RENATA KELLY KUNIYOSHI

Estudo do perfilamento gênico tumoral e de marcadores de doença residual mínima (CK19 e c-ErbB-2) através de RT-PCR quantitativo na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes com câncer de mama durante o tratamento quimioterápico

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e
da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Auro Del Giglio

São Paulo

2013

RENATA KELLY KUNIYOSHI

Estudo do perfilamento gênico tumoral e de marcadores de doença residual mínima (CK19 e c-ErbB-2) através de RT-PCR quantitativo na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes com câncer de mama durante o tratamento quimioterápico

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e
da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Auro Del Giglio

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Kuniyoshi, Renata Kelly

Estudo do perfilamento gênico tumoral e de marcadores de doença residual mínima (CK19 e c-ErbB-2) através de RT-PCR quantitativo na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes com câncer de mama durante o tratamento quimioterápico / Renata Kelly Kuniyoshi. -- São Paulo, 2013.

**Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Auro Del Giglio.

Descritores: 1.Neoplasias da mama/terapia 2.Perfil da expressão gênica
3.Reação em cadeia da polimerase multiplex 4.Marcadores biológicos de tumor
5.Queratina-19 6.Receptor erbB-2

USP/FM/DBD-137/13

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha tão saudosa *Obá* Take Kuniyoshi que foi um exemplo de mulher, mãe e avó e que durante os seus 89 anos de vida soube lidar com as adversidades da vida com muita sabedoria e paciência. Ela foi e sempre será minha grande inspiração.

AGRADECIMENTOS

Após esses 5 anos de estudo, onde passei por momentos de alegrias, tristezas, angústias, frustrações, conflitos, comemorações, aprendizado, descobertas até chegar a este ponto, nada mais justo do que agradecer todos aqueles que de alguma forma, mesmo que através de um simples gesto, ajudaram a transformar um sonho em realidade. As poucas palavras que aqui escrevo nem de longe transmitem a profunda gratidão que sinto por todas estas pessoas.

Agradeço a Deus por ter posto em meu caminho minha família que sempre me apoiou.

Ao Prof. Dr Auro Del Giglio pela orientação, paciência, confiança e principalmente por ter me dado à oportunidade de trabalhar em um projeto tão gratificante quanto este.

Ao Fernando Fonseca por ter me apoiado em todos os momentos bons ou ruins, por sua amizade, conselhos e muita paciência.

A Bia por sua preciosa amizade, ensinamentos, conselhos, correções e aos nossos cafezinhos da manhã.

A Flávia pelos anos de amizade, apoio, ajuda na bancada, discussões e suas considerações neste projeto.

A todas as pacientes e voluntárias que aceitaram participar deste projeto, sem as quais não seria possível a realização do mesmo.

A Anna Coló pela amizade, apoio e pela imensa ajuda com a validação da técnica.

A Patrícia Maeda pela triagem e inclusão das pacientes do ABC.

A Viviane Vilas Bôas pela amizade e ajuda em toda padronização.

A Mafalda Novaes pela confiança por ter me apresentado ao grupo.

Ao Jorge por seu companheirismo, paciência nas minhas frequentes ausências e seu imenso apoio para que eu conseguisse finalizar este trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas da FMABC por ter me acolhido e apoiado esses anos todos.

Ao Hospital do Câncer de Barretos pela parceria técnica científica e discussão dos resultados gerados.

A UNIEMP - IEP-HIAE e FAPESP pelo suporte financeiro.

A FMUSP pela estrutura oferecida para que este trabalho fosse realizado (disciplinas e biblioteca).

A Rose e Angélica, secretárias do programa de pós-graduação em Ciências Médicas, que me ajudaram com muita paciência sempre que fui buscar ajuda quase no último minuto.

E a toda minha família pelo enorme apoio e paciência.

**“Sonhos não morrem, apenas
adormecem na alma da gente.”**

Chico Xavier.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Epidemiologia.....	1
1.2. Células tumorais circulantes: conceito e importância.....	2
1.3. Métodos para detecção de células epiteliais circulantes em câncer de mama.....	4
1.3.1. Técnica de imunocitoquímica.....	4
1.3.2. Métodos moleculares.....	6
1.4. O significado da presença de células tumorais na medula óssea e sangue periférico.....	7
1.5. Significado clínico das células tumorais circulantes em pacientes com câncer de mama.....	9
1.6. Citoqueratina 19 (KRT19).....	13
1.7. ERBB2.....	14
1.8. Biomarcadores do câncer de mama.....	15
1.8.1. Perfilamento genético de tumores mamários como um fator de prognóstico para pacientes com câncer de mama.....	15
1.9. Plexor ® qPCR System.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. PACIENTES E MÉTODOS.....	22
3.1. Paciente.....	22
3.2. Separação da fração mononuclear do sangue periférico.....	23
3.3. Extração de RNA total.....	23
3.3.1. Tecido Parafinado.....	23
3.3.2. Sangue Periférico.....	24
3.4. Tratamento com DNase I.....	25
3.5. Síntese do DNA complementar.....	25
3.6. RT-PCR quantitativo em tempo real para CK19 e HER2.....	25
3.7. Desenho de <i>primers</i> específicos para amplificação multiplex.....	26
3.8. Validação dos <i>primers</i> para amplificação multiplex.....	27

3.9. Reação de amplificação multiplex pelo sistema Plexor®.....	27
3.10. Análise dos resultados obtidos pelo sistema Plexor®.....	28
3.11. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Características clínicas e patológicas das pacientes incluídas.....	29
4.2. Padronização da técnica de qRT-PCR para avaliação da expressão de CK 19 no sangue periférico.....	30
4.3. Padronização da técnica de qRT-PCR para avaliação da expressão de HER2 no sangue periférico.....	38
4.3.1. Par de <i>Primer 1</i>	38
4.3.2. Par de <i>Primer 2</i>	39
4.3.3. Par de <i>Primer 3</i>	39
4.4. Avaliação da expressão de CK-19 e HER2 no sangue periférico.....	46
4.5. Padronização das amplificações dos multiplex utilizando o sistema Plexor®.....	48
4.5.1. Padronização da Técnica de extração de RNA a partir de material advindo de biópsia e embocado com parafina (bloco de material com tumor-parafinado).....	48
4.5.2. Síntese de Cdna a partir do RNA total extraído de tecido parafinado.....	51
4.5.3. Amplificação em multiplex.....	51
4.6. Pontuação do Perfilamento tumoral.....	54
4.7. Correlações com Intervalo Livre de Doença (ILD).....	59
4.6. Correlações com resposta à quimioterapia.....	63
5. DISCUSSÃO.....	64
5.1. Avaliação da expressão de CK 19 e HER2 na FMNSP através de qRT-PCR.....	64
5.2. Perfilamento genético tumoral.....	67
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrando o processo do sistema Plexor.....	19
Figura 2. Representação de curva de amplificação (a) e de dissociação (b) geradas por amplificação com o sistema Plexor e analisadas com o software <i>Plexor Data Analysis</i>	19
Figura 3. Pannel A, curva de amplificação; pannel B, curva padrão; pannel C curva de dissociação e pannel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7.....	31
Figura 4. Pannel A, curva de amplificação; pannel B, curva padrão; pannel C curva de dissociação e pannel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 e amostra de 5 doadoras.....	32
Figura 5. Pannel A, curva de amplificação; pannel B, curva padrão; pannel C curva de dissociação e pannel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 e amostra de 14 doadoras.....	33
Figura 6. Pannel A, curva de amplificação; pannel B, curva padrão; pannel C curva de dissociação e pannel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 e amostra re-extraídas com Trizol e re-coletadas.....	35
Figura 7. Pannel A, curva de amplificação; pannel B, curva padrão; pannel C curva de dissociação e pannel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 em diluição seriado com linfócitos.....	37
Figura 8. Curva de dissociação de produto de qPCR. A seta indica o pico correspondente à amplificação a partir de DNA genômico.....	44

Figura 9. Otimização da quantidade de cDNA molde na reação de qPCR com <i>primer</i> 3.....	45
Figura 10. Perfil de expressão, Curva padrão, Curva de dissociação e dados de C_{qs} de GAPDH_Tecido Parafinado.....	50
Figura 11. Curvas de amplificação de três genes constitutivos (Beta-actina, TRFC e GUSB) e três genes-alvo (CTSL2, ER e SCUBE2) dos 21 genes do estudo de perfilamento genético tumoral com o sistema Plexo.....	53
Figura 12. Curva de sobrevida demonstrando a sobrevida dos pacientes com pontuações de seus perfilamentos tumorais no quartil superior (75%) na curva inferior e os demais com pontuações inferiores na curva superior (Logrank $p = 0.000471$).....	56
Figura 13. Dot Plot mostrando a distribuição das pontuações por estadio.....	57
Figura 14. Pacientes com estadio 2 e pontuações de seus perfilamentos tumorais no quartil superior (curva inferior) e demais quartis (curva inferior) (Logrank $p = 0.000437$).....	58
Figura 15. Curva se Intervalo livre de doença (ILD) de todas as pacientes incluídas no estudo.....	60
Figura 16. ILD e HER2 da segunda coleta em pacientes cuja primeira medida de HER2 foi positiva. Observa-se que pacientes com HER2 positivo na segunda coleta tenderam a ter ILD inferior (curva inferior tracejada) (log rank $p = 0.061$).....	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Gene e tamanho dos amplicons analisados neste estudo	26
Tabela 2. Características clínicas das 167 pacientes analisadas.....	29
Tabela 3. Características patológicas das amostras tumorais das 167 pacientes analisadas.....	30
Tabela 4. Otimização da concentração de <i>primer</i> 3.....	40
Tabela 5. Expressão de HER2 relativa à MCF-7 em mulheres saudáveis.....	41
Tabela 6. Otimização da quantidade de cDNA molde na reação de qPCR com <i>primer</i> 3.....	41
Tabela 7. Avaliação do ponto de corte para expressão de CK-19 e HER2 na fração mononuclear do sangue periférico de 23 amostras controle (mulheres saudáveis).....	46
Tabela 8. Características analíticas de CK-19 e HER2.....	47
Tabela 9. Evolução da expressão de CK-19 e de HER2 ao longo do tempo. CK-19 e HER2 (primeira amostra); CK-19 e HER2 (segunda amostra: após 3 meses) e CK-19 e HER2 (terceira amostra: após 6 meses).....	47
Tabela 10. Resultados das Concentrações de RNA utilizando o kit <i>RNeasy FFPE</i>	49
Tabela 11. Resultado do PCR quantitativo de cDNA sintetizado com oligo-dT e <i>random primers</i>	51
Tabela 12. Combinações de genes utilizadas para a análise multiplex.....	53

Tabela 13. Estatística descritiva da pontuação do perfilamento tumoral.....55

Tabela 14. Análise univariada com o modelo de riscos proporcionais de Cox para Intervalo Livre de Doença (ILD) como variável dependente.....62

Tabela 15. Análise multivariada com o modelo de riscos proporcionais de Cox para Intervalo Livre de Doença (ILD) como variável dependente.....63

Tabela 16. Análise logística de resposta à quimioterapia como variável dependente e demais características clínicas e variáveis.....64

Kuniyoshi RK. *Estudo do perfilamento gênico tumoral e de marcadores de doença residual mínima (CK19 e c-ErbB-2) através de RT-PCR quantitativo na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes com câncer de mama durante o tratamento quimioterápico* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

RESUMO

INTRODUÇÃO: De acordo com a estimativa de 2012 do INCA, eram esperados 52.680 novos casos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Estes dados mostram a necessidade da identificação de biomarcadores efetivos para rastreamento precoce e seguimento destas mulheres durante seu tratamento. Neste trabalho, para a avaliação de potenciais biomarcadores desta doença, foi idealizado um modelo laboratorial específico que avalie tanto a capacidade de um dado biomarcador rastrear um tumor inicial de mama, bem como testar o seu potencial valor para o seguimento de mulheres já diagnosticadas durante seu tratamento. Este modelo baseia-se na avaliação de células tumorais circulantes e perfilamento gênico tumoral. **MÉTODOS:** Amostras biológicas (sangue periférico e tumor) de 167 pacientes diagnosticadas com carcinoma mamário estádios I, II e III com indicação de quimioterapia adjuvante para: a) avaliação da presença de células tumorais circulantes através da expressão de CK19 e HER2 na Fração Mononuclear do Sangue Periférico (FMNSP) por RT-PCR quantitativo e b) perfilamento gênico tumoral através da análise da expressão de 21 genes relacionados a importantes processos de carcinogênese mamária em amostras de tecido parafinado por ensaio multiplex de RT-PCR quantitativo utilizando o sistema Plexor®. **RESULTADOS:** Foi observada uma correlação significativa entre CK19 e HER2 na primeira coleta e queda da concentração de HER2 no SP durante o tratamento; porém, não foi percebida queda significativa do CK19 ao longo do estudo. A expressão de HER2 na segunda coleta de pacientes positivas para HER2 na primeira coleta tendeu a se correlacionar significativamente com um pior Intervalo Livre de Doença (ILD). Através da padronização da pontuação em quartis das análises realizadas em multiplex pelo sistema Plexor, foi percebido que o quartil superior apresentava ILD significativa pior do que a de pacientes nos demais quartis. Também foi observada uma estratificação do estadió clínico II em pior ou melhor prognóstico de acordo com o quartil de pontuação do teste de perfilamento

proposto neste estudo; além disso, verificou-se que pacientes submetidas a tratamento neoadjuvante com pontuações inferiores tenderam a responder melhor à quimioterapia. CONCLUSÃO: Pelas características do comportamento evolutivo no presente estudo, HER2 parece ser melhor como possível biomarcador de células tumorais circulantes do que o CK-19. Até o presente momento do seguimento das pacientes incluídas neste estudo, não foi possível criar um modelo com diversas variáveis para prever o prognóstico de pacientes com câncer de mama. Isto ocorreu principalmente pelas características preditivas prognósticas superiores do perfilamento genético do tumor que desloca fatores de prognóstico tais como células circulantes e estadios clínicos, expressão hormonal do tumor e idade de um modelo multivariado. Por outro lado, foi padronizada uma tecnologia genômica complexa que poderá viabilizar seu uso para a população se estudos posteriores confirmarem seu valor em outras coortes de pacientes com câncer de mama.

Descritores: 1. Neoplasias da mama/terapia 2. Perfil da expressão gênica 3. Reação em cadeia da polimerase multiplex 4. Marcadores biológicos de tumor 5. Queratina-19 6. Receptor erbB-2

Kuniyoshi RK. *Study of tumor gene profiling and minimal residual disease markers (CK19 and c-ErbB-2) by quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear fraction in patients with breast cancer during chemotherapy* [Thesis]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

ABSTRACT

BACKGROUND: According to the estimate of 2012 INCA, were expected 52,680 cases of breast cancer in Brazil, with an estimated risk of 52 cases per 100 000 women. These data show the need for effective identification of biomarkers for early screening and follow-up of these women during their treatment. In this work, for the evaluation of potential biomarkers of this disease, a model laboratory was designed to evaluate both the specific capacity of a given biomarker trace an initial breast tumor, as well as test its potential value for the follow-up of women already diagnosed during their treatment. This model was based on the evaluation of circulating tumor cells and tumor gene profiling. **METHODS:** Biological samples (peripheral blood and tumor) of 167 patients diagnosed with breast cancer stages I, II and III with an indication for adjuvant chemotherapy: a) to evaluate the presence of circulating tumor cells through the expression of HER2 and CK19 in Peripheral Blood Mononuclear fraction (PBMN) by quantitative RT-PCR and b) tumor profiling gene by analyzing the expression of 21 genes related to important processes of mammary carcinogenesis in paraffinized tissue samples by multiplex assay for quantitative RT-PCR using the Plexor ® System. **RESULTS:** Was observed a significant correlation between HER2 and CK19 in the first collection and decrease in concentration of HER2 in PB during the treatment, but were not perceived significant decrease of CK19 along the study. The expression of HER2 in the second collection of patients positive for HER2 in the first test tended to correlate with a significantly worse disease-free interval (DFI). Through standardization of the scores in quartiles of the analyzes performed at multiplex Plexor system was seen that the upper quartile ILD had significantly worse than patients in the other quartiles. Also stratification was observed in clinical stage II in better or worse prognosis according to quartiles of test score profiling proposed in this study, in addition, it was found that patients submitted to neoadjuvant treatment with lower scores tended to better respond to chemotherapy. **CONCLUSION:** HER2 seems to be better as possible biomarker of

circulating tumor cells than the CK-19. So far the monitoring of patients included in this study, it was not possible to create a model with multiple variables to predict the prognosis of patients with breast cancer. This occurred primarily due to the characteristics predictive prognostic upper genetic profiling of tumor that displaces prognostic factors such as circulating cells and clinical stage, tumor hormone expression and age in a multivariate model. In the other hand, was standardized complex genomic technology that may enable their use for the population if further studies confirm its value in other cohorts of patients with breast cancer.

Descriptors: 1. Breast neoplasms/ Therapy 2. Gene expression profiling 3. Multiplex polymerase chain reaction 4. Tumors markers biological 5. Keratin-19 6. Receptor erbB-2

Descritores: 1. Neoplasias da mama/terapia 2. Perfil da expressão gênica 3. Reação em cadeia da polimerase multiplex 4. Marcadores biológicos de tumor 5. Queratina-19 6. Receptor erbB-2

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia

O câncer de mama permanece como o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres. De acordo com a estimativa de 2012 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), eram esperados 52.680 novos casos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 69 casos novos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (65/100.000), Centro-Oeste (48/100.000) e Nordeste (32/100.000). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19/100.000) (Estimativa 2012, INCA).

Apesar do desconhecimento da principal causa, alguns fatores podem ser considerados no desenvolvimento do câncer de mama, entre estes se destacam: os fatores genéticos, exposição à radiação, tabagismo, duração da idade reprodutiva, paridade, obesidade, terapia de reposição hormonal entre outros (Hankinson et al., 2004).

A prevenção primária deste câncer não é totalmente possível ainda devido a fatores de risco ligados à vida reprodutiva da mulher e a características genéticas que estão envolvidas na sua etiologia. Estudos vêm sendo realizados no sentido de validar novas estratégias de rastreamento factíveis para países com dificuldades orçamentárias, já que atualmente o único método de detecção precoce que mostrou reduzir a mortalidade por câncer de mama foi o rastreamento populacional com mamografia em mulheres com idade entre 50 e 69 anos (Estimativa, 2010).

