presença do fenótipo CD44+/CD24- neste grupo de tumores.

A análise da expressão das proteínas CD44 e CD24 é o método mais utilizados para identificação de células iniciadoras de tumores em carcinomas de mama. No entanto, não encontramos nenhuma correlação das células ESA+/CD44+/CD24-, com os parâmetros clínicos patológicos. Em uma recente meta-análise incluindo 12 estudos, Zhou, Jiang *et al.*, 2010, identificaram uma significativa correlação entre a presença de células CD44+/CD24- no tumor primário e parâmetros clínicos patológicos (receptor de estrogênio, receptor de progesterona, Her2 e grau tumoral). Os autores encontraram uma associação entre marcadores de células tronco tumorais e pior sobrevida das pacientes. Todos os estudos incluídos nesta meta-análise usaram imunohistoquímica para analisar a porcentagem de células iniciadoras de tumor no tecido neoplásico, talvez por este motivo, os resultados encontrados não corroboram com os achados encontrados em nosso trabalho, pois em nosso estudo utilizamos citometria de fluxo com material fresco.

Alguns estudos relatam que tumores HER2-positivo são enriquecidos de células tronco tumorais (população de células CD44+/CD24-), e a terapia-alvo é capaz de reduzir esta população de células (Li, Lewis *et al.*, 2008). Em nosso estudo não observamos um aumento significativo nas células CD44+/CD24- em tumores HER2 positivo.

O marcador ideal para CTTs não foi definido ainda. Estudos recentes demonstraram que a expressão de aldeído- desidrogenase 1 (ALDH1) é um marcador mais apropriado para fenotipagem do que a expressão das proteínas

CD44 e CD24 para selecionar uma população enriquecida com células tronco tumorais dentro de carcinomas de mama (Ginestier, Hur *et al.*, 2007; Charafe-Jauffret, Ginestier *et al.*, 2010).

Analizamos a expressão da proteína ABCG2 e CXCR4 em 36 amostras de tumor de mama e encontramos taxas de células ESA+/ABCG2+ e ESA+/CXCR4+ variando entre 4,95% +/- 5,04 % e 4,07% +/- 4,8%, respectivamente. A proteína ABCG2 está associada com resistência à quimioterapia, e a presença de um número maior de células com esta característica pode estar associada com uma menor taxa de resposta ao tratamento.

Não encontramos associação significativa das células com marcação ESA+/ABCG2+ com o EC, o status axilar, expressão de HER2, grau, RE e RP. Entretanto, com a capacidade de formação de esferas, achamos uma associação significativa ($p = 0,0007$). Esta proteína de superfície celular tem sido investigada como marcadores em potencial para as células tumorigênicas em muitos tumores sólidos. Os transportadores ABC tem sido relatados como um mecanismo relacionado com a resistência de danos ao DNA pelo efluxo de compostos tóxicos em células tronco tumorais (CTTs). Sua ativação em malignidade pode refletir não só mutação somática, mas também intrínseca ativação das células tronco do tecido a partir do qual o câncer surge. A proteína ABCG2 (ou proteína de resistência do câncer de mama - BCRP) foi inicialmente identificada como uma transcrição superexpressa em câncer de mama multirresistente (Doyle, Yang *et al.*, 1998).

Em um trabalho de 2011, os pesquisadores mostraram expressão positiva de ABCG2 na maioria das células tumorais (86,7%) do carcinoma ductal da mama invasivo, e em cerca de 40% dos casos apresentavam expressão relativamente alta de ABCG2. Além disso, a expressão de ABCG2 está correlacionada com a

expressão significativa de HER2 ($p = 0,001$) por meio de análise estatística de 196 casos de câncer de mama detectados por imunohistoquímica. Aquelas pacientes com elevada expressão de ABCG2 demonstraram ser mais frequentemente imunoreativas, o que sugere que ABCG2 pode ter alguma correlação com pior comportamento biológico e agressividade clínica. Além disso, demonstraram que a expressão de ABCG2 está correlacionada com metástases linfonodal, o que sugere que as pacientes com elevada expressão de ABCG2 pode ter um pior prognóstico que aquelas com baixa expressão de ABCG2. Isto pode sugerir que ABCG2 não é apenas um transportador ABC, que desempenha um papel na resistência a drogas de quimioterapia do câncer de mama, mas também um novo potencial biomarcador que pode prever comportamento, evolução clínica, prognóstico e eficácia da quimioterapia (Xiang, Su *et al.*, 2011).

