UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Larissa Raquel Mouro Mandarano

**Associação entre a expressão proteica e a função da
enzima ALDH1 no câncer de mama**

Ribeirão Preto
2018

Larissa Raquel Mouro Mandarano

**Associação entre a expressão proteica e a função da
enzima ALDH1 no câncer de mama**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor pelo Curso de
Pós-graduação em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Mandarano, Larissa Raquel Mouro

Associação entre a expressão proteica e a função da enzima ALDH1 no câncer de mama. Ribeirão Preto, 2018.

59 p; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi

1. Câncer de mama. 2. Célula tronco tumoral. 3. Quimioterapia neoadjuvante. 4. Aldeído-desidrogenase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Raquel Mouro Mandarano

Associação entre a expressão proteica e a função da enzima ALDH1 no câncer de mama.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor pelo Curso de
Pós-graduação em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ao meu esposo Luiz por seu apoio incondicional e pelo seu
exemplo de dedicação e persistência.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais José Luiz e Cleuza, por me mostrarem a importância do estudo e por terem me oferecido as condições e oportunidades de atingir grandes objetivos.

Aos meus filhos Luiz e Júlia por tolerarem os momentos de dedicação ao trabalho e por serem a grande alegria e motivação da minha vida.

Ao professor Daniel Guimarães Tiezzi por ser um exemplo de médico e cientista, me mostrando o valor do estudo contínuo, da busca pelo conhecimento e da aplicação prática objetivando sempre o melhor para o paciente. Por me desafiar a cada dia a ser uma profissional melhor e por oferecer condições para meu crescimento e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professore Jurandyr Moreira de Andrade, Francisco José Candido dos Reis, Hédio Humberto A. Carrara e Paulo Meyer de Paula Philbert por serem exemplos de dedicação ao ensino e a boa prática médica.

Aos colegas Renata Danielle Sicchieri, Heriton Antonio, Willian Silveira, Fernando Valejo, por dividirem os momentos de angústia, frustrações e conquistas. Por estarem sempre prontos a ajudar solícitamente.

Aos amigos do departamento Rosane Casula, Reinaldo Tavares, Suelen Bezerra, Ilza Mazzocato, Ricardo Perussi e Gabriela Sica por todo apoio, incentivo e trabalho extra, sempre carinhosos e dedicados, sendo uma ajuda imprescindível.

Aos colegas Viviane Fernandes Schiavon, Franklin Fernandes Pimentel, Joaquim Sarmento, Willian Clagnan, Isabela Carlotti Buzatto e Christiani Bisinotto pelo companheirismo e compreensão, e por continuarem a me ensinar como ser uma profissional cada dia melhor.

Às funcionárias da enfermagem e do ambulatório de Ginecologia que tornam mais leve o nosso trabalho e o sofrimento dos pacientes.

*“Entrega o teu caminho ao SENHOR,
confia nele, e o mais ele fará”*

Salmos 37. 5

RESUMO

MANDARANO, L. R. M. **Associação entre a expressão e a função da enzima ALDH1 no câncer de mama.** 2018. 59 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

A alta atividade da enzima Aldeído-desidrogenase (ALDH) tem sido relatada como um marcador das células troncos tumorais (CTT) no câncer de mama. Sabe-se que essas células estão envolvidas na resistência ao tratamento radio e quimioterápico e podem ser responsáveis pela recorrência e disseminação metastática. A associação entre a quantidade de CTTs e a resposta a quimioterapia neoadjuvante (QNA) ainda não está estabelecida. Foi analisado retrospectivamente a expressão de ALDH1A1 por imunohistoquímica (IHQ) em amostras previamente analisadas por citometria de fluxo para ALDH1A1 no tumor primário de 61 pacientes com carcinoma ductal invasivo diagnosticado entre 2010 e 2012. A maioria das pacientes estava entre 51-70 anos (59%), na menopausa (65,6%) e com estágio clínico III (47,5%). A expressão positiva de receptores de estrogênio, progesterona e de HER2 foi de 67,2%, 52,5% e 45,9% respectivamente. A imunohistoquímica para ALDH1A1 foi realizada com lâminas da TMA e considerado positivos os casos com marcação citoplásmica evidente em grupamentos de 5 ou mais células. Foi analisada a associação entre esses dados e o resultado da citometria de fluxo para ALDH1 e também a associação com os fatores prognósticos conhecidos. Não foi encontrada associação ($p = 0,67$) entre a porcentagem de células ALDH1+ com o resultado da imunohistoquímica positiva para ALDH1A1 (4,45% (1,7 – 10,1)) e negativa (3,2% (1,2 – 13,6)). Os dados não demonstraram associação da IHQ para ALDH1A1 ou da quantidade de células ALDH1+ no tumor primário com a resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante, sugerindo que essa população pode não ser um fator preditor isolado da resposta a QNA. Também não foi observado relação da IHQ para ALDH1A1 com os fatores prognósticos conhecidos. A sobrevida também não foi influenciada pela expressão de ALDH1A1 pela IHQ tanto na sobrevida global ($p = 0,54$; HR = 1,33 (0,52 – 3,39)) quanto na livre de doença ($p = 0,35$; HR = 1,67 (0,57 – 4,90)). Quanto a porcentagem de células ALDH1+ no tumor primário, também não houve impacto sobre a sobrevida global ($p = 0,40$; HR = 0,98 (0,92 – 1,03)), nem na sobrevida livre de doença ($p = 0,55$; HR = 0,98 (0,92 – 1,05)). A presença de células ALDH1A1 positivas na imunohistoquímica não se relaciona com a atividade da enzima analisada por citometria de fluxo e não apresenta associação com fatores prognósticos.

Palavras chave: Câncer de mama, Célula tronco tumoral, Quimioterapia neoadjuvante, Aldeído-desidrogenase, Fatores prognósticos.

ABSTRACT

MANDARANO, L. R. M. **Correlation of ALDH expression and enzyme function in breast cancer.** 2018. 59 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2018.

The expressions of aldehyde-dehydrogenase (ALDH) has been reported as potential breast cancer stem-like cells (BCSLCs) markers. Those cells are known to be involved with treatment resistance and may be responsible for relapses and metastatic dissemination. The association between the quantity of BCSLCs and the response to neoadjuvant chemotherapy (NACT) remains unclear. We retrospectively analyzed the expression of ALDH1A1 by immunohistochemistry (IHQ) in 61 patients with invasive ductal carcinomas of the breast from 2010 to 2012 previously analyzed by flow cytometry (FCT). Most patients were aged between 51-70 years (59%), clinical stage III (47,5%) and menopausal (65,6%). The ER, PgR and HER2 positive expression rates were 67,2%, 52,5% and 45,9%, respectively. The aldehyde-dehydrogenase immunohistochemistry were evaluated by TMA and considered to be positive cases with evident cytoplasmic staining in clusters of 5 or more cells. These data were correlated with the flow cytometry results and clinical and pathological features. No association between ALDH1+ cell population by FCT with ALDH1A1 positive (4,45% (1,7 – 10,1)) and negative (3,2% (1,2 – 13,6)) cases by IHQ were observed ($p = 0,67$). No relationship between ALDH1A1+ by IHQ nor ALDH1+ by FCT were found with the complete pathological response to therapy, suggesting that it might not be an isolated predictor of response to NACT. No relationship between IHQ was found with the clinical-pathological features. The overall survival was the same between the two groups by IHQ ($p = 0,54$; HR = 1,33 (0,52 – 3,39)) and also the disease free survival ($p = 0,35$; HR = 1,67 (0,57 – 4,90)). The FCT results did not correlate with the overall survival ($p = 0,40$; HR = 0,98 (0,92 – 1,03)), nor with the disease free survival ($p = 0,55$; HR = 0,98 (0,92 – 1,05)). The expression of ALDH1A1+ by immunohistochemistry have no association with the enzymatic function analyzed by flow cytometry and do not represent a prognostic factor.

Key words: Breast cancer, Stem Cell, Neoadjuvant chemotherapy, aldehyde-dehydrogenase

LISTA DE ABREVIACÕES

ALDH	Aldeído-desidrogenase
APC	Allophyco-cyanin
CD24	Proteína de adesão
CD44	Glicoproteína transmembrana
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CTT	Célula Tronco Tumoral
DEAB	Dietilaminobenzaldeído
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESA/Epcam	Epithelia Specific Antigen / Epithelial cell adhesion molecule
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HER2	Human Epidermal Grow Factor Recertor 2
IHQ	Imunohistoquímica
MTH	Mouse Tonic Hanks
RPC	Resposta patológica completa
PE	Phytocoerythrin
RE	Receptor de estrógeno
RH	Receptor hormonal
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumor
OCT	Optimum cutting temperature

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Células Tronco Tumorais	13
1.2 Células Tronco Tumorais no Câncer de Mama	15
2 OBJETIVO	22
3 PACIENTES E MÉTODOS	23
3.1 Seleção de pacientes	23
3.2 Características das pacientes	27
3.3 Técnica para obtenção das amostras.....	29
3.4 Grau histológico e Expressão de receptores hormonais e HER2	29
3.5 Digestão enzimática de amostras de tecidos para citometria de fluxo	30
3.6 Citometria de fluxo	30
3.6.1 Identificação das células tumorais no gráfico de dispersão.....	31
3.7 Imunohistoquímica	33
3.8 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	58
Apêndice 1 – Classificação Clínica TNM para Câncer de Mama.....	58
Apêndice 2 – Agrupamento dos Estádios Clínicos TNM.....	59

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais diagnosticada em mulheres em todo o mundo e a que mais causa morte por câncer. O principal fator relacionado com a morte pela doença é a disseminação metastática. Nos países desenvolvidos, a mortalidade vem diminuindo nas últimas três décadas como consequência da melhoria na detecção precoce e tratamentos mais efetivos (WHO 2003, Jemal, Siegel et al. 2010), mas permanece ainda como a segunda causa de morte por neoplasia maligna em mulheres. Apesar de apresentar bom prognóstico quando diagnosticado em estágio inicial, a mortalidade por câncer de mama continua elevada no Brasil. Desde o final da década de 90, um declínio nas taxas de mortalidade é observado nas principais capitais do Sul e Sudeste do país, seguindo a tendência observada em países desenvolvidos. Entretanto, nas demais regiões, principalmente Norte e Nordeste, as taxas de mortalidade tem aumentado, provavelmente pela dificuldade de acesso aos meios diagnósticos e terapêuticos nessas áreas (Szwarcwald, G. A. Silva, et al. 2017).