As pacientes acometidas geralmente possuem idade superior a 40 anos. A incidência em idades inferiores é considerada rara ou em certos casos ligados a doença familiar. Entretanto, a incidência da patologia cresce com o passar dos anos, sendo na ordem de 1/232 na quarta década, podendo ser até 1/79 na sétima década de vida (Stewart et al., 2004)

Como os carcinomas mamários são heterogêneos do ponto de vista molecular (Pusztai, 2008), uma visão ampla do processo tumoral pode nos ser dada com a avaliação conjunta do perfilamento gênico do tumor primário, de marcadores diretamente relacionados ao processo metastático (células tumorais circulantes) e da inter-relação entre o hospedeiro e o tumor primário.

1.2. Células tumorais circulantes: conceito e importância

Em neoplasias sólidas, células latentes podem se disseminar a partir do tumor primário em um determinado momento da sua evolução. Essas células residuais que permanecem no organismo após a remoção do tumor e que não são factíveis de serem detectáveis por meio de metodologias propedêuticas convencionais como o exame clínico, métodos de imagem ou análises laboratoriais de rotina correspondem à doença residual mínima (DRM) (Ringe et al., 2004; Diel e Cote, 2000).

Podemos, utilizando o estudo da DRM, caracterizar molecular e imunofenotipicamente as células tumorais em trânsito (circulantes) pelos tecidos normais antes que estas se convertam em metástases detectáveis pelos métodos de rastreamento usuais. A pesquisa de DRM em pacientes com câncer de mama por avaliação de células tumorais circulantes no sangue periférico ou presentes na medula óssea tem como objetivo, portanto, avaliar se existe a possibilidade de refinar o prognóstico da doença e, potencialmente, definir novas estratégias terapêuticas, além de prover conhecimentos acerca do início do processo de metastatização da neoplasia.

A medula óssea (MO) é um sítio facilmente acessível e normalmente não contaminado por células epiteliais. Suas células, tanto as hematopoéticas como as do estroma, são de origem mesenquimal, podendo ser distinguidas das células malignas epiteliais por várias técnicas como, por exemplo, as técnicas de imunohistoquímica e moleculares (Diel e Cote, 2000; Soares et al., 2003; Braun et al., 2005). Da mesma forma, a fração mononuclear do sangue periférico (FMNSP) poderia se prestar à detecção de células epiteliais circulantes oriundas de tumores epiteliais visto que, à semelhança da MO, as células normalmente presentes na FMNSP têm também origem mesenquimal, e a presença de células epiteliais circulantes em pacientes com tumores

de origem epitelial poderia também ser interpretada como tendo origem neoplásica (Ring et al., 2004; Cristofanilli et al., 2004; Strati et al., 2011). A FMNSP seria idealmente preferível a MO, pois é de muito mais fácil obtenção e maior aceitação para os pacientes, especialmente para estudos seriados.

No passado questionou-se as células epiteliais detectadas na MO ou na FMNSP seriam viáveis e se teriam capacidade de originar metástases (Klein et al., 1999; Gangnus et al., 2004; Woelfle et al., 2003). Estudos moleculares demonstraram que estas células albergam também alterações cromossômicas semelhantes aos tumores presentes nas pacientes e sua consistente associação com um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama reforçam sua importância para o processo metastático.

Tumores sólidos são capazes de disseminar de 1 a 6 milhões de células tumorais no sangue por grama de tumor todos os dias. A maioria destas células sofre apoptose e são retiradas da circulação pela ação de fagócitos da fração mononuclear do sangue (Mikulová e col., 2011). Algumas destas células podem circular livremente no sangue de pacientes com câncer mesmo após a remoção do tumor. De fato, é possível se caracterizar molecular e imunofenotipicamente estas células tumorais circulantes (CTCs) e estima-se que em 30% a 40% das pacientes que parecem clinicamente livres de metástases existam CTCs identificáveis em seu sangue periférico (Mikulová e col., 2011).

Os níveis de células epiteliais circulantes no sangue periférico de pacientes com câncer de mama metastático foram o fator preditivo mais significativo para intervalo livre de progressão, assim como para sobrevida global (Cristofanilli et al., 2004). Estudos moleculares recentes de avaliação de múltiplos marcadores no sangue periférico confirmaram a expressão no sangue como marcador prognóstico e de quimiossensibilidade (Apostolaki et al., 2007; Ignatiadis et al., 2007; Strati et al., 2011) e as CTCs podem ser utilizadas como uma biópsia líquida para exames de seguimento, enquanto que a sua caracterização molecular pode ser traduzido em tratamento personalizado. (Wicha et al., 2011; Lianidou et al., 2011) Assim a detecção de CTC pode dar informações antecipadas sobre recaída e progressão da doença (Xenidis et al., 2006; Ignatiadis et al., 2008; Zhang et al., 2012). Por outro lado, as estratégias de tratamento individualizado com base na caracterização molecular de CTC poderia melhorar a eficácia (Georgoulis et al., 2012) e prever a resposta inicial ao tratamento (Scher et al., 2009; Tewes et al., 2009). Há cada vez mais evidências dos benefícios

potenciais do uso de detecção de CTC na prática clínica, e até agora existem mais de 400 estudos clínicos utilizando CTC como um biomarcador em vários tipos de tumores sólidos (Strati et al., 2013).

1.3. Métodos para detecção de células epiteliais circulantes em câncer de mama

Essencialmente dois tipos de técnica são mais utilizados para detecção de células epiteliais em pacientes com câncer de mama descritas na literatura: a imunohistoquímica e técnicas moleculares como a reação da polimerase em cadeia, após síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA mensageiro pela enzima Transcriptase Reversa (RT-PCR). A evolução da técnica de qPCR (PCR quantitativo), permite-nos hoje avaliar quantitativamente a presença de cópias de RNA mensageiro presentes em um dado tecido ou fluido.

1.3.1. Técnica de imunocitoquímica

O termo imunocitoquímica, ICC (ou imuno-histoquímica) se refere a um conjunto de reações que têm por objetivo demonstrar a presença de proteínas em tecidos ou células baseando-se na especificidade da reação antígeno-anticorpo que ocorre *in situ*, isto é, em cortes histológicos ou em preparados citológicos.

A revelação da reação é feita utilizando-se os chamados sistemas de detecção, mais frequentemente utilizando anticorpos conjugados com enzimas como, por exemplo, a peroxidase ou fosfatase alcalina, ou ainda com conjugados com compostos fluorescentes.

O princípio da pesquisa de células tumorais circulantes em pacientes com câncer de mama por ICC baseia-se na detecção de epítomos epiteliais e estruturas celulares com o uso de anticorpos que não reajam com as células mesenquimais. A maioria dos anticorpos empregados, como o antígeno epitelial de membrana (EMA), globulina lipídica do leite humano (HMFG) e as citoqueratinas (CK), é dirigida contra

componentes da membrana celular ou do citoesqueleto (Braun et al., 2005; Weinschenker et al., 2004). Esta técnica permanece ainda como padrão ouro para detecção de células tumorais circulantes, sendo que grande parte dos dados presentes na literatura foi obtida utilizando-se esta técnica em medula óssea (Zieglschmid et al., 2005).

As citoqueratinas (CK) constituem os principais componentes dos filamentos intermediários do citoesqueleto das células normais e neoplásicas de origem epitelial, servindo como um excelente marcador para essas células (Novaes et al., 1997; Braun et al., 2000). Anticorpos contra essas proteínas parecem ser altamente específicos, apresentando reações cruzadas em menos de 5% dos casos, embora existam relatos que estes não apresentem sensibilidade suficiente (Diel e Cote, 2000). A ICC possui alta sensibilidade, pois pode detectar uma célula neoplásica em até cerca de 10^6 células não tumorais (Pantel et al., 1999); porém oferece a desvantagem de sofrer interferências subjetivas e consumir muito tempo para sua realização. Entretanto, a ICC permite a caracterização morfológica das células coradas, permitindo a exclusão de elementos estranhos que apresentam reação cruzada.

Para aumentar a sensibilidade para detecção de células tumorais circulantes, uma alternativa seria a utilização de diversos anticorpos contra vários componentes das citoqueratinas simultaneamente, o que poderia, ao detectar mais de um epítipo, fazer frente à heterogeneidade fenotípica das células tumorais, sem prejuízo à sensibilidade do ensaio. Uma alternativa para aumento da sensibilidade para detecção de células tumorais circulantes por ICC é a adição ao protocolo de ICC de uma etapa prévia de enriquecimento imunomagnética (Naume et al., 1998). O enriquecimento imunomagnético consiste na passagem das células do sangue previamente por anticorpos monoclonais direcionados a antígenos epiteliais ligados a substâncias metálicas que, se submetidas a campo magnético, direcionarão preferencialmente as células tumorais para uma determinada fração celular que, agora, está enriquecida por estas células epiteliais. A vantagem desta técnica é que podemos analisar uma quantidade de células seis a sete vezes maior que na ICC sem enriquecimento, além de ter uma capacidade de detecção de células epiteliais cinco vezes maior quando comparadas com o emprego da ICC isoladamente. O enriquecimento prévio é essencial quando se pesquisa células epiteliais na FMNSP, pois no sangue periférico o número de destas células circulantes é menor do que na medula óssea (Ring et al., 2004). Um

grande avanço recente na técnica de imunocitoquímica foi à detecção automatizada de células epiteliais, o que permite aos patologistas avaliar várias lâminas de modo mais rápido e, por conseguinte, avaliar um maior volume de sangue total obtido da paciente, assim aumentando ainda mais a sensibilidade da técnica (Bauer et al., 2000).

1.3.2. Métodos moleculares

A pesquisa de células tumorais circulantes (CTC) pode ser realizada também por amplificação do seu DNA complementar (cDNA), pela técnica RT-PCR. Nesta técnica, após a extração do RNA, este sofre a ação da enzima transcriptase reversa, sendo então obtido o cDNA que é amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para antígenos epiteliais como a citoqueratina 19 (CK-19) (Manhani et al., 2001) e cerb-B2 (Fonseca et al., 2002).

Ensaio molecular são altamente sensíveis, tecnicamente simples, detecta CTC viáveis e tem a vantagem de poder ser desenvolvido *in silico*. Ademais, a CTC pode ser facilmente automatizada e possui sistemas de controle de qualidade interno e externo. Outra maior vantagem dos ensaios moleculares para detecção de CTCs é a flexibilidade, especialmente no formato multiplex, que pode diminuir significativamente a quantidade de amostra utilizada bem como o tempo e o custo da análise. (Strati et al., 2013)

A pesquisa de CK-19 por esta técnica é frequentemente utilizada, entretanto, apesar da sua alta sensibilidade (1 célula tumoral em até 10^6 - 10^7 células não tumorais) (Novaes et al., 1997; Diel e Cote, 2000) sua especificidade ainda é considerada baixa, devido à possibilidade de ocorrer a amplificação de pseudogenes do CK-19 ou de contaminação, já que fibroblastos, células endoteliais e inclusive linfócitos ativados podem expressar baixos níveis de citoqueratinas (Novaes et al., 1997; Kowalewska et al., 2006).

Um progresso recente da técnica de RT-PCR é o uso da amplificação quantitativa (PCR quantitativo) que permite, dentre os casos positivos, aquilatar diferenças de expressão gênica com possível valor prognóstico que passariam despercebidas pela técnica de PCR usual, na qual só poderíamos constatar positividade ou negatividade da reação (Slade et al., 1999; Gelmini et al., 2001). A informação quantitativa acerca do

número de cópias de um dado RNA mensageiro presente em um determinado tecido ou fluido mensurável pela técnica de RT-PCR quantitativo já foi largamente utilizada na literatura (Zehentner et al., 2006; Ignatiadis et al., 2007).

A sensibilidade e a especificidade da técnica de RT-PCR podem ainda ser aumentadas, quando esta técnica é combinada com a técnica de captura imunomagnética e com a utilização simultânea de vários genes mamários – específicos. O ideal seria empregarmos marcadores universalmente e unicamente expressos em células do câncer de mama; entretanto, até o momento nenhum marcador que preencha estes critérios foi identificado, havendo, portanto, a necessidade do uso de vários marcadores simultaneamente. Constituem exemplos de marcadores frequentemente utilizados, além do CK-19: mamaglobina, antígeno carcinoembrionário, sub-unidade π do ácido gama aminobutírico, Erb2, receptor do fator de crescimento epidérmico, entre outros. (Reinholz et al., 2005; Hager et al., 2005; Zehentner et al., 2006; Ignatiadis et al., 2007).

1.4. O significado da presença de células tumorais na medula óssea e sangue periférico

Células epiteliais circulantes e aquelas presentes na medula óssea albergam alterações cromossômicas (aneusomias e amplificações) comumente presentes nos tumores primários dos quais se originaram (Muller et al., 199; Klein et al., 1999). Um estudo conduzido por Gangnus et al. (2004) submeteu à técnica de hibridização genômica de células individuais células epiteliais presentes na MO de pacientes com câncer de mama, após sua separação por técnicas de imunocitoquímica e cultivo *in vitro*. Este estudo revelou que estas células epiteliais albergavam várias alterações genéticas, algumas das quais inclusive ausentes nos tumores primários. Resultados interessantes foram obtidos por Smirnov e colaboradores, que submeteram o produto do enriquecimento imunomagnético de células tumorais circulantes oriundo do sangue periférico de pacientes com tumores metastáticos de mama, cólon e próstata à técnica de perfilamento gênico. Estes autores descrevem um padrão peculiar de expressão gênica das células tumorais circulantes (Smirnov et al., 2005). A conclusão que se pode chegar com tais dados é que células epiteliais presentes na MO de pacientes com câncer de

mama são neoplásicas e que, assim como no tumor primário, estão submetidas a uma pressão seletiva que, associada à instabilidade genética inerente ao processo neoplásico, pode conferir independência de crescimento que favorece o desenvolvimento de metástases.

Do ponto de vista proliferativo, estas células epiteliais presentes na MO de pacientes com câncer de mama são geralmente quiescentes, o que poderia contribuir para a resistência a agentes quimioterápicos (Pantel et al., 1993) que dependam do processo de divisão celular para atuar como, por exemplo, antimetabólitos. Curiosamente, em relação à quimioterapia antineoplásica, como veremos adiante, alguns trabalhos demonstraram diminuição de tais células após quimioterapia antineoplásica (Slade et al., 1999; Fonseca et al., 2002; Cristofanilli et al., 2004). Esses resultados, entretanto, não são consensuais entre todos os autores (Braun et al., 2000).

As células epiteliais aparentemente quimiorresistentes podem ser eliminadas por anticorpos monoclonais para antígenos epiteliais (Braun et al., 1999; Kirchner et al., 2002), incluindo o Trastuzumab (Bozionellou et al., 2004) que é específico para ligação com a proteína ErbB2. A proteína ErbB2, hiperexpressa em cerca de 30% dos casos de carcinoma mamário, é, possivelmente, por uma pressão seletiva inerente ao processo metastático, hiperexpressa em um percentual maior do que nas células tumorais disseminadas pela MO e FMNSP (Pantel et al., 1993; Fonseca et al., 2002; Bozionellou et al., 2004). É possível que esta possibilidade de eliminar células neoplásicas quimiorresistentes disseminadas seja responsável e possa explicar pelo menos parte do efeito sinérgico do Trastuzumab à quimioterapia antineoplásica convencional (Slamon et al., 2001; Romond et al., 2005).

Embora devamos interpretar com cautela, alguns estudos sugerem a existência de *stem cell* do câncer de mama, (Liu et al., 2005; Wicha et al., 2006) que teria a propriedade de se auto-renovar e se diferenciar, formando micrometástases. Por analogia a “*stem cell* normal”, esta célula permaneceria em estado de dormência até serem ativadas por estímulos apropriados do meio ambiente, readquirindo então suas propriedades e originando metástases. Assim, questiona-se se algumas destas células tumorais circulantes não seriam verdadeiras “*stem cells*” do câncer de mama e, portanto, esta representaria a célula tumoral circulante “perigosa”. Estudos têm sido realizados no sentido de identificá-las (Glinsky et al., 2005; Hill, 2006) e melhor caracterizá-las.

1.5. Significado clínico das células tumorais circulantes em pacientes com câncer de mama.

Em 2005, Braun et al. avaliaram dados individuais de pacientes oriundos de nove estudos em relação à presença de células epiteliais na medula óssea de pacientes com câncer de mama. Alguns destes estudos foram incluídos na meta-análise de Weinschenker et al., (2004) previamente conduzida com os dados publicados destes estudos. Nesse estudo, foram incluídos 4.703 pacientes com carcinoma mamário em estadio clínico I, II, ou III. O período de seguimento foi de 10 anos (mediana de 5,2 anos) e a análise estatística foi conduzida por regressão multivariada de Cox. Detectaram-se células epiteliais em 30.6% das pacientes. A presença de células epiteliais na MO se correlacionou significativamente com maior tamanho e grau histológico do tumor, assim como com maior frequência de comprometimento linfonodal e negatividade para receptores hormonais. A presença de células epiteliais na MO se correlacionou ainda significativamente com sobrevida global e específica menores (taxa de mortalidade univariada de 2,15 e 2,44, respectivamente, $P < 0,001$ para ambas), com menor sobrevida livre de doença e tempo para metástases sistêmicas (taxa de incidência 2,13 e 2,33, respectivamente, $P < 0,001$ para ambos) por análise multivariada. Note-se também que o valor prognóstico do encontro de células epiteliais na MO destas pacientes existiu também para aquelas com ausência de linfonodo axilar acometido e que receberam ou não tratamento adjuvante.

Desses dois estudos que sistematicamente avaliaram os estudos mais importantes conduzidos até o momento acerca do valor prognóstico de células epiteliais na MO de pacientes com câncer de mama. Pode-se concluir que células epiteliais na MO de pacientes com câncer de mama inicial representam um fator de prognóstico adverso potencialmente importante quando do seu diagnóstico. É possível, entretanto, que seu valor diminua com o tempo, isto é, após alguns anos de seguimento, se a paciente não recaiu, o valor prognóstico de tê-las tido na sua medula óssea células epiteliais é provavelmente menor.