Constatamos que a porcentagem de células ESA+/CXCR4+ variou de 8,41% +/- 10,97 %. Porém não encontramos associação significativa das células com marcação ESA+/CXCR4+ com o EC, o status axilar, expressão de HER2, grau, RE e RP. Entretanto, com a capacidade de formação de esferas, achamos uma associação significativa ($p = 0,0497$). Este dado forma uma importante evidência de que as quimiocinas poderiam ser um marcador para células iniciadoras de tumor em carcinomas ductais invasivos de mama. No entanto, não foi observada associação entre a sua expressão e as características clínicas ou patológicas. Esta proteína CXCR4 é uma quimiocina que tem sido sugerida como um marcador de sinalização para a disseminação de células cancerosas específicas para órgãos. Acredita-se que altos níveis de SDF-1 em alguns órgãos específicos como linfonodos, pulmão, fígado e ossos (os principais sítios de metástase do câncer de mama) direcionam as células metastáticas de tumores que expressam o CXCR4 (Geminder, Sagi-Assif *et*

al., 2001; Muller, Homey *et al.*, 2001; Dontu, Al-Hajj *et al.*, 2003; Porcile, Bajetto *et al.*, 2004). Um estudo mais recente demonstrou que o CXCR4 e o CXCR7 no câncer da mama podem fazer contribuições distintas em relação à malignidade do tumor, sendo que a expressão de CXCR4 nas células tumorais aumenta a invasão e motilidade das mesmas (Hernandez, Magalhaes *et al.*, 2011).

O período de seguimento curto não nos permite avaliar o impacto de porcentagens de células CD44+/CD24- sobre o prognóstico. As células tronco tumorais são organizadas dentro de um microambiente bem controlado constituído pelos componentes celular e acelular que integram sinalização sistêmica e local para regular a sua biologia, um fenômeno chamado nicho de células tronco. Estudos recentes têm ligado o papel do oxigênio dos tecidos com manutenção de células tronco tumorais. A promoção de uma de células-tronco como fenótipo em células cancerosas de um tumor sólido poderá ser conduzida por hipóxia (Li, Bao *et al.*, 2009). Além disso, a hipóxia pode regular muitos aspectos da biologia do tumor, contribuindo para proliferação das células tumorais, a resistência a anti-neoplásicos agentes, indução angiogênica, metástase e invasão (Pouyssegur, Dayan *et al.*, 2006).

Compreender como esses clones interagem e promovem o estado metastático leva a uma abordagem alternativa para terapia do câncer, e a fenotipagem por citometria de fluxo em uma amostra do tumor fresco parece ser uma confiável técnica para estimar a cinética celular de verdade no interior do microambiente do tumor do que o convencional imunohistoquímica.

Entender como o tumor interage com o microambiente e dá origem ao processo metastático, e compreender as células iniciadoras de tumor e sua capacidade de se diferenciar em subpopulações celulares tumorigênicas e não

tumorigênicas pode ser uma forma de abordagem para o desenvolvimento de novas terapias contra o câncer de mama. Estudos futuros devem considerar o papel das células tronco tumorais na formação da metástase e sua importância justifica a realização de esforços contínuos para reconhecer características adicionais na identificação precisa dessas células, usando como base as informações que até agora alcançamos. Isso certamente contribuirá de forma grandiosa na melhoria das terapias atuais e na descoberta de novos alvos terapêuticos no tratamento da neoplasia mamária.