Essa é uma doença heterogênea e pode apresentar comportamentos biológicos distintos e respostas diferentes ao tratamento de acordo com a apresentação clínica, incluindo o tamanho do tumor e o estado linfonodal, as características histológicas, a expressão de receptores hormonais e da oncoproteína. Além disso, foram identificados perfis de expressão gênica intrínsecos às células neoplásicas que permitem melhor caracterização de diferentes subtipos de carcinomas mamários e permitem individualizar o tratamento buscando a melhor resposta (Sorlie, Perou et al. 2001, Sorlie, Tibshirani et al. 2003, Calza, Hall et al. 2006, Sorlie, Wang et al. 2006).

De acordo com o perfil molecular podemos classificar os carcinomas de mama em pelo menos 5 subtipos.: Luminais A, Luminais B, Basal-like, HER2 positivo e Normal-like. Os tumores Luminais A e B geralmente apresentam expressão positiva de receptores

hormonais (RH). Clinicamente, pacientes com tumores do subtipo Luminal A apresentam melhor prognóstico. Já os tumores Basal-like são geralmente triplo negativos e apresentam pior prognóstico com tempo de recidiva mais precoce que os Luminais (von Minckwitz, Untch et al. 2011). Em contraste ao prognóstico esperado, os tumores com expressão de receptores hormonais positivos tem pior resposta ao tratamento quimioterápico que os negativos (Razzak, Lin et al. 2008).

Mesmo se tratando de terapias-alvo, sabemos que cerca de 9 a 15% das pacientes com tumores que apresentam expressão positiva de receptores hormonais terão recidiva da doença em 5 anos de tratamento com terapia anti-estrogênica (Cuzick, Sestak et al. 2010). Em pacientes com tumores HER2 positivos, a utilização de terapia alvo-específica (trastuzumabe) na neoadjuvância falha em atingir resposta patológica completa (RPC) em mais da metade das pacientes (von Minckwitz, Untch et al. 2011).

Portanto, embora estes marcadores biológicos tenham sido descritos como fatores de prognóstico, os mecanismos pelos quais tumores de um mesmo subtipo apresentam comportamentos biológicos distintos ainda não foram elucidados. Ou seja, ainda existe uma baixa acurácia em termos de predição de resposta com os marcadores utilizados atualmente na prática clínica. (von Minckwitz, Untch et al. 2011). A heterogeneidade intrínseca do tumor com populações celulares distintas é uma hipótese aceitável para explicar a falha no tratamento da doença e a disseminação metastática. (Sorlie, Perou et al. 2001, Chen , Razzak, Lin et al. 2008).

1.1 Células Tronco Tumorais

É admitido que a heterogeneidade tumoral se dá a partir de uma linhagem celular que sofre mutações levando a células de características diversas dentro de um mesmo tumor, essa

linhagem inicial é conhecida como células tronco tumorais (CTT). A presença dessa população celular como aquelas responsáveis pela resistência ao tratamento, metástase e recorrência local do tumor primário tem sido investigada há décadas (Nowell 1976, Reya, Morrison et al. 2001, Al-Hajj, Wicha et al. 2003, Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2009). Inicialmente descrito na Leucemia, o modelo hierárquico da evolução das células tumorais considera que o tumor se desenvolve de forma semelhante ao tecido normal, com as células tronco tumorais no topo dessa hierarquia.

Nas décadas de 60 e 70, a observação de que células leucêmicas de uma mesma linhagem apresentavam uma cinética de proliferação diferente, foi a primeira prova da heterogeneidade tumoral. Algumas células apresentavam ciclo rápido e outras eram dormentes, com ciclo lento, sendo as últimas com cinética semelhante à das células tronco hematopoiéticas. Em seguida, estudos com anticorpos monoclonais direcionados a antígenos de diferenciação mielóide mostraram que células leucêmicas de uma mesma colônia podiam ser mais diferenciadas do que a célula individual que deu início a colônia, sendo a primeira forte evidência do modelo hierárquico da evolução tumoral. Estudos subsequentes com a “célula tronco leucêmica” demonstraram que ela era capaz de se manter por auto-renovação e de amadurecer para gerar uma progenitura sem propriedades de células tronco. Somente em meados dos anos 90, com o desenvolvimento da separação celular por citometria de fluxo é que foi possível isolar essa população celular e comprovar suas características de células tronco em modelos xenográficos (Dick, 2008).

No câncer de mama, as CTTs podem ser identificadas pela expressão de proteínas da membrana celular. A utilização de citometria de fluxo para a fenotipagem e caracterização desta população tem sido descrita por alguns autores. As células identificadas por imunofenotipagem como $ESA^+/CD44^+/CD24^-$ tem uma alta capacidade de iniciação e auto-renovação tumoral no carcinoma de mama, sugerindo sua capacidade de célula tronco. Em

modelos xenográficos apresentam maior capacidade de gerar tumor quando comparadas com outras populações celulares (Al-Hajj, Wicha et al. 2003, Valejo, Tiezzi et al. 2010).

A aldeído-desidrogenase 1 (ALDH1) é uma enzima que oxida o ácido retinóico em retinol. Essa via apresenta um papel importante no controle da auto-renovação ou diferenciação das CTTs. A atividade da ALDH1 tem se mostrado um melhor marcador de CTT no câncer de mama que a imunofenotipagem. Esta conclusão é baseada no fato de que um menor número de células com alta atividade de ALDH1 (ALDH1+) é necessária para induzir tumores em camundongos imunodeficientes quando comparado com os modelos xenográficos baseados na expressão de CD44 e CD24. A população celular de células tronco tumoral para esses estudos em modelos xenográficos foi isolada a partir da citometria de fluxo para células com alta atividade de ALDH1. (Ginestier, Dontu et al. 2007, Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2010, Croker and Allan 2012).

Portanto, esta subpopulação celular apresenta características de células tronco sendo capaz de se dividir de forma assimétrica para gerar outra célula tronco, assegurando a auto renovação e possibilidade de repovoar o hospedeiro com células tumorais de mesma origem; ou ainda gerar uma outra célula progenitora, permitindo a produção de células de fenótipos diversos na constituição do tumor. Apresenta ainda motilidade aumentada, maior capacidade de invasão e super-expressão de genes promotores de metástase (Velasco-Velazquez, Homsí et al. 2012).

1.2 Células Tronco Tumorais no Câncer de Mama

Postula-se que esta subpopulação celular seja resistente ao tratamento radio e quimioterápico sendo capaz de repovoar o tumor tratado levando a recorrência tumoral e sendo fonte de lesões metastáticas no câncer de mama (Figura 1). Conforme demonstrado em

experimentos *in vitro* e modelos xenográficos, existe um aumento da proporção dessa subpopulação celular nas amostras após o tratamento quimioterápico e radioterápico (Li, Lewis et al. 2008, Tanei, Morimoto et al. 2009, Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2010).

Figura 1: Papel das células tronco tumorais do câncer de mama (CTT) na progressão da doença. Uma pequena fração de CTTs dentro do tumor é mantida pela auto renovação das CTTs e pela “desdiferenciação” das células cancerígenas (A). As CTTs são mais resistentes a radiação e a quimioterapia do que as demais células tumorais e podem sobreviver ao tratamento (B). As CTTs que sobrevivem são capazes de repovoar o local do tumor levando a recorrência (C). Elas podem também ser a fonte da disseminação metastáticas (D). Adaptado de (Velasco-Velazquez, Homsí et al. 2012).

Alguns estudos avaliaram também as associações entre a presença de células ALDH1+ e a resposta ao tratamento neoadjuvante. A quimioterapia neoadjuvante tem sido empregada como tratamento inicial para pacientes com câncer de mama avançado com o objetivo de reduzir o volume tumoral tornando operáveis tumores inicialmente irressecáveis e melhorando

as taxas de cirurgia conservadora em tumores operáveis (Fisher, Brown et al. 1997, Beriwal, Schwartz et al. 2006). Sabe-se que a quimioterapia neoadjuvante não aumenta a sobrevida global ou a sobrevida livre de doença quando comparada a quimioterapia adjuvante. Entretanto, o maior benefício do tratamento citotóxico prévio a cirurgia é atingido quando as pacientes apresentam resposta patológica completa ao tratamento neoadjuvante. Este grupo de pacientes representa cerca de 30% dos casos (Fisher, Bryant et al. 1998, Abrial, Penault-Llorca et al. 2005, Andre, Mazouni et al. 2008).

Avaliando-se a resposta a quimioterapia neoadjuvante nos diferentes subtipos do câncer de mama, temos em pacientes HER2 positivo cerca de 30-50% que atingem resposta patológica completa quando submetidas a tratamento neoadjuvante associado a terapia-alvo - Trastuzumabe. Levando em conta a expressão de receptores hormonais, foi demonstrado que a taxa de resposta patológica completa ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante chega a 41% em pacientes com RH negativo / HER2 positivo e apenas 9% em pacientes RH positivo / HER2 negativo (Andre, Mazouni et al. 2008, von Minckwitz, Untch et al. 2011). Alguns estudos demonstraram que pacientes com tumores indiferenciados ou com expressão negativa de receptores hormonais e de proteína HER2 (triplo negativos) ou aqueles com amplificação do HER2 apresentam maiores taxas de resposta patológica completa ao tratamento neoadjuvante com ganho de sobrevida nessas pacientes (Andre, Mazouni et al. 2008, Osako, Horii et al. 2010). Pode-se observar que o fator determinante da sensibilidade do tumor à quimioterapia ainda é desconhecido. A resposta patológica completa é um poderoso fator prognóstico tanto quanto ao tempo livre de doença como de sobrevida global. Entretanto, não é possível prever a resposta a quimioterapia neoadjuvante, mesmo com a utilização de técnicas avançadas de biologia molecular. Dentro dos subtipos separados pela assinatura genética é possível encontrar comportamentos tumorais distintos e inesperados para o mesmo grupo de pacientes (van 't Veer, Dai et al. 2002, van de Vijver, He et al. 2002, Chang, Wooten

et al. 2003, Huang, Cheng et al. 2003, Sotiriou, Neo et al. 2003, Ayers, Symmans et al. 2004, Osako, Horii et al. 2010).