Outro estudo interessante publicado por Cristofanilli et al. (2004) avaliou o valor prognóstico da avaliação de células tumorais circulantes no sangue periférico de pacientes com câncer de mama metastático. Neste estudo, foi utilizada uma técnica de

enriquecimento imunomagnético seguida de detecção semi-automatizada de células epiteliais. Estes autores observaram que, em 177 pacientes, aquelas que tinham mais do que cinco células epiteliais circulantes por 7,5 ml de sangue antes da instituição de tratamento sistêmico evoluíram significativamente pior, tanto em termos de intervalo livre de progressão de doença (2,7 meses vs. 7,0 meses, $P < 0,001$) como de sobrevida global (10,1 meses vs. > 18 meses, $P < 0,001$), quando comparadas com aquelas com menos do que cinco células epiteliais circulantes por 7,5 ml de sangue. Após a instituição de tratamento sistêmico, aquelas pacientes que mantiveram um número maior do que 5 células epiteliais também evoluíram significativamente pior do que aquelas que tinham um número menor de células epiteliais circulantes, tanto para intervalo livre de progressão de doença (2,1 meses vs. 7,0 meses; $P < 0,001$) como para sobrevida global (8,2 meses vs. > 18 meses; $P < 0,001$). Utilizando análise multivariada, observou-se que os níveis de células epiteliais circulantes foram o fator preditivo mais significativo para intervalo livre de progressão como para sobrevida global. Tal estudo demonstra que é possível pesquisar células epiteliais no sangue periférico de pacientes com câncer de mama metastático e que a sua presença pode ser quantificada. Ainda, esse dado pode ter valor prognóstico e também refletir o sucesso do tratamento sistêmico. Outros autores também obtiveram resultados semelhantes (Nolé et al. 2008).

Bidard et al. (2008) compararam a detecção de células tumorais circulantes no sangue periférico com a avaliação da presença de células tumorais nos aspirados medulares de mulheres com câncer de mama metastático. Esses autores demonstraram que, enquanto a presença de células tumorais nos aspirados medulares de 138 mulheres portadoras de doença neoplásica se correlacionou significativamente com a presença de metástases ósseas, apenas a avaliação quantitativa da presença de células circulantes em 37 das 138 pacientes que tiveram seu sangue periférico estudado correlacionou significativamente com uma menor sobrevida.

Câmara e colaboradores estudaram a presença de células tumorais circulantes (CTC) em sangue periférico de 58 pacientes com câncer de mama, não metastáticas, tendo como objetivo monitorar as CTC durante a neoadjuvância e comparar com resposta do tumor primário, mensurado por ultrassonografia. As CTC responderam de maneira idêntica ao tumor primário à neoadjuvância. Portanto, as CTC poderiam ser empregadas para monitorar a eficácia da quimioterapia anti-cancer de mama (Camara et al., 2007).

Após o estudo no cenário neoadjuvante, Lododash (2007) monitorou CTC no sangue periférico de 25 pacientes com câncer de mama, não metastáticas, durante a adjuvância, e demonstrou que as 19 pacientes que apresentaram declínio no número de CTC não recidivaram, enquanto que as seis pacientes que tiveram um aumento maior que dez vezes do número de CTC, cinco apresentaram metástase à distância e uma paciente aconteceu recidiva local, num período de seguimento de 4,5 anos. Esses resultados sugerem que a dinâmica das CTC é preditiva da evolução, auxiliando a detectar quais são as pacientes com risco de recidiva precoce (Lobodasch et al., 2007; Pachmann et al., 2008). Os resultados em conjunto corroboram o valor prognóstico do monitoramento das CTC como uma ferramenta para avaliar resposta à quimioterapia.

Em paralelo ao desenvolvimento de técnicas de ICC, técnicas moleculares como o RT-PCR foram desenvolvidas para a detecção de células epiteliais na FMNSP. Em nosso grupo, Novaes e colaboradores mostraram que a sensibilidade da técnica de RT-PCR para a detecção de células que expressam citoqueratina 19 (CK-19) na FMNSP era de 1 para 10^6 (Novaes et al., 1997). Em seguida, Manhani et al. (2001), em nosso laboratório, avaliaram 53 pacientes com amostras seriadas de sangue periférico colhidas antes, durante e depois da instituição de quimioterapia neoadjuvante, adjuvante ou paliativa e submeteu-as à técnica de RT-PCR para detecção de células que expressassem CK-19. Os autores observaram que o percentual de amostras positivas para CK-19 por RT-PCR caiu de 43% (23/53) antes da instituição de quimioterapia para 14.3% (7/49), e 18.9% (7/37) depois de três e seis ciclos de tratamento, respectivamente ($P = 0,0048$). Houve também uma correlação significativa entre negatividade para CK-19 por RT-PCR e resposta à quimioterapia após três meses de tratamento ($p = 0.024$).

Fonseca et al. do nosso grupo, em 2002, utilizaram a técnica de RT-PCR para a detecção de células epiteliais que expressassem o gene HER2. No laboratório da Faculdade de Medicina do ABC, esta técnica atingiu uma sensibilidade de $1:10^6$ e especificidade de 90%. Ao avaliar 16 pacientes com câncer de mama, observou-se positividade deste ensaio na FMNSP de 25% delas antes da instituição de quimioterapia. Foi observado que nas pacientes em que pelo menos uma das amostras foi positiva para expressão de ErbB2, 80% das amostras positivas foram obtidas fora de tratamento quimioterápico, enquanto 10% o foram durante o tratamento. Outro resultado interessante foi a positividade em pelo menos uma amostra para HER2 em

duas pacientes em que nenhuma amostra foi positiva para CK-19, dessa maneira o resultado de HER2 complementa a avaliação anterior realizada para detecção de CK19.

Soares et al. (2003) também de nosso grupo, procuraram sumarizar de forma sistemática a literatura existente sobre a pesquisa de células neoplásicas por RT-PCR no sangue periférico de pacientes com câncer de mama incluindo estudos que continham pelo menos 10 pacientes com câncer de mama e um grupo controle sem câncer de mama. Foram identificados 24 estudos elegíveis com 1.313 pacientes e 627 controles. Utilizaram-se nestes estudos técnicas de RT-PCR para avaliação de expressão de 10 marcadores moleculares. Observou-se uma sensibilidade global de 35% (IC 95%:32 – 38%) e especificidade de 84% (IC 95%:79 – 88%). Notou-se também nestes estudos várias falhas metodológicas como, por exemplo, a utilização de diferentes tipos de controles, coletas de amostras em diferentes momentos da evolução clínica das pacientes e a falta de uma técnica de padrão-ouro para se comparar os resultados do RT-PCR. Por estas limitações metodológicas dos estudos selecionados, não conseguimos aquilatar o valor prognóstico da detecção de CTC por RT-PCR na FMNSP de pacientes com câncer de mama. Com o advento da técnica de RT-PCR quantitativa (Gianni et al., 2005) e a utilização de múltiplos marcadores simultaneamente como, por exemplo HER2 e CK-19, esta área de pesquisa está em franco desenvolvimento.

De fato, dados confirmando o valor do monitoramento do sangue periférico molecularmente pela técnica de PCR quantitativo já foram também reportados na literatura (Apostolaki et al., 2007; Ignatiadis et al., 2007). Apostolakis et al. (2007) demonstraram que a detecção de células circulantes que expressem RNA mensageiro para HER2 após o tratamento adjuvante se relaciona a um pior intervalo livre de doença em mulheres com câncer de mama inicial. Ignitiadis et. al (2007), estudando a detecção simultânea de RNA mensageiro para CK-19 e HER2 no sangue periférico de pacientes com carcinoma de mama inicial através da técnica de PCR quantitativo antes do início da quimioterapia adjuvante, também demonstrou um intervalo livre de recidiva significativamente menor para aquelas com a presença da dupla expressão destas moléculas em seu sangue periférico.

Slade et al. (1999) compararam as técnicas de RT-PCR quantitativo de imunodetecção de células circulantes e encontraram boa correspondência entre ambas as técnicas; achados positivos por ambas as técnicas também tiveram correspondência com o prognóstico das pacientes estudadas (Smith et al., 2000).

1.6. Citoqueratina 19 (KRT19)

As citoqueratinas são filamentos intermediários de células epiteliais, especialmente a KRT19 (comumente conhecida como CK19), e são amplamente utilizadas para detectar células tumorais derivadas de tecidos epiteliais. (Ge et al., 2005; Zhong et al., 2006) A CK19 está correlacionada a um pior resultado clínico em pacientes com câncer de mama (Xenidis et al., 2007).

Há duas classes distintas de queratinas: tipo I, pequenas e ácidas, codificadas pelos genes CK9 localizados no cromossomo 17 (exceto o CK18 que está no cromossomo 12) e as queratinas do tipo II, que têm maior peso molecular e são básicas ou neutras, codificadas pelos genes CK1 a CK8, localizados no cromossomo 12. A expressão de citoqueratina em tecido epitelial ocorre aos pares e dois polipeptídeos de uma subfamília formam tetrâmetros. Os genes que codificam as citoqueratinas individuais estão expressos em várias combinações ao longo da diferenciação epitelial e este padrão pode ser característico de um tecido. Citoqueratinas 8, 18 e 19 são características de epitélio simples e aparecem em células luminiais de mama (Folgueira, 2004).

Células do epitélio normal expressam pelo menos um tipo I e um tipo II de queratina. As citoqueratinas formam o citoesqueleto das células epiteliais e sua principal função é manter a integridade da célula. No entanto, outras funções incluem papéis na sinalização celular, respostas ao estresse, e apoptose (Coulombe et al., 2002).

CK19 é uma das três queratinas (além da CK8 e CK18) que se expressam no epitélio simples ou estratificado e em diversos carcinomas, incluindo câncer de mama (Chu et al., 2002); a molécula de CK19 é clivada pela caspase 3, e os fragmentos solúveis são liberados e detectados em pacientes com câncer (Pujol et al., 1993).

A detecção de células CK19 positivas no sangue periférico de pacientes com câncer de mama antes de iniciarem qualquer tratamento adjuvante é um fator prognóstico independente associado com o crescimento do risco de recorrência da doença e diminuição da sobrevida (Stathopoulou et al., 2002).

1.7. ERBB2

ERBB2 (mais comumente chamado de HER2) pertence à família de receptores do fator de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR). Esta família desempenha funções essenciais em vários processos celulares, incluindo a determinação de linhagem celular, proliferação e sobrevivência celular e morfogênese de órgãos (Yarden, 2001; Negro et al., 2004). A família EGFR de receptores tirosina quinases é composta por EGFR (ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). HER2 tem sido relacionado a vários cânceres humanos. O oncogene c-erbB-2 (HER2/neu) está localizado na região cromossômica 17q21 e codifica um receptor glicoproteico transmembrana denominado p185neu/ p285erB-2 (Leitzel et al., 1995; Fiche et al., 1999).

Cada receptor abrange um domínio extracelular no qual ocorre a fixação do ligante a um segmento transmembrana α -helicoidal e um domínio intracelular da proteína tirosina-quinase (Olayioye et al., 2000). A dimerização do receptor (pareamento) é um requisito essencial para a função de ERBB e para a atividade de sinalização desses receptores (Olayioye et al., 2000; Ferguson et al., 2003). A dimerização pode ocorrer entre dois receptores ERBB (heterodimerização) ou entre duas moléculas do mesmo receptor (homodimerização).

Em células normais, a ativação dos receptores da família tirosina quinase por ligantes e/ou fatores de crescimento epidérmicos desencadeia vias de sinalização que controlam o crescimento celular normal, diferenciação e motilidade. A conexão dos ligantes extracelulares como o fator de crescimento epidérmico (EGF) com domínio de EGFR resulta na homodimerização dos receptores, na ativação da tirosina quinase e na autofosforilação, iniciando assim uma cascata de sinalização mitótica (Burgess et al., 2003; Cho et al., 2003; Hobbs et al., 2004; Yarden et al., 2004).

A desregulação do processo de sinalização é um aspecto crítico em muitos tipos de cânceres. O receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), assim como os outros membros da família EGFR, estão envolvidos na cascata de sinalização de crescimento e diferenciação celular. Já está bem estabelecido que a heterodimerização mediada por HER2 tem importante consequência no câncer (Franklin et al., 2004; Allen et al., 2007; Ferguson, 2008). A desregulação das vias de sinalização

e a superexpressão de HER2 é conhecida por ocorrer em células do câncer, o que indica uma função deste receptor na tumorigênese (Nahta e Esteva, 2003; Perez-Soler, 2004).

A região extracelular do HER2 consiste em quatro domínios (I-IV). O domínio II é conhecido por participar da dimerização com outros receptores HER (Burgess et al., 2003; Cho et al., 2003; Baselga e Swain, 2009). O domínio IV tem um importante sítio de clivagem para metaloproteinases de matriz (MMP). O anticorpo herceptin (Trastuzumab) se liga ao domínio IV e inibe o sítio de clivagem da MMP. Isto leva a uma indireta inibição da dimerização e fosforilação (Molina et al., 2001; Burgess et al., 2003; Franklin et al., 2004). Muitos agentes terapêuticos direcionados contra o HER2 têm fornecido alternativas promissoras aos tradicionais quimioterápicos não específicos (Wissner et al., 2003; Rabindran et al., 2004; Fink et al., 2005).

A amplificação e a superexpressão de HER2 foram relatadas em diversos tumores humanos e está amplificado ou superexpresso em aproximadamente 25 a 30% dos cânceres de mama invasivo primário. *Status* de HER2 positivo tem sido relacionado com um comportamento mais agressivo do tumor e resistência à terapia citotóxica e endócrina (Slamon et al., 1989; Konecny et al., 2003; Moliterni et al., 2003). Pacientes com amplificação do HER2 e/ou superexpressão são elegíveis para tratamento HER2-alvo (Burstein et al., 2010; Gianni et al., 2010; Baselga et al., 2010).

Para detectar a expressão do HER2, diferentes procedimentos diagnósticos têm sido previamente estabelecidos. No entanto, a caracterização do *status* de HER2 nas pacientes ainda permanece um problema metodológico (Benöhr et al., 2005).

1.8. Biomarcadores do câncer de mama

1.8.1. Perfilamento genético de tumores mamários como um fator de prognóstico para pacientes com câncer de mama.

Os carcinomas mamários são heterogêneos do ponto de vista molecular (Pusztai, 2008). Quatro subtipos de carcinoma mamário emergiram a partir do perfilamento genético de vários casos desta doença: Luminal A, Luminal B, Basal e com padrão de

tumores positivos para HER2 (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003). Os tumores luminais expressam receptores hormonais de estrogênio e progesterona e geralmente têm um melhor prognóstico (Pusztai, 2008).

Foram desenvolvidas pelo menos três plataformas de perfilamento gênico com potencial utilidade prognóstica para mulheres com carcinomas mamários: a plataforma de Rotterdam com 76 genes (Wang et al., 2005); a plataforma Oncotype, que avalia um conjunto de 21 genes (Paik et al., 2004) e a plataforma com 76 genes (Mammaprint®) (van der Vijver et al., 2002).

A plataforma de 21 genes (Oncotype®) tem a vantagem, em relação às demais, de poder ser empregada em material parafinado. A escolha destes 21 genes deriva da escolha de cinco genes de referência e de 16 genes-alvo cuja expressão medida por RT-PCR teve o maior poder de discriminação prognóstica em um conjunto de 447 pacientes com carcinoma mamário. Blocos parafinados destas 447 pacientes, cujos desfechos clínicos eram conhecidos *a priori* por terem participado em estudos clínicos como NSABP B20 serviram para estabelecer esta plataforma, e a análise conjunta da expressão dos 21 genes derivou para cada caso uma pontuação (score). Essa pontuação varia de 0 a 100, sendo que de 0 a 18 considera-se uma pontuação de bom prognóstico, entre 18 e 31 como de prognóstico intermediário e acima de 31, como de prognóstico pior (Paik et al., 2004).

Os 21 genes selecionados para compor a plataforma Oncotype estão envolvidos em importantes processos ligados a carcinogênese mamária tais como invasão, proliferação e vias relacionadas a receptores hormonais e sinalização de HER2. Dentre os genes, há: 1) Cinco genes de referência que servem para normalizar a expressão dos demais 16 genes (*ACTB* -que codifica a actina, *GAPDH*, *GUS*, *RPLPO* e *TFRC*); 2) Grupo de genes relacionado a proliferação: Ki-67, *STK15*, Survivina, *CCNB1*, *MYBL2*; 3) Grupo de genes relacionados a invasão (*MMP11*-stromolisina 3 e *CTSL2* (cathepsina L2)); 4) Grupo de genes relacionados ao HER2: *GRB7* e *HER2*; 5) Grupo de genes relacionados a via estrogênica: *ER*, *PGR*, *BCL2* e *SCUBE2*; 6) outros genes: *GSTM1*, *CD68* e *BAG1* (Paik et al., 2004). A validade prognóstica da pontuação oriunda da aplicação da plataforma de 21 genes também já foi validada em diferentes populações de pacientes (Habel et al., 2005).

A validação externa desta plataforma de 21 genes ocorreu com material oriundo de 668 blocos parafinados de pacientes envolvidas no estudo do grupo cooperativo

americano NSABP B14 (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*). Esse estudo se restringiu à utilização de pacientes com linfonodos axilares não comprometidos e tumores com expressão de receptores hormonais e incluiu 2892 pacientes que foram aleatorizadas para receber placebo ou Tamoxifeno entre janeiro de 1982 e janeiro de 1988.

Posteriormente, 1.235 pacientes adicionais foram incluídas de janeiro de 1988 a outubro de 1988, tendo todas estas últimas recebido tamoxifeno (Fisher et al., 2004). Nesse estudo de validação externa da plataforma de 21 genes, observou-se que 51% das pacientes tinham pontuações de bom prognóstico, enquanto que 22% tinham pontuações de prognóstico intermediário e 27%, de prognóstico ruim. Para estes grupos, as taxas de recidiva à distância em 10 anos foram respectivamente de 6,8%, 14,3% e de 30,5%, ($p < 0,001$ para a comparação dos grupos de prognóstico bom e ruim). Em uma análise multivariada, a pontuação obtida com o uso desta plataforma de perfilamento foi independentemente e significativamente relacionado à recidiva a distância e sobrevida global ($p < 0,001$ para ambas análises). A pontuação oriunda da aplicação desta plataforma se revelou independente de variáveis prognósticas clássicas neste estudo, tais como idade e tamanho do tumor (Paik et al., 2004).

