

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS
TRONCO TUMORAIS EM TUMORES MALIGNOS DE
OVÁRIO E SUA CORRELAÇÃO COM CÉLULAS
TUMORAIS CIRCULANTES**

BRUNA MARIA MALAGOLI ROCHA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Ludmilla Thomé D. Chinen

Co-Orientador: Dr. Tiago Goss dos Santos

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Rocha, Bruna Maria Malagoli

Identificação e caracterização de células tronco tumorais em tumores malignos de ovário e sua correlação com células tumorais circulantes. Bruna Maria Malagoli Rocha – São Paulo, 2013.

56p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Ludmilla Thomé D. Chinen

Descritores: 1. NEOPLASIAS OVARIANAS. 2. CÉLULAS-TRONCO. 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 4. IMUNOCITOQUÍMICA.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.” (Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Aos queridos meus pais, Ângela e Carlos,
por todo amor, compreensão e incentivo que sempre recebi.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen, grande idealizadora deste trabalho, pela oportunidade, confiança, dedicação e principalmente pelo exemplo pessoal e profissional.

Ao grupo de trabalho e amizade, Emne, Natália, José Luis, Luciana, Juliana e Daniel, pela colaboração, incentivo e apoio.

Aos amigos do CIPE, por todo carinho e amizade. Em especial, à Fernanda, pela parceria, companheirismo e cumplicidade.

À minha família, Carlos, Ângela, Rafael, Marcela, Renata e Lucas, pelo apoio, incentivo e exemplo.

Ao Pedro, pelo amor e companheirismo de sempre.

Aos meus amigos de Marília e Uberaba, pela força enviada todos os dias.

Às equipes dos Departamentos de Anatomia Patológica, Oncologia Clínica e Ginecologia do A.C. Camargo Cancer Center, pelo apoio e colaboração durante todas as fases deste estudo.

À equipe da Pós-Graduação e à Biblioteca pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às empresas FAPESP, CAPES e Fundação Antônio Prudente – Hospital A.C. Camargo pelo auxílio financeiro e de infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma forma me apoiaram para que alcançasse essa conquista, dedicando seu tempo e esforços. Não há dúvidas de que sem vocês esta vivência não teria sido tão importante.

APOIO FINANCEIRO: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Rocha BMM. **Identificação e caracterização de células tronco tumorais em tumores malignos de ovário e sua correlação com células tumorais circulantes**. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer epitelial de ovário é considerado a malignidade ginecológica mais letal. Evidências atuais sugerem que a disseminação do câncer necessita da presença de células tumorais circulantes (CTCs). A detecção primária dessas células pode ajudar a identificar pacientes em necessidade de terapias sistêmicas adicionais após ressecção cirúrgica do tumor primário. Há um modelo que busca explicar o processo de iniciação e progressão do câncer estabelecendo a existência de células mais indiferenciadas, capazes de se auto-propagar, diferenciando-se em outras células e com capacidade de recapitular o tumor original *in vivo* e *in vitro*. Elas são chamadas de células tronco tumorais (CTTs). Alguns marcadores de superfície podem ser usados como guias para identificá-las. Apesar dos relatos na literatura sobre a identificação de CTTs e CTCs em tumores, pouco se tem falado sobre a correlação entre esses dois tipos celulares, principalmente em tumores epiteliais de ovário. **Objetivo:** Tivemos como objetivo identificar e caracterizar CTCs em amostras de sangue periférico de pacientes portadoras de tumor maligno de ovário do tipo seroso. Também buscamos identificar CTTs em amostras de tecidos parafinados de tumores malignos de ovário serosos. Tivemos também a intenção de relacionar esses dois tipos celulares por meio da expressão de mesmos marcadores em ambos. E, ainda, correlacionar a presença de CTCs, CTTs e seus marcadores em CTCs com variáveis clínicas e sobrevida. **Metodologia:** Foram coletados 16ml de sangue periférico de pacientes com tumor maligno de ovário seroso para a identificação de CTCs por meio de duas técnicas distintas: filtração e separação magnética. Para análise das CTCs foi