Apesar dos avanços no conhecimento sobre a heterogeneidade do câncer de mama e no tratamento sistêmico da doença, a maioria das pacientes submetidas a terapia neoadjuvante permanece com doença residual no momento da cirurgia. A resistência inata ou adquirida aos agentes citotóxicos ainda é muito comum e de causa desconhecida. Identificar previamente um grupo de pacientes que mais se beneficiariam da terapia neoadjuvante pode aumentar a eficácia do tratamento nesse grupo de pacientes melhor selecionadas e reduzir custos de tratamento, bem como evitar efeitos tóxicos adversos no grupo de pacientes com baixa probabilidade de resposta (Bertucci, Nasser et al. 2002, Bertucci, Finetti et al. 2004, Osako, Horii et al. 2010).

Buscando identificar o grupo de pacientes com maior probabilidade de resposta patológica completa e considerando que as CTTs podem ser as responsáveis pela presença de tumor residual, estudos foram conduzidos buscando relacionar a presença de células ALDH1+ com a resposta a quimioterapia neoadjuvante. Estes estudos utilizaram a imunohistoquímica como método de identificação de CTTs. Os resultados encontrados nestes estudos foram conflitantes. Tanei e cols. (2009) observaram que pacientes com tumores com alta porcentagem de células ALDH1+ apresentam menor taxa de resposta patológica completa – definida como ausência de neoplasia invasora após o tratamento quimioterápico neoadjuvante. Adicionalmente, eles observaram um aumento da população de células ALDH1+ nos tumores que não apresentam resposta patológica completa (Tanei, Morimoto et al. 2009). Entretanto, em outro estudo, a taxa de resposta patológica completa foi maior no grupo de pacientes identificadas como portadoras de tumores positivos para a presença de células ALDH1+ (Lee, Kim et al. 2011). Tiezzi e cols. (2013) demonstraram que a presença de células ALDH+ no tumor residual após quimioterapia neoadjuvante em tumores localmente

avancados é um fator independente de pior prognóstico. Entretanto, não encontraram diferenças nas taxas de resposta patológica completa entre os grupos de pacientes consideradas portadoras de tumores com expressão positiva ou negativa para células ALDH+ (Tiezzi, Clagnan et al. 2013).

Já foi demonstrado também uma relação da população ALDH1+ com tumores sabidamente de pior prognóstico identificados pelas características biológicas já bem estabelecidas como os HER2 positivos, triplo-negativos, com extenso comprometimento linfonodal e o carcinoma inflamatório (Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2010, Resetkova, Reis-Filho et al. 2010, Reuben, Lee et al. 2011). Estes dados reforçam a hipótese de que a quantidade de CTTs pode ser modulada por interferências no microambiente tumoral (Resetkova, Reis-Filho et al. 2010). Existe ainda a possibilidade dessas células apresentarem características diferentes dentro dos subtipos moleculares de câncer de mama. As CTTs isoladas de uma linhagem celular triplo negativa apresentaram boa resposta ao tratamento radioterápico em modelos xenográficos, apresentando inclusive redução na sua capacidade funcional de gerar novo tumor. Enquanto as CTTs isoladas de uma linhagem celular com receptores hormonais positivos e HER2 negativo apresentaram resistência ao tratamento radioterápico (Zielske, Spalding et al. 2011).

Em conjunto, todas essas observações sugerem que o método de identificação ou quantificação de CTTs permanece ainda incerto. A utilização da imunohistoquímica para células ALDH1+ para identificação das CTTs pode representar uma população celular diferente daquela população celular com alta atividade da enzima que foi identificada com características de células tronco quando isolada por citometria de fluxo. Isso porque a imunohistoquímica identifica a proteína expressa apenas no momento da fixação e isso pode não representar a real atividade da enzima naquela célula *in vivo*, que pode ser avaliada pela citometria de fluxo.

A citometria de fluxo permite identificar linhagens celulares de acordo com parâmetros físicos, químicos e biológicos. As células vivas em suspensão atravessam uma-a-uma um túnel com feixe de luz (laser) perpendicular que atinge as células. Alinhado a esse feixe há um detector que avalia a dimensão da célula e detectores laterais avaliam a complexidade celular como a forma da membrana, núcleo e grânulos citoplasmáticos. Com o uso de corantes químicos fluorescentes, é possível ainda utilizar anticorpos específicos marcados que emitem diferentes frequências de luz em contato com o laser permitindo a contagem dessas células marcadas.

A avaliação pela citometria de fluxo com o uso do kit comercial ALDEFLUOR® permite avaliação da atividade enzimática da ALDH1 (Ginestier, Dontu et al. 2007). O Aldefluor® (Aldagen®) é um substrato para a enzima aldeído-desidrogenase com livre difusão para o espaço intracelular. Ao ser degradado libera uma fluorescência que pode ser detectada com laser íon argônio de 488nm e filtro de fluorescência de 515-454 nm. Dessa forma, a marcação ocorre somente nas células viáveis com alta atividade da enzima ALDH.1

A Imunohistoquímica para ALDH1 utiliza o anticorpo anti-ALDH1A1 com marcação citoplasmática das células com expressão de ALDH1A1. Diversos métodos foram descritos para considerar um tumor como ALDH1 positivo pela imunohistoquímica. Métodos semi-quantitativos em que se considera a porcentagem de células marcadas ou com o cálculo do *Quick Score* que considera a porcentagem de células marcadas e a intensidade de marcação (Ginestier, Dontu et al. 2007, Tanei, Morimoto et al. 2009, Ginestier et al. 2010), ou ainda um método qualitativo, no qual é considerado que existe aumento da expressão de ALDH1 nas células tumorais quando é encontrado agrupamento de no mínimo 5 células marcadas para excluir possíveis resultados falso-positivos pela marcação de macrófagos isolados (Tiezzi, Clagnan et al.2013).

Como as CTTs vem sendo associadas a resistência ao tratamento radio e quimioterápico, identificar, caracterizar e quantificar a presença de CTTs no tumor primário pode ser um método efetivo de predição de resposta ao tratamento do câncer de mama. Nosso grupo de pesquisa avaliou a expressão de ALDH1 no tumor primário por citometria de fluxo e não encontrou relação com resposta ao tratamento neoadjuvante (Mandarano 2013). É necessário, portanto, determinar se a avaliação da expressão de ALDH1 por imunohistoquímica corresponde aos resultados obtidos pela avaliação da atividade da enzima por citometria de fluxo nas amostras de tumor primário.

É possível considerar a possibilidade de que uma célula com baixa atividade da ALDH1 *in vivo* apresente resultado positivo dependendo do momento da fixação para a imunohistoquímica ou que uma célula com alta atividade da enzima apresente um resultado negativo na imunohistoquímica pelo mesmo motivo. Além disso, a célula identificada por imunohistoquímica apresenta maior dificuldade para ser isolada e estudada separadamente, enquanto a célula identificada pela citometria de fluxo pode ser separada no momento da identificação. Assim, estudar essas metodologias conjuntamente pode ser elucidativo para o entendimento da relação entre a presença de CTTs e a resposta ao tratamento do câncer de mama, e pode trazer resposta aos resultados conflitantes da literatura.

2 OBJETIVO

1. Comparar a expressão de ALDH1A1 por imunohistoquímica com os resultados da atividade de ALDH1 pela citometria de fluxo;
2. Avaliar a associação da expressão de ALDH1A1 por imunohistoquímica no tumor primário com a resposta patológica completa ao tratamento neoadjuvante;
3. Avaliar a relação das células ALDH1+ por imunohistoquímica e por citometria de fluxo com fatores prognósticos.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Seleção de pacientes

Foram selecionadas retrospectivamente 65 pacientes com diagnóstico histológico de Carcinoma Ductal Invasivo da mama atendidas na Divisão de Mastologia e Oncologia Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) com diagnóstico confirmado de dezembro de 2010 a outubro de 2012. Foram selecionadas as pacientes participantes de estudos prévios do nosso grupo com amostras do tumor primário analisadas por citometria de fluxo para avaliação da atividade da ALDH1 (Valejo 2012, Mandarano 2013).

Foram incluídas 61 pacientes para análise por imunohistoquímica e excluídos 4 casos em que não foi possível recuperar os blocos de parafina do tumor inicial. Das pacientes incluídas, 3 pacientes apresentavam estágio I, 17 estágio II, 29 estágio III e 12 pacientes estágio IV. Todos os 41 tumores localmente avançados ou metastáticos foram submetidas a tratamento neoadjuvante/paliativo de acordo com o protocolo: 4 pacientes receberam 6 ciclos de FEC (5-Fluoracil 600mg/m^2 + Epirrubicina 75 mg/m^2 + Ciclofosfamida 600 mg/m^2); e as outras 36 pacientes 8 ciclos de EC-T (4 ciclos de Epirrubicina 75 mg/m^2 + Ciclofosfamida 600 mg/m^2 seguidos de 4 ciclos de Docetaxel 100 mg/m^2), sendo que todas as pacientes com superexpressão de HER2 receberam Trastuzumabe 6mg/kg concomitante com os últimos 4 ciclos da quimioterapia. Uma paciente recebeu Letrozol $2,5\text{mg}$ via oral paliativo por 8 meses prévios a cirurgia.