A pontuação oriunda da aplicação desta plataforma de 21 genes demonstrou também correlação significativa com a taxa de resposta patológica completa, após quimioterapia neoadjuvante (Gianni et al., 2005). Em outro estudo, no qual se analisaram 651 pacientes incluídas no estudo NSABP B20 que receberam tamoxifeno (227) ou tamoxifeno associado à quimioterapia (424), a pontuação resultante da plataforma de 21 genes separou grupos de pacientes com diferentes sensibilidade e benefício da quimioterapia. Pacientes com pontuações de mau prognóstico (alto risco) foram as que mais se beneficiaram, enquanto a quimioterapia não beneficiou as pacientes com pontuações de bom prognóstico (baixo risco) (Paik et al., 2006).

O estudo Taylor (*Trial Assigning Individual Options for Treatment*) deverá responder de forma prospectiva se a escolha do tratamento ministrado às pacientes de acordo com a pontuação oriunda da aplicação da plataforma de 21 genes poderá ou não melhorar os resultados de sobrevida global e de sobrevida livre de recidiva em mulheres com axila negativa e tumores com expressão de receptores hormonais. Neste estudo, pacientes com pontuação de baixo risco receberão hormonioterapia, aquelas de alto

risco quimioterapia e hormonioterapia e as de risco intermediário serão aleatorizadas para quimioterapia e hormonioterapia *versus* hormonioterapia exclusiva (Pusztai, 2008).

1.9. Plexor® qPCR System

O Sistema Plexor mede a amplificação de sequências-alvo através da incorporação de um *primer* modificado (contendo uma base iso-dC e uma marca fluorescente na extremidade 5') e de um segundo *primer* não marcado, que contém uma base iso-dG (Krenke, 2005). (Figura 1). Durante os ciclos de amplificação, a incorporação de uma molécula *quencher* dabcyI-iso-dGTP na posição complementar a iso-dC (Hooper, 2005) resulta na diminuição do sinal fluorescente pelo DabcyI proporcional à quantidade de DNA inicial. Assim, ao contrário do que é visualizado quando SybrGreen ou TaqMan são utilizados (ganho de sinal), temos uma queda na emissão de fluorescência à medida que há amplificação de produto específico. A análise dos resultados através de software específico inclui a exibição de curva de amplificação (Figura 2a), curva de dissociação para a informação da temperatura de dissociação e especificidade de produto (Figura 2b) e curva padrão baseada nos valores limiares C_q (usada para quantificar as amostras com base nas referências geradas pelas amostras conhecidas).

FONTE: Manual técnico Plexor® qPCR System

Figura 1. Esquema ilustrando o processo do sistema Plexor

Figura 2. Representação de curva de amplificação (a) e de dissociação (b) geradas por amplificação com o sistema Plexor e analisadas com o software *Plexor Data Analysis*.

Dentro desse panorama de adequar novas metodologias para avaliação prognóstica de pacientes com câncer de mama que possam auxiliar a conduta clínica, idealizamos para a avaliação de potenciais biomarcadores desta doença um modelo laboratorial específico, que avalie tanto a capacidade de um dado biomarcador rastrear um tumor inicial de mama, bem como testar o seu potencial valor para o seguimento de mulheres já diagnosticadas durante seu tratamento. O estudo conjunto da expressão de

marcadores epiteliais (CK-19 e HER2) na fração mononuclear do sangue periférico e perfilamento gênico tumoral pode eventualmente auxiliar na conduta do tratamento.

2. OBJETIVOS

- 1) Estabelecer o protocolo de PCR quantitativo para detecção de células tumorais circulantes na fração mononuclear do sangue periférico através do estudo da expressão dos marcadores epiteliais CK-19 e c-ErbB-2;
- 2) Realizar a detecção de células tumorais circulantes por PCR quantitativo ao longo do tratamento;
- 3) Determinar o perfilamento gênico tumoral através da análise da expressão de 21 genes para gerar uma pontuação (escore) de avaliação prognóstica de pacientes com câncer de mama.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Para obtenção de dados da avaliação dos marcadores tumorais CK19 e HER2 no sangue periférico e expressão gênica da plataforma de 21 genes para a geração de um escore de recidiva, foram analisadas amostras biológicas de 167 pacientes, sendo 39 pacientes com carcinoma mamário estádios I, II e III com indicação de quimioterapia adjuvante advindas do Hospital Estadual Mário Covas e 126 pacientes incluídas pelo Hospital de Câncer de Barretos (HCB). Esta grande casuística de tumores avançados e iniciais, a grande capacidade de estocagem de material oriundo de tumores mamários no seu banco de tumores (que já conta com mais de 10.000 casos de diversos tipos de amostras já estocados) e a grande aderência ao tratamento pelos pacientes que frequentam o HCB com pequena perda de seguimento foram a base para a obtenção da maior parte de material biológico e dados clínicos para o estudo seriado dos biomarcadores descritos a seguir.

A indicação de quimioterapia adjuvante ocorreu de acordo com os seguintes critérios: a) Tumores maiores que 1 cm com axila negativa, mas com características desfavoráveis (grau III, receptores hormonais negativos); b) Tumores com axila positiva.

As amostras sanguíneas foram distribuídas entre tubos com anticoagulante EDTA (15,0 mL) e tubo sem anticoagulante, seco (5,0 ml). As amostras foram colhidas ao diagnóstico, a cada 21 dias antes de cada novo ciclo de quimioterapia e de três em três meses após o término da quimioterapia até completar 06 meses de seguimento após o término do tratamento quimioterápico proposto pela oncologista clínica. Na punção venosa, primeiro foi introduzido o tubo seco a fim de se evitar contaminação de células epiteliais no momento da coleta e em seguida coletados os tubos com EDTA destinados a extração de RNA e posterior estudo da citoqueratina 19 e do receptor do fator de crescimento epidermal 2.

O material oriundo da biópsia do tumor original, nos casos nos quais foi feita quimioterapia neoadjuvante, ou da peça operatória, nos casos nos quais se fez

quimioterapia adjuvante foram analisados para perfilamento gênico pela plataforma de 21 genes e para estudo das variáveis patológicas clássicas tais como tamanho do tumor, grau de diferenciação e número de linfonodos axilares acometidos.

Os tubos contendo EDTA foram homogeneizados e em um deles foi realizado o hemograma completo para caracterização quantitativa e qualitativa das células hematológicas das pacientes incluídas no estudo. Os outros tubos foram utilizados para a separação da fração mononuclear do sangue periférico e posterior extração de RNA, conforme descrito a seguir.

3.2. Separação da fração mononuclear do sangue periférico

A fração mononuclear foi obtida a partir das amostras coletadas em quatro tubos contendo anticoagulante EDTA foram transferidas para um tubo cônico de 50 ml e adicionada uma solução de lise contendo 6,1g de cloreto de amônio e 0,79 g de bicarbonato de amônio para cada 1000 ml de água Milli-Q na proporção de três vezes o volume da amostra. Essa mistura foi submetida à constante agitação em uma cuba de gelo por 30 minutos. Em seguida o lisado foi centrifugado a $1.620 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e para uma melhor separação foi adicionado mais 15 ml de solução de lise ao sedimento celular e submetido novamente a centrifugação sob as mesmas condições descritas acima. Novamente o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi utilizado para extração de RNA conforme descrito abaixo.

3.3. Extração de RNA total

3.3.1. Tecido Parafinado

Para a extração de RNA de material emblocado, foram utilizadas duas ou três secções de 10 µm por bloco, obtidas com o auxílio de um micrótomo e o *RNeasy FFPE kit* (Qiagen, cat. no. 74404, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. O material extraído foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Suécia).

3.3.2. Sangue Periférico

Para a extração do RNA das amostras sanguíneas foi adicionado ao sedimento celular um ml do reagente Trizol ® e essa mistura foi deixada em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente em seguida foi homogeneizada com uma seringa de 5 ml e agulha de diâmetro 30X7 mm. A esta mistura foi adicionado 200 µl de clorofórmio, homogeneizado e submetido à centrifugação a 5400 x g por 15 minutos a 4 °C. Foi obtida uma mistura trifásica, cerca de 600 µl da fase aquosa desta mistura foi cuidadosamente separada e transferida para um microtubo de 1,5 ml e acrescentado 500 µl de isopropanol e, posteriormente, incubado em gelo por 30 minutos para a completa precipitação do RNA total.

Após a incubação a amostra foi centrifugada a 5400 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e foi acrescentado um ml de etanol a 70% e em seguida centrifugado a 2700 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e precipitado de RNA foi seco brevemente e ressuspenso em 25 µl de água deionizada e em seguida estocado em um freezer -80 °C.

A concentração de RNA total foi estimada através da utilização de espectrofotometria GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Suécia), nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, onde a absorbância de 260 nm corresponde a DNA/RNA e proteínas das amostras, enquanto que o comprimento de onda 280 nm corresponde unicamente a proteínas. Somente foram utilizadas amostras com relação 260/280 nm maior que 1,6.

3.4. Tratamento com DNase I

Com o intuito de evitar qualquer contaminação das amostras com DNA genômico, as amostras de RNA total obtidas foram submetidas a tratamento com DNase I® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para o equivalente a um µg de RNA total foi adicionado um µl do Buffer 10x, um µl da enzima DNase I e água deionizada até completar 10 µl. As amostras então foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida foi acrescentado 1 µl de EDTA 25 mM e incubadas a 65 °C por 10 minutos. A concentração do RNA foi novamente medida e em seguida as amostras foram submetidas à síntese de cDNA.

3.5. Síntese do DNA complementar

Um micrograma de RNA total que corresponde aproximadamente a 50 ng de RNAm foi utilizada na síntese de DNA complementar (cDNA), através da enzima Superscript III RNase transcriptase reversa (Invitrogen®) seguindo as orientações do fabricante.

3.6. RT-PCR quantitativo em tempo real para CK19 e HER2

A expressão dos marcadores epiteliais CK19, HER2 foram avaliadas através de qPCR com 1X SYBR Green Master Mix (SABioscience). Todas as reações foram realizadas em triplicata, acompanhadas de controle positivo/amostra calibradora (linhagem tumoral MCF-7), controle negativo (sem cDNA) e curva de eficiência do *primer*. A expressão de ambos os marcadores foi normalizada pela expressão do gene referência GAPDH.

Para o marcador CK19 e o gene de referência GAPDH, foram utilizados *primers* RT² qPCR (Super Array Bioscience Corporation®) seguindo o seguinte protocolo: para

15 µl de volume final de reação, foram adicionados 7,5 µl de tampão 2x RT² Real Time SYBR Green PCR Master Mix, 0,6 µl de DNAC, 0,6 µl de RT² PCR Primer Assay. O volume foi completado utilizando-se água deionizada. Utilizamos o termociclador ABI7500 (Applied Biosystems) com a seguinte condição de ciclagem: 95 °C, 10 minutos; 40 ciclos de (95 °C, 15 segundos; 60 °C, 60 segundos).

Para estudo de HER2, foi utilizado o seguinte protocolo: para 15 µl de volume final de reação, foram adicionados 7,5 µl de tampão 2x RT² Real Time SYBR Green PCR Master Mix, 100 nM de cada *primer* (FW CCCTCTGAGACTGATGGCTACG e RV GCCGAACATCTGGCTGGTT), 0,6 µl de cDNA, o volume foi completado utilizando-se água deionizada.

3.7. Desenho de *primers* específicos para amplificação multiplex

Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3 Input* 0.4.0 software, disponível no endereço <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. As sequências de *primers* desenhadas foram checadas quanto a sua especificidade pelo programa *Primer-BLAST*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. As sequências de *primers* estão sob sigilo de patente. Na tabela 1 verificam-se os genes utilizados para os ensaios de qRT-PCR com os respectivos tamanhos de produto esperado.

Tabela 1. Genes e tamanho dos amplicons analisados neste estudo

Gene	Tamanho do produto
RPLP0	64 bp
ER	75 bp
GUSB	62 bp
BAG1	68 bp
BCL2	102 bp
Survivina	63 bp
HER2	79 bp
CD68	63 bp

CCNB1	66 bp
TRFC	87 bp
STK15	70 bp
MMP11	62 bp
GSTM1	66 bp
GRB7	64 bp
PGR	79 bp
MYBL2	67 bp
SCUBE2	53 bp
B-actina	Não fornecido
GAPDH	Não fornecido
Ki-67	107 bp
CTSL2	83 bp

3.8. Validação dos *primers* para amplificação multiplex

Os pares de *primers* foram inicialmente sintetizados sem marcação e testados na amplificação de seus alvos em cDNA de MCF-7, utilizando o sistema SYBr Green. As reações de amplificação ocorreram em um volume final de 20µL, contendo 1X SYBR Green Master Mix (Qiagen, cat no. 204054), 10 pmol de cada *primer* e 2,0 µL de cDNA de MCF-7 diluído 50X. O perfil térmico utilizado foi de passo inicial de 95 °C por 10 min, seguido por 50 repetições de 95 °C por 15 sec e 60 °C por 1 min.

3.9. Reação de amplificação multiplex pelo sistema Plexor®

Para a reação de amplificação, foi utilizado o sistema multiplex Plexor® (kit Plexor qPCR System, Promega cat. No. A4011). Para estas reações, uma das sequências dos *primers* (*forward* ou reverso) recebeu marcação (FAM, VIC ou ROX). As reações de

PCR em tempo real foram realizadas em um termociclador ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Foram avaliados 21 genes, sendo 16 genes-alvo para o câncer de mama e cinco genes referência.

As reações de amplificação ocorreram em um volume final de 20µL, contendo 1X o Master Mix Plexor (Promega), 25pmol de cada *primer* específico e 2,0µL de cDNA diluído 10X. As amostras foram amplificadas em duplicatas; a curva padrão foi formada por cinco pontos de uma diluição seriada de fator 10, em triplicata. Os parâmetros cíclicos foram de um passo inicial de *hot start* a 95 °C por 2 min, seguido por 50 repetições de 95 °C por 5 sec e 61°C por 35 sec para todas as combinações de genes analisadas.

3.10. Análise dos resultados obtidos pelo sistema Plexor®

A análise da reação de amplificação em tempo real foi realizada com o auxílio do *Plexor Data Analysis Software*, disponível no site da Promega.

3.11. Análise estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva na qual as variáveis categóricas foram expressas em frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram resumidas em médias, desvios padrão, valores mínimos e máximos. A sobrevida global ou sobrevida livre de recidiva foram estudadas por curvas de Kaplan-Meier e modelos de riscos proporcionais de Cox. Além disso, foram utilizados os testes qui-quadrado e exato de Fisher para relacionar variáveis discretas entre si; de análise de variância (ANOVA) para avaliar correlações entre variáveis contínuas e discretas entre si. Também foram realizadas análises multivariadas quando a variável apresentou valor de $p < 0.15$. Os cálculos estatísticos foram realizados com o programa NCCS.

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas e patológicas das pacientes incluídas

As características clínicas e patológicas das 167 pacientes incluídas neste trabalho encontram-se resumidas e descritas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Características clínicas das 167 pacientes analisadas

Classificação		Frequência	%
Idade (Anos)	Média	53	
	Desvio Padrão	11	
	Faixa etária	27 – 85	
Estadio	0	01	0,62
	I	33	20,37
	II	78	48,15
	III	50	30,86
	Total	162	100
Tipo de Tratamento	Adjuvante	116	69,88
	Neoadjuvante	50	30,12
	Total	166	100
Terapia utilizada	AC – T	106	63,47
	FAC	13	7,79
	AC	21	12,57
	Taxano isolado	05	2,99
	CMF	08	4,79
	T – AC	01	0,60
	AC – T – Herceptin	01	0,60
	Tamoxifeno	05	2,99
	Anastrozol/ Letrozol	02	1,20
	Outros	01	0,60
	Sem informação	04	2,40
	Total	167	100
Terapia Hormonal	Sim	120	71,86
	Não	44	26,35
	Sem informação	03	1,79
	Total	167	100
Radioterapia	Sim	146	87,43
	Não	18	10,78
	Sem informação	03	1,79
	Total	167	100

Menopausa	Sim	87	52,10
	Não	64	38,32
	Sem informação	16	9,58
	Total	167	100

Tabela 3. Características patológicas das amostras tumorais das 167 pacientes analisadas

	Classificação	Frequência	%
Tamanho do tumor	< 2,0	38	22,75
	<- 5,0	61	36,53
	> 5,0	45	26,95
	Sem informação	23	13,77
	Total	167	100
Receptor de Estrógeno	Positivo	113	67,66
	Negativo	53	31,74
	Sem informação	01	0,60
	Total	167	100
Receptor de Progesterona	Positivo	99	59,28
	Negativo	67	40,12
	Sem informação	01	0,60
	Total	167	100
cErbB1	+ / 3+	41	24,55
	++ / 3+	24	14,37
	+++ / 3+	41	24,55
	Negativo	59	35,33
	Sem informação	02	1,20
	Total	167	100

4.2. Padronização da técnica de qRT-PCR para avaliação da expressão de CK 19 e no sangue periférico

Para testar a eficiência do *primer* RT² PCR Primer Assay, foi construída uma curva de diluições seriadas com células MCF7 (1:10, 1:100 e 1:1000). Na figura 3, observam-se as curvas de amplificação, padrão e dissociação e o resultado do ciclo de quantificação (C_q) obtido na reação para CK 19-9.

A

B

C

D

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
D2	MCF7_CK19	SYBR	Standard	16.46	2.804	1.00e-001				84.5 °C
D3	MCF7_CK19	SYBR	Standard	16.21	2.804	1.00e-001				84.5 °C
D4	MCF7_CK19	SYBR	Standard	16.34	2.804	1.00e-001				84.5 °C
D5	MCF7_CK19	SYBR	Standard	19.41	2.804	1.00e-002				84.8 °C
D6	MCF7_CK19	SYBR	Standard	19.31	2.804	1.00e-002				84.8 °C
D7	MCF7_CK19	SYBR	Standard	19.45	2.804	1.00e-002				84.5 °C
D8	MCF7_CK19	SYBR	Standard	22.74	2.804	1.00e-003				84.5 °C
D9	MCF7_CK19	SYBR	Standard	22.84	2.804	1.00e-003				84.2 °C
D10	MCF7_CK19	SYBR	Standard	22.85	2.804	1.00e-003				84.2 °C

Figura 3. Painel A, curva de amplificação; painel B, curva padrão; painel C curva de dissociação e painel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7

Na figura 4, observam-se as curvas de amplificação, padrão e dissociação do ensaio realizado com amostra das 23 doadoras (mulheres livres da doença) e com células MCF7, neste resultado, observamos que as doadoras 3, 5, 8, 13, 19 e 21 obtiveram um C_q considerado por nosso grupo como positivo para CK19; estas amostras foram separadas para posterior análise.