6. CONCLUSÃO

Não encontramos uma correlação significativa quando analisamos a quantidade de células $\text{ESA}^+/\text{CD44}^+/\text{CD24}^-$ no tumor primário com a resposta patológica ao tratamento neoadjuvante, apenas com o tamanho clínico.

Não encontramos uma correlação significativa da quantidade de células $\text{ESA}^+/\text{CD44}^+/\text{CD24}^-$ com os subtipos histológicos do carcinoma ductal invasivo determinados pela expressão de receptores hormonais ou HER2 no tumor primário.

Não encontramos correlação da presença de células com alta expressão da proteína ABCG2 nas células ESA^+ com a resposta ao tratamento neoadjuvante e presença de metástase axilar após o tratamento, no entanto encontramos uma associação destas células com a capacidade de formar esferas.

Não encontramos correlação da presença de células com alta expressão da proteína CXCR4 nas células ESA^+ com a resposta ao tratamento neoadjuvante e presença de metástase axilar após o tratamento, no entanto encontramos uma associação destas células com a capacidade de formar esferas.

Concluimos assim que o percentual de células cancerosas ABCG2+ dentro do tumor e a capacidade de formação de mamosferas são fatores preditivos de RPC em pacientes submetidos à quimioterapia neoadjuvante para carcinomas de mama localmente avançado, e que ABCG2 é um marcador potencial para células tronco tumorais mamárias.

7. REFERÊNCIAS

ABRIAL, S. C. et al. High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 94, n. 3, p. 255-63, Dec 2005.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983-8, Apr 1 2003.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540-50, Jul 2004.

BENDERRA, Z. et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 23, p. 7896-902, Dec 1 2004.

BLOT, E. et al. CXCR4 membrane expression in node-negative breast cancer. **The breast journal**, v. 14, n. 3, p. 268-74, May-Jun 2008.

BOMKEN, S. et al. Understanding the cancer stem cell. **British journal of cancer**, v. 103, n. 4, p. 439-45, Aug 10 2010.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature medicine**, v. 3, n. 7, p. 730-7, Jul 1997.

CHARAFE-JAUFFRET, E. et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 1, p. 45-55, Jan 1 2010.

CLARKE, R. B. Isolation and characterization of human mammary stem cells. **Cell proliferation**, v. 38, n. 6, p. 375-86, Dec 2005.

CORREIA, A. L.; BISSELL, M. J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. **Drug Resist Updat**, v. 15, n. 1-2, p. 39-49, Feb-Apr 2012.

DAWSON, S. J.; PROVENZANO, E.; CALDAS, C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. **European journal of cancer**, v. 45 Suppl 1, p. 27-40, Sep 2009.

DEAN, M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 14, n. 1, p. 3-9, Mar 2009.

DIESTRA, J. E. et al. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. **The Journal of pathology**, v. 198, n. 2, p. 213-9, Oct 2002.

DONTU, G. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes & development**, v. 17, n. 10, p. 1253-70, May 15 2003.

DONTU, G. et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell proliferation**, v. 36 Suppl 1, p. 59-72, Oct 2003.

DONTU, G.; EL-ASHRY, D.; WICHA, M. S. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 15, n. 5, p. 193-7, Jul 2004.

DOYLE, L. A. et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15665-70, Dec 22 1998.

FILLMORE, C. M.; KUPERWASSER, C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. **Breast cancer research : BCR**, v. 10, n. 2, p. R25, 2008.

GEMINDER, H. et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. **Journal of immunology**, v. 167, n. 8, p. 4747-57, Oct 15 2001.

GIATROMANOLAKI, A. et al. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. **Med Oncol**, v. 28, n. 3, p. 745-52, Sep 2011.

GINESTIER, C. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell stem cell**, v. 1, n. 5, p. 555-67, Nov 2007.

HERNANDEZ, L. et al. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. **Breast cancer research : BCR**, v. 13, n. 6, p. R128, 2011.

JAROSZESKI, M. J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. **Molecular biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 37-53, Feb 1999.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; BISSELL, M. J. Targeting the tumor microenvironment. **Front Biosci**, v. 12, p. 3468-74, 2007.