Durante o seguimento clínico ambulatorial, as pacientes foram avaliadas quanto a resposta clínica a quimioterapia em cada ciclo de acordo com os critérios do RECIST 1.1:

I) resposta completa, consistindo de ausência clínica de neoplasia residual;

II) resposta parcial, consistindo de pelo menos 30% de diminuição na soma dos diâmetros da lesão;

III) progressão da doença, quando aumento de pelo menos 20% na soma dos diâmetros da lesão,

IV) doença estável, quando o tumor não apresentou diminuição suficiente para caracterizar como resposta parcial ou aumento suficiente para caracterizar como progressão da doença (Eisenhauer, Therasse et al. 2009).

A quimioterapia foi interrompida em uma paciente após 4 ciclos por neutropenia persistente e em uma paciente com progressão de doença após o quinto ciclo, sendo o tumor operável com cirurgia radical da mama. Ambas as pacientes foram submetidas a mastectomia. Foi utilizada segunda linha de quimioterapia em um caso com progressão de doença e tumor inoperável mesmo com cirurgia radical da mama. O esquema quimioterápico de segunda linha empregado foi 4 ciclos de Docetaxel $75\text{mg}/\text{m}^2$ + Epirrubicina $50\text{ mg}/\text{m}^2$.

No total, 58 pacientes foram submetidas a intervenção cirúrgica da mama sendo 38 mastectomias e 20 cirurgias conservadoras; 48 linfadenectomias axilares ipsilateral e 10 biópsias de linfonodo sentinela. Nos casos de cirurgia após tratamento neoadjuvante, a peça cirúrgica foi avaliada quanto a presença ou ausência de neoplasia invasora residual na mama e nos linfonodos axilares. A paciente que apresentou resposta clínica completa e se recusou a ser submetidas a cirurgia na mama foi incluída para fins de análise dos demais parâmetros, com exceção da resposta patológica. Foi definido como resposta patológica completa a ausência de neoplasia invasora na mama, já que a amostragem inicial foi feita apenas no tumor mamário (Figura 2).

Como tratamento adjuvante, todas as pacientes com cirurgia conservadora da mama foram submetidas a radioterapia do parênquima mamário, como também as submetidas a mastectomia com neoplasia invasora maior que 5 cm na peça cirúrgica, 4 ou mais linfonodos

axilares comprometidos e tumores estágio T4 inicial, num total de 48 pacientes. Os casos com expressão de receptores hormonais receberam hormonioterapia adjuvante, sendo 34 casos com Tamoxifeno 20 mg/dia, 2 casos com Exemestano 1mg/dia e 2 casos com Letrozol 2,5.

A quimioterapia adjuvante foi indicada em 25 pacientes e 8 pacientes continuaram com quimioterapia paliativa após o procedimento cirúrgico. Nessas, os esquemas empregados foram: 6 casos com Trastuzumabe paliativo, um caso com Docetaxel 100 mg/m² paliativo e um caso com Paclitaxel 80 mg/m² semanal paliativo. Como adjuvância foram um caso de Docetaxel, um caso com EC, dois casos com EC-T, dois com EC-TH, cinco com FEC e 13 casos com Trastuzumabe, de acordo com o protocolo do serviço.

As pacientes mantiveram seguimento ambulatorial após a cirurgia com avaliações regulares do estado clínico geral e avaliação radiológica das mamas, com consultas programadas e livre acesso ao serviço no caso de novas queixas. A investigação de progressão de doença foi feita sempre que houvesse suspeita clínica de recidiva local ou sistêmica e confirmada por exames de imagem ou biópsia quando possível.

Figura 2: Critérios de inclusão e exclusão. Esquemas de quimioterapia: EC-T: Epirrubicina + Ciclofosfamida seguido de Docitaxel; EC-TH: Epirrubicina + Ciclofosfamida seguida de Docitaxel + Trastuzumabe; FEC: 5-Fluoracil + Epirrubicina + Cilofosfamida; EC: Epirrubicina + Cilofosfamida; TE: Docitaxel + Epirrubicina.

3.2 Características das pacientes

A idade média das pacientes foi de 53,9 anos com a mínima de 27 anos e a máxima de 85 anos, 21 estavam na pré-menopausa (34,4%) e a maioria apresentavam estágio clínico III (47,5%) segundo o Estadiamento TNM da *Union International Cancer Control*. O grau histológico do tumor primário foi I em 14,7% dos casos, grau II em 62,3% e grau III em 23%. A expressão dos receptores foi positiva para estrógeno em 67,2% das amostras, positiva para progesterona em 52,5% e com super-expressão de HER2 em 45,9% das amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Características das pacientes com câncer de mama estudadas.

	Total (N=61)	%
Idade (anos)		
<40	7	11,5
40-50	13	21,3
51-70	36	59,0
>70	5	8,2
Menopausa		
Sim	40	65,6
Não	21	34,4
Tumor primário (T)^a		
1	6	9,8
2	18	29,5
3	16	26,3
4b	15	24,6
4d	6	9,8
Linfonodos regionais (N)^a		
0	15	24,6
1	24	39,3
2	20	32,8
3	2	3,3
Metástase a distância (M)^a		
0	49	80,3
1	12	19,7
Estadio Clínico (EC)^a		
I	3	4,9
II	17	27,9
III	29	47,5
IV	12	19,7
Grau Histológico^b		
I	9	14,7
II	38	62,3
III	14	23,0
Receptor de Estrógeno (RE)		
Positivo	41	67,2
Negativo	20	32,8
Receptor de Progesterona (RP)		
Positivo	32	52,5
Negativo	29	47,5
HER2		
Positivo	28	45,9
Negativo	33	54,1

^a Estadiamento TNM segundo Union International Cancer Control – 7^a. Edição 2011^b Classificação de Nottingham do Sistema Bloom e Richardson

3.3 Técnica para obtenção das amostras

As amostras tumorais foram obtidas em 42 casos por biópsia percutânea com agulhas de 12g x 10cm que são realizadas rotineiramente no serviço, guiadas por ultrassom no Centro de Diagnóstico por Imagem do HCFMRP-USP. Em 17 pacientes foi necessária a realização de biópsia incisional para confirmação diagnóstico e em dois casos as amostras foram obtidas de fragmentos do tumor primário na peça cirúrgica. Foram coletadas 2 amostras, uma colocada em formol a 10% que foi posteriormente processada em parafina para confirmação do diagnóstico histológico, graduação histológica e imunohistoquímica. Esses blocos foram recuperados para realização da imunohistoquímica. A outra amostra foi 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) possibilitando a extração futura 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.

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 visita da paciente ao ambulatório de mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP, aprovado pela comissão de ética deste hospital sob nº 2467/09.

3.4 Grau histológico e Expressão de receptores hormonais e HER2

A análise da biópsia e da peça cirúrgica foi realizada no laboratório do Serviço de Patologia Clínica do HCFMRP-USP. O grau histológico foi analisado segundo a classificação de Nottingham do Sistema Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis de 1 a 3. Os receptores

hormonais de estrógeno (RE), progesterona (RP) e a superexpressão de HER2 foram analisados por imunohistoquímica segundo recomendação da *American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists* (2010) e considerados positivos para RE e RP os casos com 1% ou mais de células marcadas e para o HER2 foi considerado positivo escore igual a 3 (10% ou mais das células evidenciando marcação forte e completa da membrana) ou quando positivo por Chromogenic *in situ* hybridization (CISH), que identifica a amplificação gênica.

3.5 Digestão enzimática de amostras de tecidos para citometria de fluxo

As amostras foram obtidas à fresco e o tumor dissecado e triturado finamente com lâmina de bisturi sobre uma placa de Petri sobre o gelo em meio Mouse Tonic Hanks (MTH). Os fragmentos foram transferidos para um tubo eppendorf com 100µl de solução de 1mg/ml de Colagenase tipo IV e completado com MTH para 1 ml de volume total e depois incubados em agitador à 37°C por 2 hora. Após a digestão, a suspensão de células foi filtrada (Filtro MESH 70µm – BD Biosciences®) em um tubo Falcon® (BD Biosciences®) 50ml e lavada 2 vezes com MTH. Posteriormente as células foram sedimentadas por centrifugação a 1100 rpm à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 500µl de Aldefluor Assay Buffer®. O número total de células vivas foi estimado em um hemacitômetro em solução de azul de tripan 0,2% e a amostra foi ajustada na concentração 1×10^6 células / ml usando Aldefluor Assay Buffer®.

3.6 Citometria de fluxo

Para caracterização e separação por citometria de fluxo das células com alta atividade da aldeído-desidrogenase foi utilizado o kit comercial Aldefluor® (Aldagen®). Os tubos com

a amostra de células eram marcados como “teste” com 1,0 ml da suspensão ajustada. Um tubo marcado como “controle” foi feito com 5 µl de solução DEAB (dietilaminobenzaldeído). Foi adicionado 5 µl de ALDEFLUOR por mililitro de amostra nos tubos testes, misturado e imediatamente transferido 0,5 ml de cada tubo “teste” para o tubo “controle”. Ambos os tubos foram incubados de 30 a 60 minutos a 37°C e centrifugados por 5 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 500µl de Aldefluor Assay Buffer®.

Foi seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante associado com a fenotipagem de cada anticorpo marcado com o respectivo fluorocromo. O anticorpo anti-ESA (EpCam) conjugado com PE para células epiteliais e excluindo as células de linhagens hematopoiéticas com o coquetel Anti-Lin (LIN FITC - BD Pharmingen, San Jose, CA, USA - cat.340546) conjugado com APC. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS, e centrifugadas a 1.100 rpm por 10 minutos.

As células foram adquiridas em FACSaria II (BD Biosciences, San Jose, CA) e as análises foram feitas usando o software FlowJo (Treestar, USA). As células Lin-/ESA+/Aldefluor+ foram identificadas na citometria de fluxo e quantificadas em relação a porcentagem total de células mamárias tumorais.

3.6.1 Identificação das células tumorais no 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 3).

Figura 3: 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 avaliarmos 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, considerando a população de células tumorais, pudemos identificar graficamente apenas as células ESA positivas utilizando a marcação com anticorpo anti-ESA (EpCam) conjugado com PE, 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. Realizamos então uma análise conjunta com Aldefluor®, buscando identificar em cada amostra a porcentagem de células ALDH1+.