A

B

C

D

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
C2		SYBR	Standard	17.00		1.00e-001				84.6 °C
C3		SYBR	Standard	17.09		1.00e-001				84.6 °C
C4		SYBR	Standard	20.14		1.00e-002				84.6 °C
C5		SYBR	Standard	20.12		1.00e-002				84.6 °C
C6		SYBR	Standard	24.05		1.00e-003				84.9 °C
C7		SYBR	Standard	23.90		1.00e-003				84.9 °C
D2	Doa1	SYBR	Unknown	Undet.						69.4 °C
D3	Doa1	SYBR	Unknown	Undet.						71.5 °C
D4	Doa2	SYBR	Unknown	Undet.						69.4 °C
D5	Doa2	SYBR	Unknown	36.52		2.18e-007				85.9 °C
D6	Doa3	SYBR	Unknown	35.59		4.04e-007				85.9 °C
D7	Doa3	SYBR	Unknown	Undet.						70.3 °C
D8	Doa4	SYBR	Unknown	Undet.						69.4 °C
D9	Doa4	SYBR	Unknown	Undet.						69.7 °C
D10	Doa5	SYBR	Unknown	28.98	0.063	3.27e-005	3.18e-005	1.34e-006		84.9 °C
D11	Doa5	SYBR	Unknown	29.07	0.063	3.08e-005	3.18e-005	1.34e-006		84.6 °C

Figura 4. Painel A, curva de amplificação; painel B, curva padrão; painel C curva de dissociação e painel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 e amostra de 5 doadoras

A figura 5 mostra o perfil de amplificação de 14 doadoras; com este resultado, as amostras 7, 8, 13, 14 e 21 foram separadas para posterior análise

C

D

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
C3		SYBR	Standard	16.12		1.00e-001				84.5 °C
C4		SYBR	Standard	16.36		1.00e-001				84.5 °C
C5		SYBR	Standard	20.11		1.00e-002				84.5 °C
C6		SYBR	Standard	20.11		1.00e-002				84.8 °C
C7		SYBR	Standard	23.46		1.00e-003				84.8 °C
C8		SYBR	Standard	23.11		1.00e-003				84.8 °C
C9		SYBR	NTC	Undet.						69.7 °C
C10		SYBR	NTC	Undet.						69.1 °C
D1	Doa7	SYBR	Unknown	27.73	0.185	5.92e-005	6.47e-005	7.81e-006		84.8 °C
D2	Doa7	SYBR	Unknown	27.47	0.185	7.02e-005	6.47e-005	7.81e-006		84.5 °C
D3	Doa8	SYBR	Unknown	33.43	1.171	1.42e-006	2.81e-006	1.96e-006		85.4 °C
D4	Doa8	SYBR	Unknown	31.77	1.171	4.20e-006	2.81e-006	1.96e-006		85.1 °C
D5	Doa12	SYBR	Unknown	34.48	0.260	7.16e-007	6.40e-007	1.08e-007		85.8 °C
D6	Doa12	SYBR	Unknown	34.85	0.260	5.63e-007	6.40e-007	1.08e-007		85.8 °C
D7	Doa13	SYBR	Unknown	36.20	2.016	2.33e-007	8.67e-007	8.97e-007		85.4 °C
D8	Doa13	SYBR	Unknown	33.35	2.016	1.50e-006	8.67e-007	8.97e-007		85.4 °C
D9	Doa14	SYBR	Unknown	27.94	0.255	5.14e-005	4.60e-005	7.63e-006		84.8 °C
D10	Doa14	SYBR	Unknown	28.30	0.255	4.06e-005	4.60e-005	7.63e-006		84.8 °C
D11	Doa15	SYBR	Unknown	Undet.						71.4 °C
D12	Doa15	SYBR	Unknown	Undet.						69.1 °C
E1	Doa16	SYBR	Unknown	Undet.						69.1 °C
E2	Doa16	SYBR	Unknown	33.78		1.13e-006				85.4 °C
E3	Doa17	SYBR	Unknown	Undet.						69.1 °C
E4	Doa17	SYBR	Unknown	Undet.						69.1 °C
E5	Doa18	SYBR	Unknown	34.02		9.65e-007				85.4 °C
E6	Doa18	SYBR	Unknown	Undet.						69.4 °C
E7	Doa19	SYBR	Unknown	Undet.						70.1 °C
E8	Doa19	SYBR	Unknown	Undet.						69.1 °C
E9	Doa20	SYBR	Unknown	Undet.						69.1 °C
E10	Doa20	SYBR	Unknown	Undet.						70.1 °C

Figura 5. Pannel A, curva de amplificação; pannel B, curva padrão; pannel C curva de dissociação e pannel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 e amostra de 14 doadoras

Após alguns ensaios de RT-PCR em tempo real com o *primer* de CK19, concentramo-nos nas amostras previamente separadas (5, 7, 8 e 13) para as quais foi realizada uma re-extração de RNA com o protocolo de Trizol (Invitrogen) e também feita a coleta desse material. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I; a síntese de cDNA e ensaio de RT-PCR em tempo real foram realizadas.

A figura 6 mostra as curvas obtidas no ensaio com as amostras submetidas a coleta e re-extração, diluídas na proporção 1:10 (Linha B3 a C10) e 1:50 (Linha D4 a E10).

A

B

C

D

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	Filtered	Tm
A3		SYBR	Standard	18.68		1.00e-001				
A4		SYBR	Standard	18.57		1.00e-001				
A5		SYBR	Standard	22.83		1.00e-002				
A6		SYBR	Standard	22.42		1.00e-002				
A7		SYBR	Standard	26.16		1.00e-003				
A8		SYBR	Standard	26.05		1.00e-003				
A9		SYBR	NTC	Undet.						
A10		SYBR	NTC	Undet.						
B3	CA_1/10_CK	SYBR	Unknown	37.84		7.70e-007				
B4	CA_1/10_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
B5	Cla_1/10_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
B6	Cla_1/10_CK	SYBR	Unknown	35.95		2.47e-006				
B7	Leu_1/10_CK	SYBR	Unknown	30.11	0.237	8.98e-005	8.14e-005	1.18e-005		
B8	Leu_1/10_CK	SYBR	Unknown	30.44	0.237	7.30e-005	8.14e-005	1.18e-005		
B9	VL_1/10_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
B10	VL_1/10_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
C3	5_1/10_CK	SYBR	Unknown	31.68	0.032	3.42e-005	3.46e-005	6.74e-007		
C4	5_1/10_CK	SYBR	Unknown	31.63	0.032	3.51e-005	3.46e-005	6.74e-007		
C5	7_1/10_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
C6	7_1/10_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
C7	8_1/10_CK	SYBR	Unknown	31.49	0.345	3.83e-005	4.50e-005	9.47e-006		
C8	8_1/10_CK	SYBR	Unknown	31.01	0.345	5.17e-005	4.50e-005	9.47e-006		
C9	13_1/10_CK	SYBR	Unknown	31.49	0.324	3.84e-005	3.37e-005	6.67e-006		
C10	13_1/10_CK	SYBR	Unknown	31.95	0.324	2.89e-005	3.37e-005	6.67e-006		
D4	Ca_1/50_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
D5	Cla_1/50_CK	SYBR	Unknown	35.68	1.240	5.21e-006	1.54e-005	1.44e-005		
D6	Cla_1/50_CK	SYBR	Unknown	33.93	1.240	2.56e-005	1.54e-005	1.44e-005		
D7	Leu_1/50_CK	SYBR	Unknown	35.78	0.898	4.79e-006	9.99e-006	7.35e-006		
D8	Leu_1/50_CK	SYBR	Unknown	34.51	0.898	1.52e-005	9.99e-006	7.35e-006		
D9	VL_1/50_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
D10	VL_1/50_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
E3	5_1/50_CK	SYBR	Unknown	35.23	0.326	7.89e-006	9.94e-006	2.91e-006		
E4	5_1/50_CK	SYBR	Unknown	34.77	0.326	1.20e-005	9.94e-006	2.91e-006		
E5	7_1/50_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
E6	7_1/50_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
E7	8_1/50_CK	SYBR	Unknown	Undet.						
E8	8_1/50_CK	SYBR	Unknown	34.58		1.41e-005				
E9	13_1/50_CK	SYBR	Unknown	32.96		6.19e-005				
E10	13_1/50_CK	SYBR	Unknown	Undet.						

Figura 6. Painel A, curva de amplificação; painel B, curva padrão; painel C curva de dissociação e painel D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 e amostra re-extraídas com Trizol e re-coletadas

Além da utilização das amostras obtidas a partir de mulheres livres de doença, foi construída curva com diluição seriada com células da fração mononuclear do sangue periférico (FMNSP) e MCF-7. Na proporção de 1 MCF-7 /10 linfócitos até $1/10^{10}$, este ensaio mostrou que a sensibilidade do RT-PCR em tempo real aplicado ao estudo do CK19 foi de uma célula neoplásica diluída em até 10^5 células normais, como mostra a figura 7.

A

B

C

D

well	task	Ct	copy	Tm
C5	Standard	19.11	1.00e-001	84.8 °C
C6	Standard	18.93	1.00e-001	84.8 °C
C7	Standard	22.57	1.00e-002	84.8 °C
C8	Standard	22.35	1.00e-002	84.8 °C
C9	Standard	26.08	1.00e-003	84.8 °C
C10	Standard	26.08	1.00e-003	84.8 °C
D3	Standard	30.33	1.00e-004	85.1 °C
D4	Standard	29.59	1.00e-004	85.1 °C
D5	Standard	33.94	1.00e-005	85.8 °C
D6	Standard	33.07	1.00e-005	85.8 °C

Figura 7. Paineis A, curva de amplificação; paineis B, curva padrão; paineis C, curva de dissociação e paineis D, resultados dos C_{qs} . Reação de RT-PCR em tempo

real para CK19, utilizando células da linhagem MCF7 em diluição seriado com linfócitos

4.3. Padronização da técnica de qRT-PCR para avaliação da expressão de HER2 no sangue periférico

O ensaio de expressão de HER2 na fração mononuclear do sangue periférico mostrou-se bastante delicado devido à sua baixa intensidade de expressão. Dessa forma, para a padronização de *primers* para o ensaio de PCR quantitativo, foi necessário realizar maior quantidade de testes previamente ao ensaio com as amostras das pacientes. Portanto, a seguir resumimos as etapas realizadas de padronização de três pares de *primers* para a escolha de um par adequado.

4.3.1 Par de *Primer* 1

Os experimentos para detecção da expressão de HER2 na fração mononuclear de sangue periférico de doadoras saudáveis e pacientes de câncer de mama começaram a ser realizados com os *primers* produzidos pela companhia SABiosciences (n° de catálogo PPH00209B). Entretanto, esse par de *primer* não se mostrou adequado, pois não apresentava amplificação específica.

Em reações de qPCR utilizando SYBR Green como fluoróforo, a formação de dímeros de *primers* não é aceitável já que essas estruturas permitem que o SYBR Green se intercale na dupla fita de DNA e emita fluorescência. Por outro lado, como parte dos *primers* se anela e não participa da amplificação, perde-se eficiência na reação. Dessa forma, o sinal obtido não é uma estimativa correspondente à expressão do gene.

Na tentativa de otimizar os parâmetros da reação, foi realizado um experimento de PCR com o *primer* em questão em um gradiente de temperaturas de anelamento. Observou-se que na presença de quantidade de cDNA molde equivalente a 10^{-1} uL de cDNA de MCF-7, a reação apresenta apenas uma banda, a qual possui o tamanho do

amplicon esperado (79 pares de bases). Entretanto, quando a quantidade de cDNA é menor (equivalente a 10^{-3} uL de cDNA de MCF-7), observa-se a presença de bandas de tamanho inferior ao esperado, compatível com dímeros de *primers*. É possível que quando a disponibilidade inicial de cópias de cDNA de HER2 na amplificação é menor fica evidente a afinidade dos *primers* em formar dímeros. Portanto, os *primers* da SABiosciences não são adequados o objetivo desse estudos e um segundo par de *primers* foi escolhido (*primer 2*).

4.3.2. Par de *Primer 2*

O par de *primers 2* foi desenhado a partir da sequencia do transcrito de ERBB2 (NM_004448.2 e NM_001005862.1) com auxílio do software Primer3 em uma região conservada. O primeiro teste do *primer 2* consistiu de uma curva dilucional de cDNA de MCF-7, em concentração final de 400nM e com temperatura de anelamento de 60°C. Observou-se que o *primer 2* também formou dímeros em reações com menor quantidade de cDNA template. Na tentativa de acertar os parâmetros da reação, foi realizado um experimento de PCR com os *primers 2* em um gradiente de temperaturas de anelamento. As diferentes temperaturas de anelamento do *primer* não foram capazes de eliminar a formação de dímeros.

Uma nova abordagem para solução do problema seria a diminuição da quantidade de *primer* na reação. Assim, foram realizadas reações de PCR com concentrações decrescentes do *primer 2*. Apesar de a banda correspondente aos dímeros ser muito sutil na concentração de 100 nM, ela é suficiente para diminuir a intensidade de amplificação do produto desejado e produzir fluorescência detectável pelo aparelho de qPCR. Foi necessário, portanto, testar um novo par de *primers*.

4.3.3. Par de *Primer 3*

O par de *primers* 3 foi desenhado a partir da sequência do transcrito de ERBB2 (NM_001005862.1) com auxílio do software Primer3; este par de *primers* também se localiza em uma região comum conservada, e também está situado na porção 3' do transcrito, o que favorece a amplificação a partir de cDNA.

Outra vantagem do *primer* 3 em relação aos anteriores é a localização de cada *primer* em exons diferentes, contendo um íntron de 140 pares de bases entre eles. Dessa forma, no caso de contaminação do RNA com DNA genômico, será formado um produto de 219 pares de bases e temperatura de melting maior que a do amplicon desejado.

A padronização do *primer* 3 iniciou-se com a escolha da concentração final na reação. Apesar de proporcionar uma amplificação em maior intensidade, a reação de qPCR com quantidades menores de cDNA (equivalente a 10^{-5} e 10^{-7} uL de cDNA de MCF-7) e 200 nM de *primer* 3 apresentou na curva de dissociação dois picos, denotando um excesso de primer e conseqüente formação de dímeros. Portanto a concentração escolhida para o *primer* 3 foi 100 nM. (Tabela 4)

Tabela 4. Otimização da concentração de *primer* 3

Concentração do <i>primer</i>	Quantidade equivalente ao cDNA de MCF-7	C _q
100	10^{-1}	29,28
100	10^{-1}	29,26
100	10^{-3}	39,26
100	10^{-3}	38,29
100	10^{-5}	Indeterminado
100	10^{-5}	Indeterminado
100	10^{-7}	Indeterminado
100	10^{-7}	Indeterminado
200	10^{-1}	28,09
200	10^{-1}	27,95
200	10^{-3}	37,06
200	10^{-3}	37,32
200	10^{-5}	47,24
200	10^{-5}	Indeterminado
200	10^{-7}	43,16
200	10^{-7}	Indeterminado

Observação: C_q = ciclo de quantificação; Indeterminado = expressão não detectada.

Em seguida, iniciaram-se as reações com amostras de doadoras saudáveis e de pacientes. Das 23 mulheres saudáveis, 10 apresentaram resultado positivo em uma ampla faixa de variação (tabela 5). Segundo a literatura, a expressão de HER2 na fração mononuclear de sangue periférico de pessoas saudáveis já foi detectada em alguns casos (Quintela-Fandino et al, 2006) e pode ocorrer principalmente devido às células NK/granulócitos (You et al, 2008).

Tabela 5. Expressão de HER2 relativa à MCF-7 em mulheres saudáveis

Amostra	Expressão relativa à MCF-7
1	3,10
2	3,67
4	8,62
7	6,67
9	0,98
10	2,74
18	32,81
19	5,52
20	13,76
22	13,08
3, 5, 6, 8, 11-17, 21,	0

Nas cinco coletas das cinco primeiras pacientes testadas (total de 25 amostras), a frequência de resultado positivos para a expressão de HER2 foi encontrada em apenas uma coleta de uma paciente.

Para verificar se o ensaio apresentava baixa sensibilidade, foram repetidas as reações com amostras de algumas doadoras e pacientes com diferentes quantidade de cDNA (Tabela 6). Foram escolhidas amostras previamente classificadas tanto como positivas quanto negativas para expressão de HER2.

Tabela 6. Otimização da quantidade de cDNA molde na reação de qPCR com *primer 3*

Amostra	Quantidade de DNAc diluído 50 vezes	C _q
Doadora 5	0,6	Indeterminado
Doadora 5	0,6	Indeterminado
Doadora 5	1,2	Indeterminado
Doadora 5	1,2	Indeterminado

Doadora 5	6,0	Indeterminado
Doadora 5	6,0	38,13
Doadora 8	0,6	Indeterminado
Doadora 8	0,6	Indeterminado
Doadora 8	1,2	Indeterminado
Doadora 8	1,2	Indeterminado
Doadora 8	6,0	36,81
Doadora 8	6,0	Indeterminado
Doadora 10	0,6	30,06
Doadora 10	0,6	30,57
Doadora 10	1,2	29,77
Doadora 10	1,2	30,19
Doadora 10	6,0	27,39
Doadora 10	6,0	27,56
Doadora 20	0,6	31,85
Doadora 20	0,6	31,82
Doadora 20	1,2	31,61
Doadora 20	1,2	32,22
Doadora 20	6,0	29,41
Doadora 20	6,0	29,54
Paciente JGR - coleta 1	0,6	Indeterminado
Paciente JGR - coleta 1	0,6	Indeterminado
Paciente JGR - coleta 1	1,2	Indeterminado
Paciente JGR - coleta 1	1,2	Indeterminado
Paciente JGR - coleta 1	6,0	Indeterminado
Paciente JGR - coleta 1	6,0	Indeterminado
Paciente JGR - coleta 2	0,6	34,73
Paciente JGR - coleta 2	0,6	36,52
Paciente JGR - coleta 2	1,2	36,51
Paciente JGR - coleta 2	1,2	35,78
Paciente JGR - coleta 2	6,0	34,54
Paciente JGR - coleta 2	6,0	33,24
Paciente SGS - coleta 5	0,6	35,00
Paciente SGS - coleta 5	0,6	35,24
Paciente SGS - coleta 5	1,2	36,17
Paciente SGS - coleta 5	1,2	33,51
Paciente SGS - coleta 5	6,0	34,06
Paciente SGS - coleta 5	6,0	32,70
Paciente EC - coleta 5	0,6	Indeterminado
Paciente EC - coleta 5	0,6	Indeterminado

Paciente EC - coleta 5	1,2	Indeterminado
Paciente EC - coleta 5	1,2	Indeterminado
Paciente EC - coleta 5	6,0	37,59
Paciente EC - coleta 5	6,0	Indeterminado

Observa-se que amostras previamente classificadas como positivas apresentam, como esperado, C_q decrescente com o aumento da quantidade de cDNA molde (doadoras 10 e 20 e pacientes JGR – coleta 2 e SGS – coleta 5).