realizada dupla marcação imunocitoquímica (CD44; ALDH1, c-Kit), buscando encontrar marcadores de células tronco tumorais. **Resultados:** Foram identificadas e caracterizadas CTCs no sangue de 17 pacientes. Ao correlacionar idade com CTC, os dados mostram que em pacientes mais jovens a contagem de CTCs foi maior do que a mediana ($p < 0,001$). Houve correlação entre níveis séricos de CA125 e mediana da 1ª coleta de CTCs ($p=0,032$). Marcadores de CTTs foram identificados em CTCs de pacientes que apresentaram pior evolução. **Conclusão:** Altos níveis de CTCs no sangue das pacientes com tumores de ovário se correlacionaram diretamente com evolução tumoral. Pela análise imunocitoquímica, a expressão de dois marcadores de células tronco em uma mesma célula tumoral circulante sugere que as CTTs podem se desprender do tecido de origem e tornarem-se circulantes. Talvez as CTTs sejam uma subpopulação de CTCs.

SUMMARY

Rocha BMM. [Identification and characterization of tumor stem cells in malignant ovarian cancer and their correlation with circulating tumor cells]. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Epithelial ovarian cancer is considered the most lethal gynecologic malignancy. Current evidence suggests that the spread of cancer requires the presence of circulating tumor cells (CTCs). Primary detection of these cells may identify patients that need additional systemic therapy after surgical resection of the primary tumor. There is a model that tries to explain the process of initiation and progression of cancer by establishing the existence of undifferentiated cells, capable of self - propagating, differentiating into other cells and capable of recapitulate the original tumor in vivo and in vitro. They are called cancer stem cells (CSCs). Some surface markers can be used as guides to identify them. Despite reports in the literature on the identification of CTCs and CTTs and tumors, little has been said about the correlation between these two cell types, especially in epithelial ovarian tumor. **Objective:** We aimed to identify and characterize CTCs in peripheral blood samples from patients with malignant ovarian serous tumor. We try to identify CTTs in paraffin-embedded tissue samples of ovarian serous malignant tumors. We also intend to correlate these two cell types by the expression of the same markers in both. And yet, to correlate the presence of CTCs, CSCs and markers in CTCs with clinical variables and survival. **Methodology:** 16ml of peripheral blood was collected from patients with malignant ovarian serous tumor to identifying CTCs by two different techniques: filtration and magnetic separation. For analysis of CTCs double staining immunocytochemistry (CD44, ALDH1, c-Kit) was performed, trying to find markers of tumor stem cells. **Results:** Were identified and characterized CTCs in the blood of 17 patients. By correlating age and CTCs,

the data show that in younger patients counting CTCs was higher than the median ($p < 0.001$). There was a correlation between serum CA125 and median of CTCs' first collection ($p = 0.032$). CSCs' markers were identified in CTCs of patients with poor outcome. **Conclusion:** High levels of CTCs in the blood of patients with ovarian tumors correlated directly with tumor development. For immunocytochemical analysis, the expression of two stem cell markers in the same circulating tumor cells suggests that CTCs may be released from the tissue of origin and become current. Possibly CSCs are a subpopulation of CTCs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dupla marcação imunoistoquímica no tecido de tumor maligno de ovário seroso.....	30
Figura 2	Análise de sobrevida em relação ao número de células tumorais presentes no material parafinado que apresentavam dupla-marcação para CD44/ALDH1.....	33
Figura 3	Contagem de CTCs por ml de sangue de cada paciente.....	35
Figura 4	Imunocitoquímica em membrana do ISET e detecção de CTCs por marcação imunomagnética.....	36
Figura 5	Imunocitoquímica em CTCs isoladas de pacientes com câncer de ovário seroso.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Anticorpos e tecidos utilizados para a padronização do controle positivo.....	21
Quadro 2	Regime quimioterápico atual de cada paciente analisada.....	27
Quadro 3	Localização da lesão em cada paciente incluída no estudo de CTCs.....	28
Quadro 4	Análise das variáveis clínicas das 17 pacientes com tumor maligno de ovário seroso incluídas para estudo das CTCs.....	29
Quadro 5	Variáveis clínicas e presença de células duplamente marcadas.....	32
Quadro 6	Mediana de CTCs e CA125 em cada tempo de coleta.....	34
Quadro 7	Número de Célula Tumerais Circulantes encontradas em 1ml de sangue de cada paciente.....	35
Quadro 8	Correlação entre níveis de CTC na primeira coleta e idade das pacientes, tamanho da lesão, níveis séricos de CA 125, expressão de CK7, c-KIT, ALDH1 e CD44/ALDH1.....	38