Foi feita uma análise do grupo controle com DEAB, um inibidor da ALDH1, que permite avaliar a marcação que não se relaciona com a atividade da enzima. Deste modo, foi realizada uma seleção (janela) das células ESA positivas e nestas células cruzamos as informações do Aldefluor®, conforme pode ser visto na Figura 4.

Figura 4: Gráfico tipo “dot plots” com a distribuição da população celular na citometria de fluxo. A) padrão das células na amostra tumoral com separação das células não linfócitos; B) amostra controle sem anticorpo ESA (EpCam) e com Aldefluor® em conjunto com DEAB; C) amostra teste com anticorpo ESA e sem DEAB para definir população ALDH1+ESA+ em destaque.

3.7 Imunohistoquímica

Os blocos de parafinas foram recuperados da amostra que foi realizada a citometria de fluxo (tumor inicial). As amostras foram preparadas em TMA (tissue microarray) com agulha de 1,5mm. Os blocos de TMA foram cortados com 3 mm de espessura e os cortes foram desparafinizados em xylol e reidratados em álcool com diversas diluições e colocado em tampão citrato (pH 6,0). A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos. O anticorpo ALDH1A1 (1:100, ALDH1A1; BD, Franklin Lakes, NJ) foi encubado por uma noite em temperatura ambiente. A coloração imunohistoquímica foi realizada com o sistema de amplificação Mach4 Universal Polymer Detection System (Biocare, Concord, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. Amostras de fígado foram

utilizadas como controle positivo da coloração. O ALDH1A1 estava presente no citoplasma e foi considerado positivo os casos com marcação evidente em arranjos de 5 ou mais células agrupadas (Figura 5) (Tiezzi, Clagnan et al. 2013). Células isoladas não foram consideradas positivas pela possibilidade de marcação de macrófagos.

Figura 5. Imunohistoquímica para expressão de ALDH1A1 no câncer de mama. (A) Amostra por TMA com coloração focal positiva. (B) Exemplo de marcação forte, evidenciando que na presença de aglomerados de 5 ou mais células coradas a amostra foi considerada como positiva. Células isoladas coradas não foram consideradas. (C) Coloração focal positiva em amostra por TMA (10x). (D) Maior aumento da amostra C, evidenciando coloração de células neoplásicas com intensidades moderada / forte (40x).

3.8 Análise estatística

O teste de Mann–Whitney U, Kruskal–Wallis e o teste Exato de Fisher foram utilizados para as análises estatísticas. A associação da expressão de ALDH1A1 por imunohistoquímica com as outras variáveis nominais (status menopausal, status axilar, RE, RP e expressão da proteína HER2, estágio patológico e grau histológico) foram avaliadas usando o teste Exato de Fisher. Comparações da porcentagem de células ALDH1+ dentro do tumor e as diversas variáveis foram feitas pelo teste de Mann-Whitney (2 variáveis) ou teste de Kruskal-Wallis (mais de 2 variáveis).

Para cálculo da sobrevida global foi considerado o intervalo da data do diagnóstico até o óbito ou o último atendimento registrado da paciente viva. Para a sobrevida livre de doença foi considerada a data da cirurgia até o primeiro evento confirmado de recidiva local ou sistêmica, ou a data do último atendimento registrado sem recidiva. As curvas de sobrevida foram feitas com o gráfico de Kaplan-Meier e a comparadas pelo teste Log-rank. A influência dos fatores prognósticos na sobrevida foi calculada por análise univariada e multivariada com o modelo de risco proporcional de Cox. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$. Foi usado o software RStudio, Versão 0.99.903 – © 2009-2016.

4 RESULTADOS

Nas amostras de tumor primário analisadas por imunohistoquímica, foram encontradas 45 (73,8%) com marcação negativa e 16 (26,2%) com marcação positiva para expressão da proteína ALDH1A1. Nas amostras positivas para ALDH1A1 na imunohistoquímica, a porcentagem de células consideradas ALDH1+ na citometria de fluxo foi de 4,4% (0,7% – 10,1%). Nas amostras negativas para ALDH1A1 a porcentagem de células positivas na citometria de fluxo foi de 3,2% (1,2% - 13,6%) com $p = 0,7$. A Figura 6 resume a distribuição da porcentagem de células ALDH1A1+ nas duas situações de imunohistoquímica.

Figura 6. Avaliação da porcentagem de células ALDH1+ na citometria de fluxo de acordo com a expressão da proteína ALDH1A1 por imunohistoquímica do tumor primário.

Um total de 37 pacientes foram submetidas a tratamento neoadjuvante ou paliativo seguido de cirurgia na mama, 2 pacientes não foram submetidas a cirurgia por progressão de doença durante a quimioterapia e foram consideradas como ausência de resposta patológica completa. A análise da expressão da proteína ALDH1A1 por imunohistoquímica das pacientes que receberam quimioterapia prévia a cirurgia, conforme demonstrado na Tabela 2, identificou 27 pacientes ALDH1A1 negativo. Dessas, 3 (11,1%) pacientes apresentaram

resposta patológica completa e 24 (88,9%) apresentavam neoplasia invasora residual na mama. Enquanto nas 12 pacientes com expressão positiva de ALDH1A1, 3 (25,0%) pacientes apresentaram resposta patológica completa e 9 (75,0%) tiveram tumor residual na peça cirúrgica ($p = 0,5$). Fazendo a análise da porcentagem de células tumorais ALDH1+ avaliada por citometria de fluxo nas pacientes com e sem resposta patológica completa, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo a mediana de 1,5% (0,7 – 2,9) e 2,2% (1,1 – 7,7) respectivamente ($p = 0,3$).

Tabela 2. Avaliação dos tumores ALDH1A1+ por imunohistoquímica com a resposta pós-quimioterapia neoadjuvante.

	Resposta Patológica Completa ^a		<i>p</i>
	Sim	Não	
Imunohistoquímica ALDH1A1			
Negativo (n = 27)	3 (11,1%)	24 (88,9%)	0,5
Positivo (n = 12)	3 (25,0%)	9 (75,0%)	
% Células ALDH1+ (AIQ)	1,5 (0,7 – 2,9)	2,2 (1,1-7,7)	0,3

^aAusência de carcinoma invasor em peças de tumorectomia oncológica ou mastectomia
AIQ: Amplitude interquartil (25%, 75%)

Quando analisamos a relação da expressão de ALDH1A1 pela imunohistoquímica com a sobrevida (figura 7), temos a sobrevida global em 60 meses do grupo ALDH1A1 positivo de 59,3% (DP = 14,5%) e no grupo ALDH negativo de 67,5% (DP = 7,2%), com $p = 0,5$ e HR = 1,3 (0,5 – 3,4). A sobrevida livre de doença em 60 meses no grupo ALDH1A1 positivo foi de 56,1% (DP = 15,5%) e no grupo ALDH1A1 negativo foi de 75,7% (DP = 7,5%), com $p = 0,3$ e HR = 1,7 (0,6 – 4,9). Conforme demonstrado na tabela 3, a porcentagem de células ALDH1+ não teve impacto sobre a sobrevida global ($p = 0,4$; HR = 1,0 (0,9 – 1,0)), nem na sobrevida livre de doença ($p = 0,5$; HR = 1,0 (0,9 – 1,0)).

Figura 7. Relação da expressão de ALDH1A1 por imunohistoquímica do tumor primário com o prognóstico do câncer de mama. Sobrevida Global em 60 meses: $p = 0,5$; HR = 1,3 (0,5 – 3,4). Sobrevida Livre de doença em 60 meses: $p = 0,3$; HR = 1,7 (0,6 – 4,9).

Tabela 3. Relação da porcentagem de células ALDH1+ com a sobrevida global e livre de doença

	HR	Limite inf.	Limite sup.	<i>p</i>
Sobrevida Global	1,0	0,9	1,0	0,4
Sobrevida Livre de Doença	1,0	0,9	1,0	0,5

Na análise univariada dos fatores prognósticos conhecidos (tabela 4), o estágio clínico e o grau histológico estão associados com pior prognóstico ($p = 0,01$ e $p = 0,07$, respectivamente) nessa população. Na tabela 5 observamos que na análise multivariada apenas o estágio clínico mostrou impacto na sobrevida global ($p = 0,04$ para o estágio IV).

Tabela 4. Relação dos fatores prognósticos com a sobrevida global

	Sobrevida Global			
	HR	Limite inf.	Limite sup.	P
Idade	1,0	0,9	1,0	0,3
Receptor de Estrógeno Positivo	0,7	0,3	1,5	0,3
Receptor de Progesterona Positivo	0,8	0,3	1,8	0,6
HER2 Positivo	1,3	0,6	2,8	0,6
Grau Histológico ^a				
II	6,6	0,9	49,9	0,07
III	4,5	0,5	40,6	0,2
Estadio Clínico ^b				
III	1,4	0,4	4,6	0,5
IV	4,8	1,4	15,5	0,01

^a Classificação de Nottingham do Sistema Bloom e Richardson

^b Estadiamento TNM segundo Union International Cancer Control – 7^a. Edição 2011

Tabela 5. Análise multivariada dos fatores prognósticos com impacto na sobrevida global.

	HR	Limite inf.	Limite sup.	p
EC III	1.44	0.44	4.70	0.54
EC IV	3.82	1.07	13.70	0.04
Grau II	4.42	0.56	34.99	0.16
Grau III	4.19	0.46	38.01	0.20

EC: Estadio Clínico; Grau: Grau histológico

Com relação a expressão de ALDH1A1 pela imunohistoquímica com os parâmetros clínicos e as características biológicas (estágio clínico, grau histológico, receptores de estrógeno e progesterona e HER2), não foi encontrada diferença estatística entre os grupos (tabela 6).