Dentre as pacientes negativas, foram observadas duas situações distintas. A paciente JGR – coleta 1 apresentou resultado indeterminado/negativo mesmo aumentando 2 ou 10 vezes a quantidade inicial de cDNA molde (1,2 e 6,0 uL, respectivamente). Isso significa que o experimento não apresenta problemas de sensibilidade, já que aumentar em 10 vezes o cDNA molde significa aumentar o poder de amplificação na ordem de mais de 10^{60} em uma reação de 100% de eficiência e 50 ciclos. Já as mulheres saudáveis 5 e 8 e paciente EC – coleta 5 apresentaram sinal em pelo menos uma das reações de cada par quando a quantidade de cDNA é 6,0 uL de cDNA diluído 50 vezes. Analisando a curva de dissociação dos produtos formados, observa-se que esse sinal, assim como o da paciente JGR – coleta 2, vem de um trecho de DNA com temperatura de melting de 84-85°C (figura 8) e que portanto não corresponde ao amplicon desejado, cuja temperatura de melting é 81°C.

Figura 8. Curva de dissociação de produto de qPCR. A seta indica o pico correspondente à amplificação a partir de DNA genômico

Para verificar se o produto formado é consistente com amplificação a partir de DNA genômico e excluir a possibilidade de amplificação não específica, o produto de PCR foi fracionado em gel de agarose (Figura 9).

Figura 9. Otimização da quantidade de cDNA molde na reação de qPCR com *primer 3*

Na doadora 20, observou-se a banda esperada de 79 pares de bases (o mesmo resultado foi observado na doadora 10 e paciente SGS – coleta 5).

Já na paciente JGR – coleta 2, foram observadas bandas entre 200 e 300 pares de bases, compatível com a amplificação a partir de DNA genômico (219 pares de bases). A mesma banda também foi observada nas reações com 6 uL das mulheres saudáveis 5 e 8 e paciente EC – coleta 5. Nesses casos observou-se uma pequena contaminação com DNA genômico que só é detectada quando a quantidade de cDNA molde inicial é maior. Como foi observada apenas a banda relativa ao DNA genômico (219 pares de bases) e não a banda referente ao transcrito/RNA mensageiro, essas amostras foram consideradas negativas para a expressão de HER2. De qualquer forma, essas amostras e quaisquer outras que apresentaram amplificação a partir de DNA genômico tiveram o RNA total novamente tratado com DNase, a partir do qual foi sintetizado novo cDNA para repetição do ensaio de qPCR.

Na paciente JGR – coleta 1 não se observou nenhuma banda, isto é, essa amostra é negativa para expressão de HER2. Portanto, o aumento da quantidade de cDNA molde em até 10 vezes não alterou os resultados para detecção da expressão de HER2 e os parâmetros inicialmente utilizados (concentração final de *primer 3* em 100 nM e 0,6 uL

de cDNA diluído 50 vezes) foram considerados adequados para continuar o estudo nas demais pacientes.

4.4. Avaliação da expressão de CK-19 e HER2 no sangue periférico

As 167 pacientes foram avaliadas quanto ao perfilamento genético de amostras tumorais e quanto à expressão dos marcadores de células tumorais circulantes CK-19 e HER2 no sangue periférico. A avaliação foi realizada em amostras obtidas ao diagnóstico e após três e seis meses. As pacientes foram diagnosticadas e tratadas no período de fevereiro de 2008 a fevereiro 2012 na Faculdade de Medicina do ABC (41 pacientes) e Fundação Pio XII de Barretos (126 pacientes).

Inicialmente, procurou-se decodificar os valores da expressão de CK-19 e HER2 da fração mononuclear do sangue periférico em positivos e negativos através do estudo da expressão encontrada em 23 controles normais (Tabela 7). Foi escolhido o valor do limite superior do intervalo de confiança de 95% ao redor da média para ambos CK-19 e HER2. Valores superiores ou iguais ao limite superior do intervalo de confiança ao redor da média do CK-19 (1.47) e do HER2 (1.10) foram considerados positivos, e os inferiores a estes limites, negativos. Procedimento semelhante para classificação de casos positivos e negativos foi utilizado por Savino et al., 2007.

Tabela 7. Avaliação do ponto de corte para expressão de CK-19-9 e HER2 na fração mononuclear do sangue periférico de 23 amostras controle (mulheres saudáveis)

Parâmetro	Controles CK19	Controles HER2
Média	1,208348	0,7532174
Erro Padrão	0,1270437	0,1687484
Limite inferior de 95%	0,9448752	0,4932547
Limite superior de 95%	1,47182	1,10318
N	23	23

Após utilizar os pontos de corte acima, se obteve as seguintes características analíticas para CK-19 e HER2 com base nos controles normais e na primeira coleta de amostra de sangue das pacientes no momento de sua inclusão no estudo (Tabela 8).

Tabela 8. Características analíticas de CK-19 e HER2

	CK-19	HER2
Sensibilidade (%)	44,85	22,42
Especificidade (%)	56,52	52,17
Valor Preditivo Positivo (PPV) (%)	88,10	77,08
Valor Preditivo negativo (NPV) (%)	12,5	8,57

A seguir, foi observado o comportamento da expressão de CK-19 e HER2 ao longo do tratamento (3 e 6 meses). Enquanto a taxa de positividade da expressão de CK-19 praticamente não se alterou ($p = 0.4253$) ao longo do tempo, houve significativa diminuição da expressão de HER2 ao longo do tempo ($p = 0.0088$) (Tabela 9).

Tabela 9. Evolução da expressão de CK-19 e de HER2 ao longo do tempo. CK-19 e HER2 (primeira amostra); CK-19 e HER2 (segunda amostra: após 3 meses) e CK-19 e HER2 (terceira amostra: após 6 meses)

	CK-19 (1º Amostra)	CK-19 (2º Amostra)	CK-19 (3º Amostra)
Negativo	74	73	83
Positivo	91	91	80

	HER2 (1º Amostra)	HER2 (2º Amostra)	HER2 (3º Amostra)
Negativo	37	50	62
Positivo	128	114	101

Não foi observada correlação significativa do ponto estatístico entre a expressão de CK-19 ou HER2 na primeira coleta e estadio (dados não mostrados). Todavia, observou-se correlação significativa entre expressão de CK-19 e HER2 entre si ao diagnóstico ($p = 0.000415$).

4.5. Padronização das amplificações dos multiplex utilizando o sistema Plexor®

Para realizar PCR quantitativo em multiplex em material proveniente de bloco de parafina, é necessária etapa de padronização para otimizar as reações que vão desde a síntese do cDNA até a amplificação, escolhendo o volume final mínimo da reação capaz de acomodar os diferentes *primers*, combinação de *primers*, a concentração de cada um deles, a temperatura de anelamento e a quantidade de ciclos de amplificação.

4.5.1. Padronização da Técnica de extração de RNA a partir de material advindo de biópsia e embocado com parafina (bloco de material com tumor-parafinado)

Como descrito na sessão de Pacientes e Métodos, foi utilizado para esse fim o kit *RNeasy FFPE kit* (Qiagen, cat. no. 74404, Hilden, DE). Com o intuito de padronizar o número de fragmentos, tempo de emblocamento e tamanho de cada fragmento a ser extraído o RNA para o estudo de perfilamento genético, foram utilizadas as seguintes combinações de amostras para verificar se o tempo de emblocamento e a quantidade de fragmentos poderiam interferir na concentração de RNA a ser obtido utilizando o kit de extração supracitado.

As seguintes combinações foram realizadas:

- 1) 8 fragmentos com tamanho de 10,0 μm advindos de bloco de parafina com mais de 2 anos de emblocamento.
- 2) 4 fragmentos com tamanho de 10,0 μm advindos de bloco de parafina com mais de 2 anos de emblocamento.
- 3) 8 fragmentos com tamanho de 10,0 μm advindos de bloco de parafina com emblocamento realizado há menos de 1 mês.
- 4) 4 fragmentos com tamanho de 10,0 μm advindos de bloco de parafina com emblocamento realizado há menos de 1 mês.
- 5) 5 fragmentos com tamanho de 10,0 μm advindos de amostra congelada. Essa amostra serviu de controle para a padronização da metodologia de extração.

A tabela 10 a seguir relaciona a concentração de RNA obtida com a utilização do espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) nas diferentes combinações citadas acima.

Tabela 10. Resultados das concentrações de RNA utilizando o kit *RNeasy FFPE*

Amostras	Concentração (ng/ μ L)	Relação 260 /280 nm
1	102,4	1,87
2	181,1	1,89
3	127,7	1,88
4	394,4	1,99
5	310,7	2,02

Após extração de RNA, foram sintetizadas amostras de cDNA para análise através de ensaio de PCR em tempo real para o GAPDH. Para as reações de amplificação, as amostras de cDNA sintetizadas foram inicialmente diluídas 10 vezes.

Na figura 10 observam-se os resultados da expressão para GAPDH das combinações das amostras cujas concentrações foram mostradas na tabela 10.

Figura 10. Perfil de expressão, Curva padrão, Curva de dissociação e dados de C_{qs} de GAPDH_Tecido Parafinado

4.5.2. Síntese de cDNA a partir do RNA total extraído de tecido parafinado

Como o RNA proveniente de amostras armazenadas em parafina não apresenta a mesma qualidade que o RNA de amostras frescas, é possível que a cauda poli-A dos transcritos não esteja íntegra. Dessa forma, foi testada a transcrição reversa a partir de RNA proveniente de amostras em parafina com *random primers*, em alternativa ao oligo-dT.

O primeiro teste de síntese de cDNA foi realizado com oligo-dT, *random primers* ou com a mistura de oligo-dT + *random primers* (Tabela 11). Em seguida foi realizado um qPCR (marcador HER2) para verificar a presença e qualidade de cDNA.

Tabela 11. Resultado do PCR quantitativo de cDNA sintetizado com oligo-dT e *random primers*

Oligonucleotídeo	C _{qs}
Oligo-dT	Indeterminado
Oligo-dT	Indeterminado
<i>Random primers</i>	33,45
<i>Random primers</i>	32,34
Oligo-dT + <i>Random primers</i>	33,54
Oligo-dT + <i>Random primers</i>	33,21

Apenas as reações com *primers* randômicos e com a mistura *random primers* + oligo-dT apresentaram amplificação, sugerindo que a síntese somente com oligo-dT não é adequada. Portanto, a síntese de cDNA foi realizada com *random primers*.

4.5.3. Amplificação em multiplex

Foram testadas diferentes condições de amplificação e verificou-se que os melhores perfis foram obtidos utilizando-se 20uL de volume final, em reações realizadas com temperatura de anelamento de 61°C e 50 ciclos de repetição.

Em seguida, cada par de *primer* foi testado separadamente, para depois serem testados em multiplex. Assim, foi realizada inicialmente uma curva de diluição seriada para verificação da eficiência e sensibilidade de cada par de *primer* e determinação do C_q (Ciclo de quantificação - ciclo de detecção do produto de amplificação) de cada alvo em ambiente sem competição por reagentes.

Para determinação da eficiência da reação, os valores de C_q de cada ponto da curva foram empregados para o cálculo da equação de regressão e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado (r^2). Para que se obtenham resultados reprodutíveis e com exatidão, a eficiência da reação deve ser próxima a 100% (são aceitáveis valores de 90 a 110%), que significam que a quantidade de DNA duplica após cada ciclo da fase exponencial, com r^2 próximo a 1,0 (valores aceitáveis acima de 0,95).

Inicialmente para o desenho dos *primers* foi utilizado o software *Plexor*® *Primer Design* (http://www.promega.com/applications/PCR/qPCR/primer_design.htm). Porém, em tentativas de padronização de amplificação em multiplex com os *primers* originalmente descritos, houve inúmeros insucessos devido à formação de dímeros entre os três pares de *primers* de cada combo proposto (uma vez que o perfil de amplificação de *primer* isolado é alterado quando combinado no sistema Plexor). Assim, com o intuito de aumentar a gama de possibilidade de novas combinações de genes para multiplex, dos 21 genes estudados, 17 tiveram mais um par de *primers* desenhado e 04 foram mantidos (GAPDH, Beta-actina, CTSL2 e KI-67), por se tratarem de *primers* com excelente perfil de amplificação. Estes novos pares de *primers* foram inicialmente sintetizados sem marcação alguma e testados com o sistema SYBr Green, com o intuito de verificar sua eficiência e formação de dímeros. Todos os pares de *primers* apresentaram eficiência de amplificação próxima de 100%, sem formação de dímeros. Assim, estes *primers* foram sintetizados com a marcação necessária para sua utilização pelo sistema Plexor.

As amplificações em multiplex foram testadas em triplex, com a formação dos combos originalmente propostos, utilizando os novos pares de *primers*. Entretanto, devido à persistência de formação de dímeros (visualizada como um segundo pico de T_m menor nas curvas de *melting* e pico único de baixa T_m nas amostras de controle negativo), os genes foram analisados em duplex. Assim, utilizando todos os pares de *primers* disponíveis para avaliação dos 21 genes, foi possível determinar 10 duplas, nas quais se obteve com sucesso o produto esperado, sem a formação de dímeros. O gene

Survinina foi amplificado isoladamente. Os pares de genes estabelecidos para análise das amostras tumorais encontram-se na Tabela 12. Em todas as reações de amplificação, a eficiência dos *primers* ficou em torno de 100% (95 a 105%), com R^2 próximo a 1.

Na Figura 11, podem ser visualizadas as curvas de amplificação de três genes constitutivos (Beta-actina, TRFC e GUSB) e três genes-alvo (CTSL2, ER e SCUBE2) nas 20 pacientes da FMABC.

Figura 11. Curvas de amplificação de três genes constitutivos (Beta-actina, TRFC e GUSB) e três genes-alvo (CTSL2, ER e SCUBE2) dos 21 genes do estudo de perfilamento genético tumoral com o sistema Plexor

Tabela 12. Combinações de genes utilizadas para a análise multiplex

Duplex
GAPDH + KI-67
SCUBE2 + BETA-ACTINA
TRFC + CCNB1
GUSB* + MMP11*
ER + PGR
BAG1 + GSTM1
BCL2 + STK15
MYBL2* + RPLP0*
CD68 + CTSL2
GRB7* + HER2

SURVININA

*genes amplificados com os novos pares de *primers*. Os demais foram amplificados com as sequências originalmente desenhadas.

4.6. Pontuação do Perfilamento tumoral

O estudo da expressão dos 21 genes gerou uma pontuação (score) que variou de 0 a 100. As características relacionadas ao cálculo da pontuação do perfilamento tumoral constam na Tabela 13.

Tabela 13. Estatística descritiva da pontuação do perfilamento tumoral

N. pacientes	Média	Desvio Padrão	Erro padrão	Mínimo	Máximo
155	38,5897	12,45197	1,000166	27,7625	86,38
Quartis					
	Percentil 10%	Percentil 25%	Percentil 50%	Percentil 75%	Percentil 90%
Valor	31,004	31,82	33,325	36,87	61,33
Limite Inferior de 95%	30,57	31,48	32,6375	35,05	54,26
Limite Superior de 95%	31,33	32,21	33,7875	45,11	65,09

Analisando a pontuação do perfilamento tumoral como variável contínua, foi observada correlação significativa com Intervalo Livre de Doença ($p = 0.006538$) descrita abaixo.

Observamos também que pacientes com o quartil superior desta pontuação tiveram sobrevida livre de progressão significativamente menor do que aqueles com valores menores (log Rank $p = 0,000471$) (Figura 12).

Figura 12. Curva de sobrevida demonstrando a sobrevida dos pacientes com pontuações de seus perfilamentos tumorais no quartil superior (75%) na curva inferior e os demais com pontuações inferiores na curva superior (Logrank $p = 0.000471$)

Pacientes com diferentes estadios tiveram pontuações diferentes, podendo-se perceber que havia pontuações de alto risco em estadios iniciais como estadios 1 e 2. Todavia não houve correlação significativa entre estadio e pontuação do perfilamento ($p = 0.26$) (Figura 13)

Figura 13. Dot Plot mostrando a distribuição das pontuações por estadio

Em pacientes com estadio 2 percebeu-se que sua sobrevida livre de recidiva é impactada de forma significativa pela pontuação do perfilamento do quartil superior em comparação com pacientes com estadio 2 e pontuações menores. No estadio 1 face ao número pequeno de eventos não foi possível estratificá-lo de acordo com a pontuação do perfilamento enquanto que a estratificação do estadio 3 de acordo com os quartis da pontuação do perfilamento não revelou significância (Logrank $p = 0.46$). (Figura 14)

Figura 14. Pacientes com estadio 2 e pontuações de seus perfilamentos tumorais no

quartil superior (curva inferior) e demais quartis (curva inferior) (Logrank $p = 0.000437$)

4.7. Correlações com Intervalo Livre de Doença (ILD)

Inicialmente, pretendia-se criar um modelo com as primeiras 41 pacientes (da FMABC) para validá-lo nas pacientes de Barretos (126 pacientes). Todavia, não foi possível, através de uma análise multivariada, encontrar variáveis que se correlacionassem significativamente com ILD, à exceção do estadiamento tumoral. Nestas pacientes não foi observada a pesquisa de células tumorais circulantes através da expressão de CK19 ou de HER2 nem da pontuação do perfilamento gênico. Desta forma, decidiu-se então abandonar esta ideia e foram agregadas todas as pacientes para avaliação em relação à sua ILD as variáveis em estudo tanto de forma univariada quanto multivariada.