KOLACINSKA, A. et al. Pathological complete response in younger and older breast cancer patients. **Archives of medical science : AMS**, v. 8, n. 2, p. 310-5, May 9 2012.

KULBE, H. et al. The chemokine network in cancer--much more than directing cell movement. **The International journal of developmental biology**, v. 48, n. 5-6, p. 489-96, 2004.

KUROI, K. et al. Issues in the assessment of the pathologic effect of primary systemic therapy for breast cancer. **Breast cancer**, v. 13, n. 1, p. 38-48, 2006.

LAURENCE, A. D. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. **British journal of haematology**, v. 132, n. 3, p. 255-67, Feb 2006.

LI, X. et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 9, p. 672-9, May 7 2008.

LI, Z. et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. **Cancer cell**, v. 15, n. 6, p. 501-13, Jun 2 2009.

LIANG, Z. et al. Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. **Cancer research**, v. 65, n. 3, p. 967-71, Feb 1 2005.

LUKER, K. E.; LUKER, G. D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. **Cancer letters**, v. 238, n. 1, p. 30-41, Jul 8 2006.

MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-15, May 16 2008.

MORRISON, B. J. et al. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 10, n. 4, p. 210, 2008.

MULLER, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 50-6, Mar 1 2001.

MURPHY, P. M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. **The New England journal of medicine**, v. 345, n. 11, p. 833-5, Sep 13 2001.

NI, Z. et al. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **Current drug metabolism**, v. 11, n. 7, p. 603-17, Sep 2010.

ORIMO, A.; WEINBERG, R. A. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. **Cell cycle**, v. 5, n. 15, p. 1597-601, Aug 2006.

PHILLIPS, T. M.; MCBRIDE, W. H.; PAJONK, F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 24, p. 1777-85, Dec 20 2006.

PONTI, D. et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. **Cancer research**, v. 65, n. 13, p. 5506-11, Jul 1 2005.

PORCILE, C. et al. CXCR4 activation induces epidermal growth factor receptor transactivation in an ovarian cancer cell line. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1030, p. 162-9, Dec 2004.

POUYSSÉGUR, J.; DAYAN, F.; MAZURE, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 437-43, May 25 2006.

RAJAN, R. et al. Change in tumor cellularity of breast carcinoma after neoadjuvant chemotherapy as a variable in the pathologic assessment of response. **Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1365-73, Apr 1 2004.

RAZZAK, A. R.; LIN, N. U.; WINER, E. P. Heterogeneity of breast cancer and implications of adjuvant chemotherapy. **Breast cancer**, v. 15, n. 1, p. 31-4, 2008.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105-11, Nov 1 2001.

SACHELARIE, I. et al. Primary systemic therapy of breast cancer. **The oncologist**, v. 11, n. 6, p. 574-89, Jun 2006.

SALVUCCI, O. et al. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. **Breast cancer research and treatment**, v. 97, n. 3, p. 275-83, Jun 2006.

SCHINKEL, A. H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 1, p. 3-29, Jan 21 2003.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10-29, Jan-Feb 2012.

SMITH, M. C. et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. **Cancer research**, v. 64, n. 23, p. 8604-12, Dec 1 2004.

SOERJOMATARAM, I. et al. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 107, n. 3, p. 309-30, Feb 2008.

THEODOROPOULOS, P. A. et al. Circulating tumor cells with a putative stem cell phenotype in peripheral blood of patients with breast cancer. **Cancer letters**, v. 288, n. 1, p. 99-106, Feb 1 2010.

WU, C. et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. **Cancer research**, v. 67, n. 17, p. 8216-22, Sep 1 2007.

XIANG, L. et al. ABCG2 is associated with HER-2 expression, lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma. **Diagnostic pathology**, v. 6, p. 90, 2011.

YU, F. et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1109-23, Dec 14 2007.

ZHOU, L. et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. **Breast cancer research and treatment**, v. 122, n. 3, p. 795-801, Aug 2010.