Na avaliação da porcentagem de células ALDH1+ pela citometria de fluxo, foi encontrado diferença estatística quanto aos seguintes parâmetros: grau histológico, com uma mediana de 9,7% (7,8 – 11,3) de células ALDH1+ no grau I, de 2,3% (1,0 – 9,4) no grau II e de 3,4% (0,6 – 13,7) no grau III ($p = 0,04$). Entre as pacientes na pré-menopausa, a mediana de células ALDH1+ na citometria foi de 1,3% (0,7 – 5,0) e de 6,2% (1,9 – 11,9) nas pacientes na menopausa ($p = 0,04$). Avaliando-se pelo estágio clínico, encontramos a mediana da porcentagem de células ALDH1+ de 19,9% (11,6 – 23,0) no estágio I, de 10,9% (2,3 – 18,6) no estágio II, de 2,3% (0,7 – 5,0) no estágio III e de 2,1% (1,2 – 10,5) no estágio IV ($p = 0,02$).

Quanto as demais características clínicas e biológicas (figura 8), a expressão de receptores hormonais e de HER2 apresentou mediana de 3,6% (1,2 – 5,9) de células ALDH1+ nos tumores RE negativos e de 3,2% (1,1 – 11,3) nos RE positivos ($p = 0,4$); 4,5% (1,3 – 10,4) nos RP negativos e 2,9% (0,98 – 10,6) nos RP positivos ($p = 0,9$); nos HER2 negativos de 3,2% (1,1 – 15,4) e nos HER2 positivos de 3,65% (1,13 – 8,88) ($p = 0,5$).

Tabela 6. Análise das amostras ALDH1A1 positivas e negativas na imunohistoquímica em relação as características clínicas e biológicas do tumor.

	ALDH1A1 Negativo (n = 45)	ALDH1A1 Positivo (n = 16)	<i>p</i>
Menopausa			
Não	16	5	1,0
Sim	29	11	
Idade			
≤ 40	6	2	0,9
41 – 50	8	4	
51 – 70	27	9	
>70	4	1	
Receptor de Estrógeno			
Negativo	12	8	0,2
Positivo	33	8	
Receptor de Progesterona			
Negativo	19	10	0,3
Positiva	26	6	
HER2			
Negativo	26	7	0,5
Positivo	19	9	
Grau Histológico^a			
I	6	3	0,5
II	30	8	
III	9	5	
Estadio Clínico (EC)^b			
I	3	0	0,3
II	12	5	
III	19	10	
IV	11	1	

^a Classificação de Nottingham do Sistema Bloom e Richardson

^b Estadiamento TNM segundo Union International Cancer Control – 7^a. Edição 2011

Figura 8. Correlação da porcentagem de células ALDH1+ por citometria de fluxo do tumor primário com características clínicas e biológicas do tumor.

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea e com prognóstico adverso. Caracteriza-se por uma diversidade clínica, morfológica e biológica intrínseca à neoplasia sendo influenciada pela integração com o microambiente tumoral e o sistema imune do portador. Atualmente, mesmo com os grandes avanços em biologia molecular e celular, não é possível relacioná-los claramente com a resposta ao tratamento ou com o prognóstico da doença. A utilização de terapia alvo-específica com Trastuzumabe na neoadjuvância em pacientes com alta expressão de HER2 apresenta taxas de resposta patológica completa da ordem de 40% (von Minckwitz, Untch et al. 2011, Reyat, Hamy-Petit et al. 2016). A utilização do perfil molecular baseado na análise do transcriptoma para a subclassificação dos carcinomas de mama também falha em prever risco de recorrência e resposta ao tratamento. O risco de metástase para tumores Luminal A é baixo porém mantido com o tempo, enquanto nos Luminais B há um aumento do risco a curto prazo. Nos triplo-negativos e HER2 o risco de metástase é alto e precoce e nos tumores Luminal B com HER2+ e HER2 puros observa-se um segundo pico tardio de risco para recorrência a distância chegando até 13% de risco de metástase em 10 anos. (Kim, Lim et al. 2017). Isso demonstra que a falha do tratamento ainda é relevante e é necessário individualizar ainda mais o tratamento sistêmico mesmo dentro dos subtipos moleculares.

A presença de células iniciadoras de tumor em neoplasias malignas sólidas surgiu como uma hipótese alternativa para a causa da falha no tratamento e recorrência do câncer, explicando a diferença do comportamento tumoral dentro de um mesmo subgrupo. É uma subpopulação de células cancerígenas com algumas características semelhantes as células tronco (incluindo capacidade de auto-renovação, de divisão assimétrica e produção de células fenotipicamente diversas), com maior probabilidade de sofrerem transformação epitélio-

mesênquima e com alta capacidade de reparo do DNA. Se mostraram resistentes ao tratamento radio e quimioterápico, sendo a sua identificação uma importante ferramenta prognóstica e terapêutica (Carrasco, Rodriguez-Serrano et al. 2014, Qiu, Bu et al. 2014).

A ALDH1 é uma enzima que oxida o ácido retinóico em retinol, uma via que apresenta um importante papel no controle da auto-renovação ou diferenciação celular. Células ALDH1 positivas têm sido mostradas como um fator importante para a resistência ao tratamento bem como a recorrência e disseminação metastática (Li, Lewis et al. 2008, Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2010). As células de linhagem celular que expressam ALDH1 isoladas por citometria de fluxo, foram descritas como capazes de induzir a formação de tumor quando injetada em camundongos. 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 (Ginestier, Dontu et al. 2007).

Alguns estudos mostraram controversa associação entre a presença de células ALDH1+ identificadas por imunohistoquímica e as características clínicas e patológicas. É descrito na literatura a associação dessas células com condições clínicas desfavoráveis como o comprometimento linfonodal extenso e super-expressão de HER2 (Resetskova, Reis-Filho et al. 2010, Reuben, Lee et al. 2011, Sarkar, Basu et al. 2018). Existe também uma associação dos carcinomas inflamatórios com a alta atividade da ALDH1 (Charafe-Jauffret, Ginestier et al. 2010). O carcinoma inflamatório 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 ao da população geral das pacientes com essa patologia. Foi demonstrado que células com alta atividade de ALDH1 isoladas por citometria de fluxo estão presentes em modelos xenográficos de carcinoma inflamatório e são mediadoras da agressividade nesses tumores. Também foram avaliadas pacientes com carcinoma inflamatório e demonstrado que a tumores com expressão de ALDH1 na imunohistoquímica apresentaram metástase mais precoce e prejuízo na

sobrevida global. Os autores entenderam que a atividade da ALDH1 é o primeiro fator prognóstico isolado neste grupo de tumores. Esses dados corroboram com a hipótese de que a alta atividade da ALDH confere características de pior prognóstico ao tumor (Tiezzi, Clagnan et al. 2013). Entretanto, diversos estudos não foram capazes de correlacionar a prevalência de células ALDH1+ no câncer de mama com o grau tumoral, metástase, resistência ao tratamento ou pior prognóstico (Qiu, Bu et al. 2014). Na própria publicação de Charafe-Jauffret et al. (2010), a marcação positiva para ALDH1 por imunohistoquímica nas pacientes com carcinoma inflamatório apresentou associação apenas com o grau tumoral e mais nenhum outro fator clínico ou biológico avaliado. Sarkar et al. (2018), apesar de demonstrar associação da positividade para ALDH1 com fatores clínicos de pior prognóstico, encontraram 40% de tumores Luminais entre todos os tumores com expressão de ALDH1, que são considerados subtipos com melhor prognóstico.

Os estudos clínicos realizados que confirmaram a hipótese da relação de células ALDH1+ com pior taxa de resposta patológica completa (9,5% nas ALDH1+ versus 32% nos tumores ALDH negativos) também utilizaram imunohistoquímica para identificar essa população celular (Tanei, Morimoto et al. 2009). Foi demonstrado também que os tumores com aumento na população celular com maior marcação por imunohistoquímica para ALDH1 após a não resposta a quimioterapia apresentavam pior prognóstico. Em contraste, esse mesmo grupo de tumores apresentou maior taxa de resposta patológica completa – 41,6% nas ALDH1+ versus 10% nas ALDH1 negativas (Lee, Kim et al. 2011). Tiezzi et al. (2013) também demonstraram que a presença de células ALDH+ identificada por imunohistoquímica no tumor residual após quimioterapia neoadjuvante está associada com pior prognóstico. Entretanto não encontrou associação da expressão de ALDH com a resposta a quimioterapia.

A discordância dos resultados apresentados na literatura pode ser consequência do uso da imunohistoquímica para identificação das células com maior marcação para ALDH1. Esse

método tem a limitação de marcar as células que expressam a enzima no momento em que foi fixada independente de sua atividade enquanto a célula ainda é viva.

Desse modo é possível questionar se o método de avaliação da expressão de ALDH1 no tumor primário não possa ter influência nos resultados dos estudos laboratoriais que utilizaram a citometria de fluxo para estudar a população celular, e os estudos clínicos que utilizaram a imunohistoquímica. Além disso, sabemos que o microambiente pode intervir na atividade da ALDH1 na célula tumoral (Tiezzi, Clagnan et al. 2013), assim a citometria de fluxo permite avaliar a real atividade da enzima no tumor e não apenas a expressão da enzima no momento em que a célula foi fixada como na imunohistoquímica. A porcentagem de células ALDH1+ em tumores primários avaliada por citometria de fluxo, não apresentou associação com a resposta patológica completa em pacientes com tumores avançados submetidas a quimioterapia neoadjuvante (Mandarano 2013). Portanto, saber se a população de células com alta atividade de ALDH1 na citometria de fluxo está associada com a marcação da enzima ALDH1A1 na imunohistoquímica é imprescindível para elucidar o papel dessa população na biologia tumoral e permitir que sejam realizados estudos no esforço de desenvolver terapêuticas voltadas para eliminar as células tronco tumorais.