As pacientes foram seguidas por um tempo médio de 29 meses com procedimentos padronizados pela American Society of Clinical Oncology com visitas clínicas periódicas, mamografia anual e demais exames pedidos em caso de suspeita clínica ou direcionados para avaliação de sintomas (Figura 15)

Figura 15. Curva de Intervalo livre de doença (ILD) de todas as pacientes incluídas no estudo

Utilizando o procedimento de Cox (“Proportional Hazards Regression”), observa-se uma correlação estatisticamente significativa entre estadio clínico e ILD ($p = 0.000701$). Observa-se também correlação significativa entre ILD e a pontuação do perfilamento tumoral ($p = 0.006538$) e com presença de receptores hormonais no tumor ($p = 0.0432$). Não foi observada nenhuma correlação entre ILD e idade ou com a

presença ou não de expressão de CK-19 ou HER2 na FMNSP antes do início do tratamento (Tabela 14). Da mesma forma não foi encontrada nenhuma correlação entre a expressão de CK-19 ou HER2 em nenhuma das duas medidas subsequentes, três e seis meses após o início do tratamento e ILD (dados não mostrados).

Na análise multivariada, apenas a pontuação do perfilamento tumoral se relacionou de forma estatisticamente significativa com o intervalo livre de recidiva no modelo (Tabela 15) como variável independente.

Quando a análise foi restringida apenas para os casos que foram positivos para a primeira análise de CK-19, não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre ILD e CK-19 realizado nas coletas obtidas aos três e seis meses após inclusão no estudo ($p = 0.3835$ e $p = 0.3888$). Todavia, quando se analisou apenas pacientes que tiveram a primeira amostra de HER2 positiva, observou-se que pacientes que negativaram o HER2 na segunda coleta tenderam a ter ILD superior ($p = 0.06579$) (Figura 16). Não foi observada correlação entre a terceira medida de HER2 colhida aos seis meses da entrada no estudo e ILD ($p = 0.5326$).

As correlações acima não foram estudadas com sobrevida, pois houve poucos eventos (mortes) e, por conseguinte, não se acredita que tais avaliações contribuiriam neste momento do seguimento clínico das pacientes.

Tabela 14. Análise univariada com o modelo de riscos proporcionais de Cox para Intervalo Livre de Doença (ILD) como variável dependente

Variável	Coef. de Regressão	Erro Padrão	Exp(B)	Média	Z-Value	p	R^2
Estadio Clínico	1,205094	0,3555878	3,337072	2,081761	3,39	0,000701	0,09532
Idade	0.0149	0.01860	1,015087	53,15244	0,8	0,420831	0,00575
CK-19*	-0,6090406	0,4277453	0,5438724	1,54878	-1,42	0,154493	0,01777
HER2*	-0,3459664	0,442117	0,7075363	1,77439	-0,78	0,433908	0,05438
Perfilamento	0.036	0.0132	1,036678	38,62184	2,72	0,006538	0,0676
Rec. Hormon. Pos ⁺	- 0,07119371	0.4094	0,4018	1,3231	-2,23	02599	0,043238

Tabela 15. Análise multivariada com o modelo de riscos proporcionais de Cox para Intervalo Livre de Doença (ILD) como variável dependente

Variável	Coeficiente	Erro Padrão	Exp(B)	Media	Z-Value	P
Estadio	0,6952742	0,3859319	2,004259	2,04698	1,8	0,071617
Perfilamento	3,11E-02	0,0142852	1,031634	38,67052	2,18	0,029247
Rec. Hormon. Pos ⁺	-0,7119371	0,4736061	0,490693	1,375839	-1,5	0,132781

⁺ Receptor de Hormônio Positivo

Figura 16. ILD e HER2 da segunda coleta em pacientes cuja primeira medida de HER2 foi positiva. Observa-se que pacientes com HER2 positivo na segunda coleta tenderam a ter ILD inferior (curva inferior tracejada) (log rank $p = 0.061$)

4.8. Correlações com resposta à quimioterapia

Foram considerados apenas os 21 casos em que se procedeu à neoadjuvância (únicas pacientes para as quais havia dados de resposta à quimioterapia). Classificou-se resposta como a soma de resposta clínica parcial e resposta clínica completa (critérios Recist) e como não resposta às demais ocorrências. Procedeu-se então à análise logística univariada (Tabela 16), porém devido ao pequeno número de casos não foi possível obter poder estatístico para realizar análise multivariada.

Como pode se observar, há correlação estatisticamente significativa entre resposta à quimioterapia e CK-19 e HER2 no momento da inclusão e com pontuação do perfilamento tumoral. Curiosamente, valores positivos de CK-19 e HER2 no momento da inclusão e menores valores mais elevados da pontuação do perfilamento parecem se correlacionar com quimiorresistência.

Tabela 16. Análise logística de resposta à quimioterapia como variável dependente e demais características clínicas e variáveis

Variável	R ²	P
Idade	0.00583	0.8423
Estadio	(-)14.0487	0.9840
Receptor hormonal	0.4519	0.5483
Perfilamento	0.08150	0.03246
CK-19	(-)1.945909	0.02396
HER2 (1º coleta)	(-)2,1747	0.05798

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da expressão de CK 19 e HER2 na FMNSP através de qRT-PCR

O câncer de mama é uma doença heterogênea, com subtipos diferentes, perfis moleculares e comportamentos biológicos diversos e, por isso, um grande desafio na decisão de uma conduta clínica adequada a cada paciente.

Fatores prognósticos e preditivos são importantes ferramentas que auxiliam na individualização da terapia do câncer de mama evitando, desta forma, pacientes com

perfil de baixo risco dos efeitos colaterais indesejáveis de um tratamento excessivo (Čabiňáková e Tesařová, 2012).

Neste estudo, avaliou-se através da técnica de RT-PCR quantitativo a expressão de CK 19 e HER2 no sangue periférico de pacientes portadoras de neoplasia mamária com intuito de validar esta técnica para detecção de células tumorais circulantes. Essas células têm baixa ocorrência no sangue periférico e por isso a necessidade de encontrar uma técnica sensível para a detecção das mesmas.

Deste modo para obter uma metodologia rápida e sensível, optou-se por utilizar *primers* comerciais; porém, não foi possível obter-se para HER2 os resultados esperados, já que este apresentou múltiplos picos na curva de dissociação. CK19 e GAPDH tiveram resultados satisfatórios e, portanto, seguiu-se com a utilização dessas sequências comerciais.

Além disso, notamos a necessidade de avaliar a expressão de CK-19 e HER2 tendo como base os controles normais para classificar esta expressão como positiva ou negativa. Como não há descrito um padrão para estes testes, escolheu-se como ponto de corte o valor superior do limite de confiança de 95% ao redor da média de CK-19 e do HER2. Assim, valores superiores ou iguais a este valor foram codificados como positivos e os inferiores, como negativos. Quando se observou as características analíticas destes dois testes, foram vistos que suas especificidades e sensibilidades são muito baixas. Entretanto, seus valores preditivos positivos e negativos são aceitáveis. A especificidade é calculada a partir dos resultados verdadeiros negativos dos grupos em estudo e, portanto, observou-se, assim como outros autores, uma pequena quantidade de doadoras que expressaram de maneira significativa esses marcadores, o que acabou contribuindo para a diminuição da especificidade do método. You et al., 2008 observaram que a expressão de pequenas quantidades de CK19 e HER2 no sangue periférico de mulheres sem doença é comum, porque algumas células da linhagem hematopoiética podem expressar esses genes. Todavia, como não pretende se utilizar estes testes para diagnóstico de câncer, estas características analíticas não nos parecem essenciais.

A verdadeira pergunta é como estes marcadores se comportam em relação a sua utilidade prognóstica em pacientes com câncer de mama submetidas a tratamento oncológico (cirurgia e quimioterapia).

Para responder a esta pergunta, deve-se inicialmente tentar avaliar se a expressão de CK-19 e de HER2 exibem características de um biomarcador. Para tal, inicialmente, como CK-19 e HER2 são marcadores de células epiteliais, seria interessante saber se na primeira coleta (antes do tratamento oncológico) há correlação entre estes dois analitos. Percebeu-se que existiu correlação estatisticamente significativa entre CK-19 e HER2 na primeira coleta.

A seguir, foi estudado se devido ao tratamento houve queda das concentrações de CK-19 e de HER2. Enquanto este comportamento foi observado com HER2, não foi percebida queda significativa do CK-19 ao longo de deste estudo.

Daskalaki et al., (2009) mostraram que células tumorais positivas para CK19 persistiram no sangue periférico e/ou na medula óssea de pacientes com câncer de mama inicial apesar da administração de quimioterapia adjuvante, onde 28,4 e 32,2% dos pacientes sem CTCs ou CTDs detectáveis antes da quimioterapia respectivamente, apresentou células positivas para CK19 após a conclusão da quimioterapia adjuvante. Uma explicação seria que a quimiorresistência das células em pacientes identificados como CTD (-) ou/e CTC (-) é devido a uma baixa carga tumoral que foi indetectável pelo método e pôde se proliferar durante a administração do tratamento adjuvante e alcançar os limites de detecção após o final do tratamento.

Reforçando este ponto, observou-se que a expressão de HER2 na segunda coleta de pacientes informativos, isto é, aqueles que expressaram HER2 na primeira coleta, tendeu a se correlacionar significativamente com um pior Intervalo Livre de Doença (ILD).

Este fato parece interessante porque reforça a possível utilidade do HER2 como biomarcador em potencial de células tumorais circulantes, talvez útil no futuro para monitorar resposta clínica a terapia adjuvante.

Um achado interessante que merece comentário foi a correlação negativa de CK-19 e HER2 na primeira coleta com ILD na análise univariada e ILD e com resposta à quimioterapia. Uma possível explicação seria que a presença de células tumorais circulantes ao diagnóstico seria um fator de pior prognóstico por implicar talvez maior quimiorresistência. Resultados semelhantes em termos da presença de células tumorais circulantes e quimiorresistência foram já descritos por Cristofanilli *et al.* (2005) em pacientes com Câncer de mama metastático.

Os resultados aqui apresentados sugerem que pelas características do comportamento evolutivo, o HER2 pareceu ser um melhor candidato como possível biomarcador de células tumorais circulantes do que o CK-19.

5.2. Perfilamento genético tumoral

Ao contrário do sistema descrito por Paik et al. (2004) e Filipits et al. (2011) que utilizaram sondas de hidrólise para a análise de qRT-PCR, neste trabalho foi utilizado o sistema Plexor[®] qPCR System no qual os *primers* são marcados com fluorescência na extremidade 5' e o *quencher* adicionado posteriormente com o Master Mix. Esse sistema permitiu, além de reação em multiplex, realizar a curva de *melting* para determinar a especificidade do produto amplificado.

O objetivo de um ensaio multigênico é ajudar médicos e pacientes com decisões difíceis, com, por exemplo, saber se pacientes com câncer de mama Her2 negativo e ER positivo necessitam somente de terapia anti-hormonal ou precisam de quimioterapia adicional para obter melhores resultados. Geralmente, os oncologistas tendem a exceder o tratamento com quimioterapia para essas pacientes por questão de segurança, embora elas poderiam ser tratadas apenas com uma simples terapia hormonal (Dietel et al., 2013).

O painel de genes deste estudo simula o utilizado pelo teste comercial Oncotype[®]. Os 21 genes que compõem esta plataforma estão envolvidos em importantes processos ligados a carcinogênese mamária, como invasão tumoral, proliferação celular e vias relacionadas a receptores hormonais, além da sinalização de ERBB2 (HER2). Dos 21 genes, cinco são constitutivos e serviram para normalizar a expressão dos demais alvos (B-actina, GAPDH, GUSB, RPLPO e TRFC), cinco estão relacionados à proliferação (Ki-67, STK15, Survinina, CCNB1, MYBL2), dois estão relacionados à invasão (MMP11 e CTSL2), dois são relacionados ao HER2 (GRB7 e HER2), quatro são relacionados à via estrogênica (ER, PGR, BCL2 e SCUBE2) e três são associados a outras vias (GSTM1, CD68 e BAG1) (Paik et al., 2004). Os mesmos foram agrupados para amplificação em multiplex no sistema Plexor[®] de detecção. A

normalização dos resultados de expressão dos genes alvo foi realizada utilizando a média da expressão dos cinco genes constitutivos (Toussaint et al., 2009).

A técnica de qPCR utilizada neste estudo com a qual foi medida a expressão destes genes é diferente da utilizada no método Oncotype™. Os *primers* utilizados foram todos desenhados para este estudo de forma original para adequar o procedimento à amplificação simultânea de dois genes. Portanto, não se acredita que essa pontuação corresponda àquela produzida pelo teste comercial Oncotype™. Desta forma, procurou-se padronizar esta pontuação em quartis e percebeu-se que o quartil superior tinha ILD significativamente pior do que a de pacientes nos demais quartis. Também foi observada uma estratificação dos pacientes com estadió clínico II em pior e melhor prognóstico de acordo com o quartil (superior versus demais) de pontuação de nosso teste de perfilamento. Na análise multivariada que conduzida com ILD, percebe-se que apenas o perfilamento se manteve como variável independente no modelo no qual nem o estadió clínico permaneceu.

Curiosamente, foi percebido que entre as pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante com pontuações inferiores tenderam a responder melhor à quimioterapia. Menores pontuações do Oncotype™ (Paik et al., 2004) se correlacionam com melhor resposta hormonal. Todavia, há uma importante diferença, pois a maior parte das pacientes participantes neste estudo é de alto risco e com indicação clínica de quimioterapia, ao contrário da maioria dos estudos que validaram o teste Oncotype™. Acredita-se que estudos futuros devam abordar melhor a correlação entre pontuação do perfilamento genético e quimiorresistência.

Embora a plataforma Oncotype® DX seja comercialmente disponível e com valor prognóstico de grande valor para a clínica, seu elevado custo (R\$7.892,00, equivalentes a US\$ 4.000,00 com câmbio de R\$ 1,973, em 21 de fevereiro de 2012) a torna inacessível para a maioria das pacientes com câncer de mama no Brasil. Além do elevado custo, o material biológico – biópsia – deve ser enviado aos Estados Unidos, onde o exame é realizado, o que torna o teste moroso (o resultado demora de 10 a 14 dias). No Brasil, o teste Oncotype é disponibilizado sob o nome de MammaGene, realizado por um laboratório particular no interior do Estado de São Paulo. O teste nacional apresenta o mesmo custo do americano, e o resultado demora 10 dias úteis.

Nos Estados Unidos, um modelo gerado para estimar o impacto financeiro do uso do Oncotype provocado por redução do uso de radioterapia adjuvante leva

economia média de US\$ 216,903 para o sistema de saúde público, e de US\$ 415,985 para o sistema privado de saúde (dados disponíveis em <http://www.oncotypedx.com/sitecore/content/ODX/Home/Breast/BreastManagedCare/~media/7FDA19EA97EA4C64A9066BD68F0239CE.ashx>). As implicações econômicas do uso do Oncotype também foram avaliadas em outros sete países (Israel, Japão, Austrália, Canadá, Singapura, Grécia e Hungria) e, em todos os casos, houve evidências de economia para o sistema de saúde.

Assim, este modelo clínico foi estabelecido para facilitar o acesso da população brasileira a testes moleculares de avaliação prognóstica mais precisa, menor custo e mais rápido. Como os testes laboratoriais aqui apresentados foram realizados em multiplex e, ao invés do uso de sondas de hidrólise, utilizaram marcações fluorescentes, seu custo está abaixo de todos os testes disponíveis até o momento (R\$ 1700,00), e exige três dias úteis para elaboração do laudo final (sendo 6hs operacionais + tempo para análise de resultado). A utilização de um teste nacional com valor prognóstico aqui proposto, a um custo de 4,6 vezes menor que os disponíveis, será de enorme benefício para o Sistema de saúde Nacional.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, foi possível estabelecer um método de PCR quantitativo para detecção de células tumorais circulantes na fração mononuclear do sangue periférico e determinar o perfilamento gênico tumoral para geração de um escore de avaliação prognóstica. Assim, foi possível padronizar uma tecnologia genômica complexa, mais rápida e de menor custo do que as comercialmente disponíveis, cujo uso para nossa população pode ser viabilizada se estudos posteriores confirmarem seu valor em outras coortes de pacientes com câncer de mama.

7. REFERÊNCIAS

Allen SD, Garrett JT, Rawale SV, Jones AL, Phillips G, Forni G, Morris JC, Oshima RG, Kaumaya PT. Peptide vaccines of the HER-2/neu dimerization loop are effective in inhibiting mammary tumor growth in vivo. *J Immunol*. 2007 Jul 1;179(1):472-82.

Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Bozionelou V, Agelaki S, Kanellou P, Kotsakis A, Politaki E, Kalbakis K, Kalykaki A, Vamvakas L, Georgoulas V, Mavroudis D. Circulating HER2 mRNA-positive cells in the peripheral blood of patients with stage I and II breast cancer after the administration of adjuvant chemotherapy: evaluation of their clinical relevance. *Ann Oncol*. 2007 May;18(5):851-8. Epub 2007 Feb 14. Erratum in: *Ann Oncol*. 2007 Nov;18(11):1916.

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jul;9(7):463-75.

Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol*. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii36-40.

Bauer KD, de la Torre-Bueno J, Diel IJ, Hawes D, Decker WJ, Priddy C, e col. Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging. *Clin Cancer Res* 2000 Sep;6(9):3552-9.

Benöhr P, Henkel V, Speer R, Vogel U, Sotlar K, Aydeniz B, Reiser A, Neubauer H, Tabiti K, Wallwiener D, Clare SE, Kurek R. Her-2/neu expression in breast cancer--A comparison of different diagnostic methods. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3B):1895-900.

Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Diéras V, Mathiot C, Mignot L, Thierry JP, Sastre-Garau X, Pierga JY. Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol*. 2008 Mar;19(3):496-500. Epub 2008 Jan 10.

Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M, Papadopoulos S, Apostolaki S, Stathopoulos E, e col. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004 Dec 15;10(24):8185-94

Braun S, Hepp F, Kentenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmaler G, e col. Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999 Dec;5(12):3999-4004.

Braun S, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kentenich C R M, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. Cytokeratin – positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N. Engl. J. Med* 2000 (342): 525-533.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, e col. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005 Aug 25;353(8):793-802.

Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003 Sep;12(3):541-52.

Burstein HJ, Harris LN, Marcom PK, Lambert-Falls R, Havlin K, Overmoyer B, Friedlander RJ Jr, Gargiulo J, Strenger R, Vogel CL, Ryan PD, Ellis MJ, Nunes RA,

Bunnell CA, Campos SM, Hallor M, Gelman R, Winer EP. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol*. 2003 Aug 1;21(15):2889-95.