ZHOU, S. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. **Nature medicine**, v. 7, n. 9, p. 1028-34, Sep 2001.

ZLOTNIK, A. Chemokines in neoplastic progression. **Seminars in cancer biology**, v. 14, n. 3, p. 181-5, Jun 2004.

APÊNDICE

Tabela 1: Características clínicas das pacientes.

PACIENTES	IDADE	MENOPAUSA	TAMANHO CLINICO	T	N	M	EC
1	55	SIM	16	4d	2	1	IV
2	35	NÃO	3,5	2	0	1	IV
3	57	SIM	2,9	4b	2	1	IIIb
4	47	NÃO	6	3	0	0	IIb
5	41	NÃO	6,3	4d	1	0	IIIb
6	64	SIM	5,3	3	0	0	IIb
7	52	SIM	6,7	4b	2	0	IIIb
8	53	SIM	8	4b	2	0	IIIb
9	63	SIM	6,5	4d	2	0	IIIb
10	63	SIM	7	4b	0	0	IIIb
11	46	NÃO	16	4d	3	1	IV
12	34	NÃO	4,3	2	1	1	IV
13	58	SIM	4,3	4b	2	0	IIIb
14	62	SIM	6,5	3	2	0	IIIa
15	64	SIM	4,2	2	2	1	IV
16	64	SIM	7,5	4d	2	0	IIIb
17	56	SIM	9,5	4d	2	0	IIIb
18	49	NÃO	3,5	4b	1	0	IIIb
19	49	NÃO	4,8	2	1	0	IIb
20	62	SIM	5,1	3	2	0	IIIa
21	53	NÃO	5,5	3	2	0	IIIa
22	40	NÃO	5,2	3	1	0	IIIa
23	57	SIM	6,5	3	0	0	IIb
24	43	NÃO	3,8	3	1	0	IIIa
25	58	SIM	5,1	4b	1	0	IIIb
26	36	NÃO	8,2	4d	1	0	IIIb
27	39	NÃO	6,1	3	1	0	IIIa
28	64	SIM	3,8	2	0	0	IIa
29	49	NÃO	2,2	3	1	0	IIIa
30	66	SIM	4,7	4b	2	0	IIIb
31	56	SIM	1	1	3	1	IIIc
32	51	SIM	4,5	4b	2	1	IV
33	60	SIM	4,5	2	2	0	IIIa
34	51	NÃO	6	3	1	1	IV
35	68	SIM	3	4b	1	0	IIIa
36	38	NÃO	3,5	2	2	0	IIIa
37	67	SIM	2,5	4b	1	0	IIIb
38	53	SIM	6	4d	1	1	IV
39	68	SIM	4,1	4b	0	0	IIIb
40	30	NÃO	4,5	3	0	0	IIb
41	48	SIM	6,3	4d	2	0	IIIb

Tabela 2: Características histopatológicas das pacientes.