Nossos resultados sugerem que a marcação das células ALDH1+ por imunohistoquímica não reflete a atividade da enzima identificada por citometria de fluxo. Uma possível explicação para esse fato pode ser pelas diversas isoformas da enzima. A família de enzimas ALDH humana contém 19 isoenzimas. Inicialmente o kit comercial ALDEFLUOR foi considerado como específico para avaliação da atividade da enzima ALDH1A1. Entretanto, diversos estudos demonstraram que outras isoformas (ALDH2, ALDH1A2, 1A3, 4A1, 6A1 e 7A1) também tem sua atividade detectada pelo ensaio com ALDEFLUOR (Marcato, Lee et al. 2011, Moreb, Chang et al. 2012). Assim, essas isoformas podem apresentar sobreposição na citometria pois digerem o mesmo substrato, levando a

grande variação observada na porcentagem de células ALDH⁺ pela citometria de fluxo com marcação negativa na imunohistoquímica, já que o anticorpo usado na imunohistoquímica é específico para a isoenzima ALDH1A1. Além disso, essas isoformas apresentam parâmetros cinéticos diferentes, como a velocidade de digestão e a saturação do substrato necessária para reação, fatores que influenciam na eficiência da enzima (Song, Moon et al. 2011) e podem influenciar na sua identificação pela citometria.

A expressão da isoformas ALDH1A1 tem correlação com maior grau tumoral, porém não com outros fatores prognósticos importantes como estadio clínico e metástase (Ginestier, Dontu et al. 2007, Marcato, Lee et al. 2011). Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que a porcentagem de células ALDH1 positiva pela citometria de fluxo analisada em amostras de tumores a fresco não tem relação com a resposta patológica a quimioterapia neoadjuvante em tumores avançados como era esperado pelos dados da literatura com experimentos *in vitro* e em modelos xenográficos. Ainda pudemos observar que esse resultado se confirmou na avaliação da mesma população por imunohistoquímica. Esta observação está em concordância com os resultados encontrados no estudo de Tiezzi e cols (2013) utilizando a imunohistoquímica para a identificação de CTTs. Talvez as demais isoformas que são também responsáveis pela alta atividade da ALDH identificadas pelo ALDEFLUOR possam ter implicação na agressividade do tumor. Foi demonstrado que a ALDH1A3 é a principal responsável pela atividade da ALDH identificada pelo ALDEFLUOR e está associada ao câncer de mama metastático independente do subtipo de tumor, com um provável papel funcional na progressão do câncer de mama. Dessa forma poderia ser utilizada como um melhor marcador prognóstico (Marcato, Lee et al. 2011).

É provável ainda que a atividade da ALDH isolada pode não ter um papel direto na resistência ao tratamento quimioterápico e sim conferir o microambiente necessário para o desenvolvimento de resistência celular junto com outros fatores (Resetkova, Reis-Filho et al.

2010). As células tronco tumorais se organizam dentro de um nicho de células tronco, que é um microambiente bem controlado constituído por componentes celulares e acelulares que integram a sinalização sistêmica e local para regularem a sua biologia. Tem sido demonstrado o papel do oxigênio nos tecidos com a manutenção das células tronco tumorais. A hipóxia pode ser um fator capaz de induzir o fenótipo de célula tronco em uma célula tumoral (Li, Bao et al. 2009). A presença do oxigênio tecidual exerce um importante papel na manutenção dessa população celular. Foi demonstrado uma diminuição dos Fatores Indutores de Hipóxia – HIF1A e HIF2A – após a quimioterapia neoadjuvante. Entretanto essa diminuição não ocorre nos tumores que mantêm alta expressão de ALDH após o tratamento quimioterápico – identificado como principal fator de pior prognóstico - confirmando a participação da sinalização do HIF para a transformação da célula tumoral em célula tronco e na manutenção dessa população celular (Tiezzi, Clagnan et al. 2013). Portanto existe uma interferência direta do microambiente na população de células tronco tumorais e na relação que essas células apresentam com a resposta a quimioterapia e ao prognóstico. Isso explicaria porque as células identificadas por citometria de fluxo, apesar de apresentarem maior formação de mamoesferas, característica essa de CTTs *in vitro*, não apresentaram o comportamento mais agressivo esperado nos tumores *in vivo* (Mandarano 2013).

Aventa-se ainda a hipótese de que as CTTs possam ser importantes na biologia tumoral, relacionadas com a gênese do tumor. Foi demonstrado que as células ALDH1+ apresentam altos níveis de expressão de genes epiteliais, enquanto células CD44+CD24- apresentam expressão gênica mesenquimal. Ambas as populações provavelmente representam células tronco tumorais capazes de se interconverterem e se sobreporem em processos regulados pelo microambiente tumoral (Colacino, Wisha et al. 2018). A população ALDH1+ pode ser importante nos processos iniciais do desenvolvimento tumoral, levando a tumores com características mais agressivas. Com o crescimento tumoral, outros processos podem ser

responsáveis pela manutenção e disseminação do tumor, bem como com a resistência a quimioterapia (Liu, Clouthier et al. 2012, Valejo 2012) . Isso pode ser observado na amostra atual em que houve maior porcentagem de células ALDH+ por citometria de fluxo nos tumores iniciais (estádio clínico I e II e grau I).

O fato das células ALDH1+ por ambos os métodos não demonstrarem relação com a sobrevida global ou livre de doença nem com os demais fatores prognósticos conhecidos, nos permite questionar o uso somente dessa enzima para identificação das CTTs no câncer de mama. Yan Qiu em cols. (2016) demonstrou que as células identificadas por imunohistoquímica dupla para CD44+/ALDH+ teve forte relação com pior prognóstico, tanto na sobrevida livre de doença quanto na sobrevida global. Essa informação corrobora com os achados de que células que expressam o fenótipo ALDH+CD44+CD24- representam uma pequena parcela da população de células progenitoras em que os fenótipos se sobrepõe, porém apresentam maior capacidade de gerar tumor quando comparadas com células ALDH+ ou com células CD44+CD24-. Talvez essas células que expressam ambos os fenótipos representem melhor os clones da população de CTTs responsáveis pela resistência ao tratamento do câncer de mama (Ginestier, Dontu et al. 2007). Aventa-se também a possibilidade da isoenzima ALDH1A3 ser um marcador mais preciso das CTTs por demonstrar alta atividade do ALDEFLUOR no câncer de mama. Entretanto os resultados relacionando essa isoforma aos marcadores prognósticos conhecidos são conflitantes (Qiu, Bu et al. 2014), demonstrando que a progressão tumoral é um processo biológico complexo envolvendo múltiplas populações celulares bem como as condições do microambiente.

Compreender como esses clones interagem e promovem o estado metastático leva a uma abordagem alternativa para terapia do câncer (Crocker and Allan 2012). 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.

O desenvolvimento de terapêuticas baseado apenas na regressão tumoral pode produzir agentes capazes de eliminar a célula tumoral diferenciada enquanto espalham a população de células troncos tumorais (Ginestier, Dontu et. al 2007). Portanto, o desenvolvimento de terapêuticas mais efetivas deveria ter como alvo a população de células tronco. Para isso é necessário técnicas capazes de identificar, isolar e caracterizar essa população adequadamente. Assim, grandes desafios ainda precisam ser transpostos e estudos futuros devem considerar o papel das células tronco tumorais na gênese tumoral e formação da metástase. 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.

O presente estudo demonstrou que as técnicas utilizadas para identificação das CTTs baseado na ALDH1 por citometria de fluxo e por imunohistoquímica podem não representar a mesma população celular, levando a discrepância nos achados dos estudos realizados nessa população celular até o momento. Além disso, o comportamento das células isoladas por citometria de fluxo no tumor primário *in vivo* pode não refletir o comportamento nos modelos xenográficos e análises *in vitro*. Portanto, é preciso determinar a melhor forma de identificar a população de CTTs e prosseguir a investigação das funções biológicas dessas células que podem ser responsáveis pela resistência ao tratamento do câncer de mama. Isso certamente contribuirá de forma grandiosa na melhoria das terapias atuais e na descoberta de novos alvos terapêuticos, impactando diretamente na prática clínica e nas decisões de manejo específico para cada paciente.

6 CONCLUSÃO

Não foi possível estabelecer uma associação entre a expressão de ALDH1A1 no tumor primário avaliada por imunohistoquímica com a porcentagem de células ALDH1 positivas pela citometria de fluxo.

Não encontramos uma relação significativa quando analisamos a expressão de ALDH1A1 por imunohistoquímica no tumor primário com a resposta patológica ao tratamento neoadjuvante.

Quanto a avaliação de fatores prognósticos, não encontramos uma relação significativa da expressão de ALDH1A1+ pela imunohistoquímica com os diversos fatores analisados (idade, status menopausal, estágio clínico, grau histológico, expressão de receptores hormonais e de HER2). Quanto a porcentagem de células ALDH1 positivas por citometria de fluxo, foi encontrada em maior número significativamente nas pacientes pós-menopausa, com estágio clínico I e II e nos tumores com grau histológico I. Quanto as demais características clínicas e biológicas não foi encontrada relação significativa. Não foi encontrada relação da sobrevida global ou da sobrevida livre de doença com a expressão de ALDH1A1 por imunohistoquímica nem com a porcentagem de células ALDH1 positivas na citometria de fluxo.

Concluimos assim que expressão de ALDH1A1 avaliada por imunohistoquímica ou da ALDH1 por citometria de fluxo dentro do tumor primário não são fatores preditores de prognóstico nem de resposta patológica completa em pacientes submetidos à quimioterapia neoadjuvante nesse grupo de pacientes. Concluimos também que a porcentagem de células ALDH1 positivas na citometria de fluxo não corresponde a população celular com expressão de ALDH1A1 pela imunohistoquímica.

REFERÊNCIAS

- Abrial, S. C., F. Penault-Llorca, et al. (2005). "High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer." Breast Cancer Res Treat **94**(3): 255-263.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3983-3988.
- Andre, F., C. Mazouni, et al. (2008). "HER2 expression and efficacy of preoperative paclitaxel/FAC chemotherapy in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **108**(2): 183-190.
- Ayers, M., W. F. Symmans, et al. (2004). "Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer." J Clin Oncol **22**(12): 2284-2293.
- Beriwal, S., G. F. Schwartz, et al. (2006). "Breast-conserving therapy after neoadjuvant chemotherapy: long-term results." Breast J **12**(2): 159-164.
- Bertucci, F., P. Finetti, et al. (2004). "Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy." Cancer Res **64**(23): 8558-8565.
- Bertucci, F., V. Nasser, et al. (2002). "Gene expression profiles of poor-prognosis primary breast cancer correlate with survival." Hum Mol Genet **11**(8): 863-872.
- Carrasco, E., F. Rodriguez-Serrano, et al. (2014). "Cancer stem cells and their implication in breast cancer." Eur J Clin Invest **44** (7): 678-687
- Calza, S., P. Hall, et al. (2006). "Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients." Breast Cancer Res **8**(4): R34.
- Chang, J. C., E. C. Wooten, et al. (2003). "Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer." Lancet **362**(9381): 362-369.
- Charafe-Jauffret, E., C. Ginestier, et al. (2010). "Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer." Clin Cancer Res **16**(1): 45-55.