Čabiňáková M, Tesařová P (2012) Disseminated and circulating tumour cells and their role in breast cancer. *Folia Biol (Praha)* 58:87-97

Camara O, Rengsberger M, Egbe A, Koch A, Gadjia M, Pachmann K et al. The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2007;18: 1484-92

Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, Leahy DJ.. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003 421, 756–760.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002 May;40(5):403-39.

Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Feb;14(1):110-22.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, e col. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004 Aug 19;351(8):781-91

Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 1;23(7):1420-30. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2005 Jul 20;23(21):4808.

Daskalaki A, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Xenidis N, Stathopoulos E, Kontopodis E, Hatzidaki D, Mavroudis D, Georgoulas V (2009) Detection of

cytokeratin-19 mRNA-positive cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 101:589–597

Diel IJ, Cote RJ. Bone marrow and lymph node assessment for minimal residual disease in patients with breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000 Feb;26(1):53-65.

Dietel M, Jöhrens K, Laffert M, Hummel M, Bläker H, Müller BM, Lehmann A, Denkert C, Heppner FL, Koch A, Sers C, Anagnostopoulos I. Predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Ther*. 2013 Apr;20(4):211-21.

Estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para 2012. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>. Acesso em 01 julho de 2013.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*. 2003 Feb;11(2):507-17.

Ferguson KM. Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys*. 2008;37:353-73.

Fiche M, Avet-Loiseau H, Heymann MF, Moussaly F, Digabel C, Joubert M, Classe JM, Dravet F, Fumoleau P, Ross J, Maugard CM. Genetic alterations in early-onset invasive breast carcinomas: correlation of c-erbB-2 amplification detected by fluorescence in situ hybridization with p53 accumulation and tumor phenotype. *Int J Cancer*. 1999 Oct 22;84(5):511-5.

Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsky P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevela P, Freibauer C, Müller V, Jänicke F, Schmidt M, Kölbl H, Rody A, Kaufmann M, Schroth W, Brauch H, Schwab M, Fritz P, Weber KE, Feder IS, Hennig G, Kronenwett R, Gehrman M, Gnant M; EP Investigators (2011) A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors. *Clin Cancer Res* 17:6012-6020

Fisher B, Jeong JH, Bryant J, Anderson S, Dignam J, Fisher ER, Wolmark N; National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials (2004) Treatment of lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet* 364:858-868

Folgueira MAAK & Brentani MM. Câncer de mama. In: *Oncologia molecular*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p.135-144.

Fonseca F L, Soares H P, Manhani A R, Bendit I, Novaes M, Zatta S M, Arias V, Pinhal M A, Weinschenker P, Del G A. Peripheral blood c-erbB-2 expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in breast cancer patients receiving chemotherapy. *Clin Breast Cancer* 2002; (3): 201-205.

Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell*. 2004 Apr;5(4):317-28.

Gangnus R, Langer S, Breit E, Pantel K, Speicher MR. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004 May 15;10(10):3457-64.

Ge M, Shi D, Wu Q, Wang M, Li L. Fluctuation of circulating tumor cells in patients with lung cancer by real-time fluorescent quantitative-PCR approach before and after radiotherapy. *J Cancer Res Ther*. 2005 Oct-Dec;1(4):221-6.

Gelmini S, Tricarico C, Vona G, Livi L, Melina AD, Serni S, e col. Real-Time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the measurement of prostate-specific antigen mRNA in the peripheral blood of patients with prostate carcinoma using the taqman detection system. *Clin Chem Lab Med* 2001 May;39(5):385-91.

Georgoulas V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, Kallergi G, Kalbakis K, Xyrafas A, Mavroudis D. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19 mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Ann Oncol*. 2012 Jul;23(7):1744-50.

Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Manikhas A, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, Vazquez F, Byakhov M, Lichinitser M, Climent MA, Ciruelos E, Ojeda B, Mansutti M, Bozhok A, Baronio R, Feyereislova A, Barton C, Valagussa P, Baselga J. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet*. 2010 Jan 30;375(9712):377-84.

Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J, Mariani G, Rodriguez J, Carcangiu M, Watson D, Valagussa P, Rouzier R, Symmans WF, Ross JS, Hortobagyi GN, Pusztai L, Shak S. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 10;23(29):7265-77.

Glinsky GV, Berezovska O & Glinskii AB. Micro-array analysis identifies a death- from -cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115:1503-21.

Habel LA, Quesenberry CP, Jacobs M, Greenberg D, Fehrenbacher L, Alexander C, Baker J, Watson D, Hackett J, Shak S (2005) Gene expression and breast cancer mortality in Northern California Kaiser Permanente patients: a large population-based case control study. *J Clin Oncol* 23(Suppl 18S):603

Hager G, Tong DCC, Schiebel I, Rezniczek GA, Watrowski R, Speiser P, Zeillinger R. The use of a panel of monoclonal antibodies to enrich circulating breast cancer cells facilitates their detection. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 211-216

Hankinson S E, Colditz G A, Willett W C. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res* 2004; (6): 213-218.

Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumor: case not proven. *Cancer Research* 2006 ; 66: 1891-95

Hobbs SS, Cameron EM, Hammer RP, Le AT, Gallo RM, Blommel EN, Coffing SL, Chang H, Riese DJ 2nd. Five carboxyl-terminal residues of neuregulin2 are critical for stimulation of signaling by the ErbB4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 2004 Jan 29;23(4):883-93.

Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M, Perraki M, Apostolaki S, Kafousi M, Chlouverakis G, Stathopoulos E, Lianidou E, Georgoulas V, Mavroudis D. Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2593-600.

Ignatiadis M, Perraki M, Apostolaki S, Politaki E, Xenidis N, Kafousi M, Stathopoulos E, Lianidou E, Sotiriou C, Georgoulas V, Mavroudis D (2007) Molecular detection and prognostic value of circulating cytokeratin-19 messenger RNA-positive and HER2 messenger RNA-positive cells in the peripheral blood of women with early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer* 7:883-889

Kirchner EM, Gerhards R, Voigtmann R. Sequential immunochemotherapy and edrecolomab in the adjuvant therapy of breast cancer: reduction of 17-1A-positive disseminated tumour cells. *Ann Oncol* 2002 Jul;13(7):1044-8.

Klein C, Schmidt-Kittler O, Schardt J, Pantel K, Speicher M, Riethmuller G. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *PNAS* 1999 Apr 13;96(8):4494-9.

Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ.

Kowalewska M, Chechlińska M, Markowicz S, Kober P, Nowak R. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer*. 2006 Nov;42(16):2671-4.

Krenke BE, Viculis L, Richard ML, Prinz M, Milne SC, Ladd C, Gross AM, Gornall T, Frappier JR, Eisenberg AJ, Barna C, Aranda XG, Adamowicz MS, Budowle B. Validation of a male-specific, 12-locus fluorescent short tandem repeat (STR) multiplex. *Forensic Sci Int*. 2005 Feb 10;148(1):1-14. Erratum in: *Forensic Sci Int*. 2005 Jun 30;151(1):109. Corrected and republished in: *Forensic Sci Int*. 2005 Jun 30;151(1):111-24.

Leitzel K, Teramoto Y, Konrad K, Chinchilli VM, Volas G, Grossberg H, Harvey H, Demers L, Lipton A. Elevated serum c-erbB-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol*. 1995 May;13(5):1129-35.

Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*. 2011 Sep;57(9):1242-55.

Liu S, Dontu G & Wicha. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 2005; 7: 86-95

Lobodasch K, Frohlich F, Rengsberger M, Schubert R, Dengler R, Pachmann, et al. Quantification of circulating tumor cells for the monitoring of therapy adjuvant therapy in breast cancer: An increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse. *The Breast* 2007;16: 211-18

Manhani A R, Manhani R, Soares H P, Bendit I, Lopes F, Nicoletti A G, Fonseca F L, Novaes M, Zatta S M, Arias V, Giralt S, Del G A. CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast cancer patients correlates with response to chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001; (66): 249-254.

Mikulova V, Kološtova K, Zima T. Methods for Detection of Circulating Tumour Cells and Their Clinical Value in Cancer Patients *Folia Biologica (Praha)* 2011 57, 151-161.

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4744-9.

Moliterni A, Ménard S, Valagussa P, Biganzoli E, Boracchi P, Balsari A, Casalini P, Tomasic G, Marubini E, Pilotti S, Bonadonna G. HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Feb 1;21(3):458-62

Muller P, Weckermann D, Riethmüller G, Schlimok G. Detection of genetic alterations in micrometastatic cells in bone marrow of cancer patients by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1996 May;88(1):8-16.

Nahta R, Esteva FJ. HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov 1;9(14):5078-84.

Naume B, Borgen E, Nesland JM, Beiske K, Gilen E, Renolen A, et al. Increased sensitivity for detection of micrometastases in bone-marrow/peripheral-blood stem-cell products from breast-cancer patients by negative immunomagnetic separation. *Int J Cancer* 1998 Nov 23;78(5):556-60.

Negro A, Brar BK, Lee KF. Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:1-12.

Nolé F, Munzone E, Zorzino L, Minchella I, Salvatici M, Botteri E, Medici M, Verri E, Adamoli L, Rotmensz N, Goldhirsch A, Sandri MT. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol*. 2008 May;19(5):891-7. Epub 2007 Dec 4.

Novaes M, Bendit I, Garicochea B, del Giglio A. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of cytokeratin 19 expression in the peripheral blood mononuclear cells of normal female blood donors. *Mol Pathol* 1997 Aug;50(4):209-11.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000 Jul 3;19(13):3159-67.

Pachmann K, Camara O, Kavallaris A, Krauspe S, Malarski N, Gajda M, Kroll T, Jörke C, Hammer U, Altendorf-Hofmann A, Rabenstein C, Pachmann U, Runnebaum I, Höffken K (2008) Monitoring the response of circulating epithelial tumor cells to adjuvant chemotherapy in breast cancer allows detection of patients at risk of early relapse. *J Clin Oncol* 26:1208-1215

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351:2817-2826

Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3726-34. Epub 2006 May 23.

Pantel K, Cote R J, Fodcast O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J. Natl. Cancer Inst* 1999; (91): 1113-1124.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, et al. Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1993 Sep 1;85(17):1419-24.

Pérez-Soler R. HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *Oncologist*. 2004;9(1):58-67.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52

Pusztai L. Current status of prognostic profiling in breast cancer. *Oncologist*. 2008 Apr;13(4):350-60

Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Jan 15;95(2):142-53.

Quintela-Fandino M, López JM, Hitt R, Gamarra S, Jimeno A, Ayala R, Hornedo J, Guzman C, Gilsanz F, Cortés-Funes H. Breast cancer-specific mRNA transcripts presence in peripheral blood after adjuvant chemotherapy predicts poor

survival among high-risk breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell support. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 1;24(22):3611-8.

Rabindran SK, Discafani CM, Rosfjord EC, Baxter M, Floyd MB, Golas J, Hallett WA, Johnson BD, Nilakantan R, Overbeek E, Reich MF, Shen R, Shi X, Tsou HR, Wang YF, Wissner A. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3958-65.

Reinholz MM, Nibbe A, Jonart LM, Kitmann K, Suman VJ, Ingle JN, Houghton R, Zehentner B, Roche PC, Lingle WL. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(10): 3722-32

Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 2004 Feb;5(2):79-88.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005 Oct 20;353(16):1673-84.

Savino M, Garrubba M, Parrella P, Baorda F, Copetti M, Murgo R, Zelante L, Carella M, Valori VM, Santini SA (2007) Development of real-time quantitative reverse transcription-PCR for Her2 detection in peripheral blood from patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 38:52-56

Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999 Mar;17(3):870-9.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001 Mar 15;344(11):783-92.

Smirnov D A, Zweitzig D R, Foulk B W, Miller M C, Doyle G V, Pienta K J, Meropol N J, Weiner L M, Cohen S J, Moreno J G, Connelly M C, Terstappen L W M M, O'Hara S M. Global Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells. *Cancer Res* 2005; 65: (12). June 15, 2005

Smith BM, Slade MJ, English J, Graham H, Lichtenborg M, Sinnott HD, Cross NC, Coombes RC. Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques. *J Clin Oncol*. 2000 Apr;18(7):1432-9.

Soares H.P, Del Giglio A., Silva R.S, CO, Kumar A, Djulbegovic B. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in the

peripheral blood of women with breast cancer: A meta-analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22, 878. 2003. Ref Type: Abstract

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23. Epub 2003 Jun 26

Stathopoulou A, Vlachonikolis I, Mavroudis D, Perraki M, Kouroussis Ch, Apostolaki S, Malamos N, Kakolyris S, Kotsakis A, Xenidis N, Reppa D, Georgoulas V. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3404-12.

Strati A, Kasimir-Bauer S, Markou A, Parisi C, Lianidou ES. Comparison of three molecular assays for the detection and molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013 Mar 7;15(2):R20

Strati A, Markou A, Parisi C, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou E (2011) Gene expression profile of circulating tumor cells in breast cancer by RT-qPCR. *BMC Cancer* 11:422

Tewes M, Aktas B, Welt A, Mueller S, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Jun;115(3):581-90.

Toussaint J, Sieuwerts AM, Haibe-Kains B, Desmedt C, Rouas G, Harris AL, Larsimont D, Piccart M, Foekens JA, Durbecq V and Sotiriou C. Improvement of the clinical applicability of the Genomic Grade Index through a qRT-PCR test performed on frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics* 2009, 10:424

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.

Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder ME, Yu J, Jatkoe T, Berns EM, Atkins D, Foekens JA. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005 Feb 19-25;365(9460):671-9.

Weinschenker P, Soares HP, Clark O, del Giglio A. Immunocytochemical detection of epithelial cells in the bone marrow of primary breast cancer patients: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2004 Oct;87(3):215-24.

Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1508-11.

Wicha MS, Liu S & Dontu G. Cancer stem cells: an old idea- a paradigm shift. *Cancer Research* 2006 ; 66: 1883-90.

Wissner A, Overbeek E, Reich MF, Floyd MB, Johnson BD, Mamuya N, Rosfjord EC, Discafani C, Davis R, Shi X, Rabindran SK, Gruber BC, Ye F, Hallett WA, Nilakantan R, Shen R, Wang YF, Greenberger LM, Tsou HR. Synthesis and structure-activity relationships of 6,7-disubstituted 4-anilinoquinoline-3-carbonitriles. The design of an orally active, irreversible inhibitor of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2). *J Med Chem*. 2003 Jan 2;46(1):49-63.

Woelfle U, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Jänicke F, van Diest P, et al. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 2003 Sep 15;63(18):5679-84.

Xenidis N, Markos V, Apostolaki S, Perraki M, Pallis A, Sfakiotaki G, Papadatos-Pastos D, Kalmanti L, Kafousi M, Stathopoulos E, Kakolyris S, Mavroudis D, Georgoulis V. Clinical relevance of circulating CK-19 mRNA-positive cells detected during the adjuvant tamoxifen treatment in patients with early breast cancer. *Ann Oncol*. 2007 Oct;18(10):1623-31.

Xenidis N, Perraki M, Kafousi M, Apostolaki S, Bolonaki I, Stathopoulou A, Kalbakis K, Androulakis N, Kouroussis C, Pallis T, Christophylakis C, Argyraki K, Lianidou ES, Stathopoulos S, Georgoulis V, Mavroudis D. Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 10;24(23):3756-62.

Yarden Y, Baselga J, Miles D. Molecular approach to breast cancer treatment. *Semin Oncol*. 2004 Oct;31(5 Suppl 10):6-13.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Feb;2(2):127-37.

You F, Roberts LA, Kang SP, Nunes RA, Dias C, Iglehart JD, Solomon NA, Friedman PN, Harris LN (2008) Low-level expression of HER2 and CK19 in normal peripheral blood mononuclear cells: relevance for detection of circulating tumor cells. *J Hematol Oncol* 1:2

Zehentner BK, Secrist H, Hayes DC, Zhang X, Ostenson RC, Loop S, Goodman G, Houghton RL, Persing DH. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of breast cancer patients during or after therapy using a multigene real-time RT-PCR assay. *Mol Diagn Ther*. 2006;10(1):41-7.

Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5701-10.

Zieglschmid D, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2005;42: 155-196.

ANEXO I

“Estudo de marcadores de Doença Residual Mínima (CK19 e CerbB2) através de RT-PCR quantitativo em tempo real e instabilidade genômica na fração mononuclear do sangue periférico em pacientes com câncer de mama durante o tratamento quimioterápico”.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pretendemos através deste estudo avaliar a presença no seu sangue de seis substâncias que poderão nos ajudar a prever como a sua doença irá evoluir. O nome destas substâncias são CK-19, CerbB2, ALU, PCR 15.1, CEA e CA 15-3. Além disso, mediremos também se há uma característica possivelmente produzida pelos efeitos da quimioterapia a que você vai ser submetida que é a instabilidade de microssatélites e doença residual mínima.

Este estudo será conduzido no setor de quimioterapia da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina do ABC e no Hospital Israelita Albert Einstein e consistirá apenas de coletas de sangue efetuadas antes de seu tratamento, e após de 3, 6 e 9 meses. (aproximadamente 3 amostras com 5.0 mL)

Você não terá nenhum custo ou risco além das coletas de sangue, se você concordar em participar deste estudo. Como não sabemos se o achado destas substâncias no seu sangue tem ou não alguma importância, seu tratamento será o mesmo das demais pacientes com as suas características tratadas em nosso setor de quimioterapia.

Caso você não concorde em participar deste estudo você será tratada da mesma maneira sem nenhuma mudança. Sinta-se, portanto, à vontade de recusar sua participação neste estudo caso você não queira ser nele incluída. Da mesma forma, se você concordar em participar, você poderá sair do estudo a qualquer momento sem prejuízo da continuidade de seu tratamento. Os membros da equipe de pesquisa e

responsáveis pelo estudo, abaixo elencados, estarão à sua disposição para quaisquer dúvidas ou esclarecimentos.

Se você concordar em participar, preencha e assine o formulário abaixo:

Eu, _____ RG: _____

Concordo em participar do estudo acima e, para tal, concordo em deixar que colem meu sangue hoje e nos intervalos da quimioterapia conforme explicado acima.

Assinatura do Paciente

Nome por extenso

Testemunha (se analfabeto)

Assinatura da testemunha

Dr. Auro Del Giglio
(Investigador Principal)
Tel.: 4993-5491

Dr. Fernando L. A. Fonseca
Responsável pela Pesquisa
Tel.: 4993-5488