PACIENTES	HISTOPATOLOGICO	GRAU	RE	RP	HER2	CIRURGIA	AXILA	TAM PATOL	pCR
1	CDI+PAGET	III	NEG	NEG	POS	CR	1	1,1	Não
2	CDI	II	POS	POS	NEG	CC	0	0	Sim
3	CDI	II	POS	POS	NEG	CR	17	1,2	Não
4	CDI	I	POS	POS	NEG	CR	6	1,9	Não
5	CDI	II	POS	POS	POS	CR	5	3,2	Não
6	CDI	II	NEG	NEG	POS	CR	0	CDIS	Sim
7	CDI	II	NEG	NEG	POS	CR	0	0,18	Não
8	CDI	I	POS	NEG	POS	CR	0	1,95	Não
9	CDI	II	NEG	NEG	POS	CR	3	0	Sim
10	CDI	III	NEG	NEG	NEG	CR	0	0	Sim
11	CDI	II	POS	POS	POS	NS		-	Não
12	CDI	II	POS	POS	POS	CC	2	2,6	Não
13	CDI	I	POS	POS	NEG	CR	8	1,7	Não
14	CDI	II	NEG	NEG	POS	CR	8	7,5	Não
15	CDI	III	POS	POS	NEG	CC	2	1,3	Não
16	CDI	III	NEG	NEG	NEG	CR	8	3	Não
17	CDI	II	POS	POS	NEG	CR	12	2,8	Não
18	CDI	I	POS	POS	NEG	CR	4	2,2	Não
19	CDI+MUCINA	I	POS	POS	POS	CR	3	3	Não
20	CDI	II	NEG	NEG	POS	CR	3	1,5	Não
21	CDI	III	NEG	NEG	POS	CR	0	0	Sim
22	CDI	II	POS	POS	POS	CR	0	CDIS	Sim
23	CDI	III	NEG	NEG	NEG	CR	0	4,5	Não
24	CDI	III	NEG	NEG	NEG	CC	0	2,8	Não
25	CDI	I	POS	POS	NEG	CR	4	1,58	Não
26	CDI	II	POS	POS	NEG	CR	9	2,1	Não
27	CDI	III	NEG	NEG	POS	CC	0	0	Sim
28	CDI	II	POS	POS	POS	CC	0	1,54	Não
29	CDI	II	POS	POS	POS	CR	2	CDIS	Sim
30	CDI	II	POS	POS	POS	CC	5	2,5	Não
31	CDI	III	POS	NEG	NEG	CR	17	1,2	Não
32	CDI	II	POS	POS	NEG	CR	8	2,1	Não
33	CDI	II	POS	NEG	POS	CC	2	0,51	Não
34	CDI	II	POS	POS	POS	NS		-	Não
35	CDI	II	POS	POS	NEG	CC	3	2,8	Não
36	CDI	III	NEG	NEG	NEG	CR	0	0	Sim
37	CDI	I	POS	POS	NEG	NS		-	Não
38	CDI	III	NEG	NEG	NEG	CR	1	6,8	Não
39	CDI	II	POS	POS	NEG	CR	3	3,9	Não
40	CDI	II	POS	POS	NEG	CR	14	3,8	Não
41	CDI	II	POS	POS	NEG	CR	6	CDI + CDIS	Não

Tabela 3: Valores das citometrias das pacientes.

PACIENTES	ESA+/CD44+/CD24-	ESA+/CXCR4+	ESA+/ABCG2+	ESFERAS/1000
1	1,0	-	-	-
2	0,3	-	-	-
3	1,6	-	-	-
4	2,4	-	-	-
5	1,5	0,6	2,3	-
6	0,1	2,1	0,8	-
7	0,3	2,4	1,3	7,6
8	5,2	9,9	8,3	-
9	0,3	1,2	1,3	1,2
10	0,3	2,6	0,5	0,9
11	1,6	0,1	0,8	-
12	2,2	0,2	3,0	1,6
13	0,8	2,4	2,5	-
14	1,1	2,1	3,2	10
15	0,2	2,3	6,2	5
16	20,3	13,5	1,4	-
17	1,2	6,7	0,7	4
18	0,4	45,3	21,1	24
19	0,3	18,5	5,2	4
20	0,0	2,2	3,9	-
21	3,3	25,5	0,3	0,6
22	2,6	3,7	4,2	3
23	0,6	32,2	14,9	1
24	0,1	29,6	4,0	1
25	4,9	1,1	7,3	6
26	0,0	5,8	1,1	5
27	0,7	8,7	3,5	6
28	0,0	1,3	9,5	-
29	0,3	3,9	10,1	-
30	0,0	17,6	6,7	-
31	0,0	0,8	6,1	1,5
32	0,0	0,3	0,8	1
33	0,0	17,3	6,0	6
34	0,3	4,8	2,6	2,6
35	0,0	0,4	1,7	2,6
36	0,08	4,9	7,4	2,5
37	0,62	1,31	3,82	3
38	20,2	-	1,2	0
39	0,01	0,01	2,2	-
40	9,92	24,4	6,7	1,8
41	4,79	7,25	20,7	-