- Charafe-Jauffret, E., C. Ginestier, et al. (2009). "Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature." Cancer Res **69**(4): 1302-1313.
- Chen, L., R. Shen¹, et al. (2007). "Precancerous Stem Cells Have the Potential for both Benign and Malignant Differentiation." PLoS ONE **2**(3): e293.
- Chen, R., S. Liu, et al. (2018). "Assessment of the predictive role of pretreatment Ki-67 and Ki - 67 changes in breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy according to the molecular classification: a retrospective study of 1010 patients." Breast Cancer Res Treat . *Epub ahead of print*. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10549-018-4730-1>>. Acesso em: 04 abr. 2018.
- Colacino, J.A., M. S. Wicha, et al. (2018). "Heterogeneity of Human Breast Stem and Progenitor Cells as Revealed by Transcriptional Profiling". Stem Cell Reports **10**: 1596–1609
- Crocker, A. K. and A. L. Allan (2012). "Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44(+) human breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **133**(1): 75-87.
- Cuzick, J., I. Sestak, et al. (2010). "Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial." Lancet Oncol **11**(12): 1135-1141.
- Dick, J. E. (2008). "Stem cell concepts renew cancer research." Blood **112** (13): 4793-4807.
- Eisenhauer, E. A., P. Therasse, et al. (2009). "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)." Eur J Cancer **45**(2): 228-247.
- Fisher, B., A. Brown, et al. (1997). "Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18." J Clin Oncol **15**(7): 2483-2493.
- Fisher, B., J. Bryant, et al. (1998). "Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer." J Clin Oncol **16**(8): 2672-2685.
- Ginestier, C., G. Dontu, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
- Hammond, M. E. H., A. C. Wolff, et al. (2010). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer." Anch Pathol Lab Med **134**(6): 907-922

- Huang, E., S. H. Cheng, et al. (2003). "Gene expression predictors of breast cancer outcomes." Lancet **361**(9369): 1590-1596.
- Inovecare (2013) "<http://www.inovecare.com/pesquisa.html>."
- Jemal, A., R. L. Siegel, et al. (2017). "Cancer statistics, 2017." CA Cancer J Clin **67**: 7-30.
- Kim A. I., Y. J. Lim, et al. (2017). "Failure patterns according to molecular subtype in patients with invasive breast cancer following postoperative adjuvant radiotherapy: long-term outcomes in contemporary clinical practice." Breast Cancer Res Treat **163**:555–563
- Lee, H. E., J. H. Kim, et al. (2011). "An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer." Br J Cancer **104**(11): 1730-1738.
- Li, X., M. T. Lewis, et al. (2008). "Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy." J Natl Cancer Inst **100**(9): 672-679.
- Li, Z., S. Bao, et al. (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." Cancer Cell **15**(6): 501-513.
- Liu, S., S. G. Clouthier, et al. (2012). "Role of microRNAs in the regulation of breast cancer stem cells." J Mammary Gland Biol Neoplasia **17**(1): 15-21.
- Mandarano, L.R. M. "Avaliação da porcentagem de células com alta atividade de aldeído-desidrogenase no tumor primário não prediz a resposta a quimioterapia neoadjuvante em câncer de mama". 2013. 51 fl. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP. 2013
- Marcato P, P. W. K. Lee, et al. (2011). "Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis." Stem Cells **29**:32–45
- Moreb, J. S., L.J. Chang, et al. (2012). "The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance." Chem Biol Interact **195**(1): 52–60.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.

- Osako, T., R. Horii, et al. (2010). "High-grade breast cancers include both highly sensitive and highly resistant subsets to cytotoxic chemotherapy." J Cancer Res Clin Oncol **136**(9): 1431-1438.
- Osako, T., R. Horii, et al. (2010). "Common and discriminative clinicopathological features between breast cancers with pathological complete response or progressive disease in response to neoadjuvant chemotherapy." J Cancer Res Clin Oncol **136**(2): 233-241.
- Qiu, Y., F. Ye, et al. (2016). "ALDH+/CD44+ cells in breast cancer are associated with worse prognosis and poor clinical outcome." Experimental and Molecular Pathology **100**: 145-150
- Qiu, Y., H. Bu, et al. (2014) " The Expression of Aldehyde Dehydrogenase Family in Breast Cancer." JBreastCancer **17**(1): 54-60
- Rakha, E. A., M. A. Aleskandarany, et al. (2018). "Tumour Heterogeneity of Breast Cancer: From Morphology to Personalised Medicine." Pathobiology. *Epub ahead of print*. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/477851>>. Acesso em: 02 mar. 2018.
- Razzak, A. R., N. U. Lin, et al. (2008). "Heterogeneity of breast cancer and implications of adjuvant chemotherapy." Breast Cancer **15**(1): 31-34.
- Resetskova, E., J. S. Reis-Filho, et al. (2010). "Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment." Breast Cancer Res Treat **123**(1): 97-108.
- Reuben, J. M., B. N. Lee, et al. (2011). "Primary breast cancer patients with high risk clinicopathologic features have high percentages of bone marrow epithelial cells with ALDH activity and CD44(+)CD24lo cancer stem cell phenotype." Eur J Cancer **47**(10): 1527-1536.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.
- Reyal, F., A. S. Hamy-Petit, et al. (2016). " Pathological complete response and prognosis after neoadjuvant chemotherapy for HER2-positive breast cancers before and after Trastuzumab era: results from a real-life cohort." British Journal of Cancer **114**: 44-52
- Sarkar, P., K. Basu, et al. (2018). "Correlations of aldehyde dehydrogenase-1 (aldh1) expression with traditional prognostic parameters and different molecular subtypes of breast carcinoma." Clujul Medical **91** (2): 181-187

- Song, B. J., K. H. Moon, et al. (2011). "Post-translational modifications of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and biomedical implications." J Proteomics **74**(12): 2691-2702
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, et al. (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8418-8423.
- Sorlie, T., Y. Wang, et al. (2006). "Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms." BMC Genomics **7**: 127.
- Sotiriou, C., S. Y. Neo, et al. (2003). "Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10393-10398.
- Szwarcwald, C. L., G. A. Silva, et al. (2017). " Early detection of breast cancer in Brazil: data from the National Health Survey, 2013." Rev Saude Publica **51**: 2s
- Takahashi, R., T. Ochiya, et al (2011). "Cancer Stem Cells in Breast Cancer". Cancers **3**: 1311-1328
- Tanei, T., K. Morimoto, et al. (2009). "Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers." Clin Cancer Res **15**(12): 4234-4241.
- Tiezzi, D. G., W. S. Clagnum, et al. (2013). "Expression of aldehyde dehydrogenase after neoadjuvant chemotherapy is associated with expression of hypoxia-inducible factors 1 and 2 alpha and predicts prognosis in locally advanced breast cancer." Clinics (Sao Paulo) **68**(5): 592-598.
- Valejo, F. A., D. G. Tiezzi, et al. (2010). Cancer stem cells and lymph node metastasis in early stage breast cancer. 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, D.C.
- Valejo, F. A. M. "Identificação das células CD44+/CD24- e ALDH+ nos diversos estadios do carcinoma de mama." 2012. 84f. Tese Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

- van 't Veer, L. J., H. Dai, et al. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature **415**(6871): 530-536.
- van de Vijver, M. J., Y. D. He, et al. (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." N Engl J Med **347**(25): 1999-2009.
- Velasco-Velazquez, M. A., N. Homsí, et al. (2012). "Breast cancer stem cells." Int J Biochem Cell Biol **44**(4): 573-577.
- von Minckwitz, G., M. Untch, et al. (2011). "Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials." Breast Cancer Res Treat **125**(1): 145-156.
- World Health Organization (2014). "The World Cancer Report 2014". Editado por Bernard W. Stewart e Christopher P. Wild. International Agency for Research on Cancer, Lyon: 362-364.
- Zielske, S. P., A. C. Spalding, et al. (2011). "Ablation of breast cancer stem cells with radiation." Transl Oncol **4**(4): 227-233.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Classificação Clínica TNM para Câncer de Mama

Estadiamento do AJCC 2002

T- Tumor primário

T1 – Tumor < 2 cm na maior extensão

T1 mic – microinvasão < 0,1cm

T1a - > 0,1cm e < 0,5cm

T1b - > 0,5cm e < 1cm

T1c - > 1cm e < 2cm

T2 – Tumor > 2cm e < 5cm na maior dimensão

T3 – Tumor > 5cm na maior dimensão

T4 – Tumor de qualquer tamanho com:

T4a – extensão à parede torácica

T4b – extensão à pele

T4c – ambos

T4d – câncer inflamatório

N- Linfonodos regionais

N1 – Linfonodos axilares ipsilaterais móveis

N2a – Linfonodos axilares ipsilaterais fixos entre eles ou à outras estruturas

N2b – Apenas na cadeia mamária interna ipsilateral, sem metástase na cadeia axilar

N3a – Linfonodo da cadeia infraclavicular ipsilateral, com ou sem acometimento axilar

N3b – Linfonodo da cadeia mamária interna ipsilateral, com acometimento axilar

N3c – Linfonodo na cadeia supraclavicular ipsilateral, com ou sem acometimento das cadeias axilar ou mamária interna

M- Metástases à distância

M1 – metástase à distância

Apêndice 2 – Agrupamento dos Estádios Clínicos TNM

Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Estádio IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Estádio IIIC	QqT	N3	M0
Estádio IV	QqT	qqN	M1