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Células Tronco Tumorais (CTT) e câncer de ovário	4
1.2	Marcadores de CTT	6
1.3	Evidências de CTT em tumores de ovário	10
1.4	Células Tumorais Circulantes (CTC)	12
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Identificação de CTTs em tecido parafinado	18
3.1.1	Dupla marcação imunoistoquímica	18
3.2	Análise das CTCs	21
3.2.1	Crítérios Gerais de Inclusão	21
3.2.2	Crítérios Gerais de Exclusão	21
3.2.3	Identificação e contagem de CTCs	22
3.2.4	Caracterização de CTCs	23
3.3	Análise estatística	26
3.3	Caracterização da Amostra	26
4	RESULTADOS	30
4.1	Identificação de CTTs em tecido parafinado	30
4.1.1	Dupla marcação imunoistoquímica	30
4.2	Análise de CTCs	34
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	46

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
----------	---	-----------

ANEXOS

Anexo 1 Imagens do Controle Positivo dos anticorpos

Anexo 2 Termo de consentimento livre esclarecido

Anexo 3 Ficha de coleta de dados

Anexo 4 Folha de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

1 INTRODUÇÃO

O tumor de ovário é a décima causa de morte por câncer no mundo (PARKIN et al. 2005; SIEGEL et al. 2011), e o sexto mais frequente (PARKIN et al. 2005), com uma estimativa de 225 mil novos casos no ano de 2008, com um risco aproximado de 6,3 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011). Nos Estados Unidos, o câncer de ovário é a quarta causa de morte por câncer em mulheres (SIEGEL et al. 2011). No Brasil, foram estimados 6190 novos casos dessa neoplasia para o ano de 2012, com um risco estimado de 6 casos a cada 100 mil mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer de ovário é o sétimo mais incidente na maioria das regiões, com um risco estimado de 8 casos novos a cada 100 mil mulheres na região Sul, 7 a cada 100 mil na região Sudeste, 6 a cada 100 mil na região Centro-Oeste e 4 a cada 100 mil na região Nordeste. Na região Norte, o câncer de ovário é o oitavo mais freqüente, com dois casos novos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011).

A neoplasia epitelial de ovário é considerada como a malignidade ginecológica mais letal, com a maioria dos casos sendo diagnosticados após metastatização da doença. Apesar da responsividade à terapia primária, a maioria das pacientes apresenta doença recorrente devido à seleção ou aquisição de quimiorresistência por células residuais (VISVADER e LINDEMAN 2008).

Na sua maioria, os tumores ovarianos se originam do: (1) epitélio celômico superficial, que dá origem ao epitélio mulleriano, às tubas uterinas (células colunares ciliadas serosas), revestimento endometrial (células colunares aciliadas), ou glândulas endocervicais (células aciliadas mucinosas), e tem como principais tipos celulares o epitélio seroso, epitélio mucinoso e epitélio endometrióide; (2) estroma do ovário, que inclui os cordões sexuais; e (3) células germinativas, que migram para o ovário a partir do saco vitelino e são células pluripotenciais (BOROWITZ et al. 2004, CRUM 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Dentre os inúmeros tipos de neoplasias epiteliais de ovário, existem as benignas, *borderlines* ou malignas (BOROWITZ et al. 2004; CRUM 2004).

Os tumores ovarianos benignos correspondem a 80% dos casos e ocorrem, normalmente, em mulheres jovens entre 20 e 45 anos de idade (BOROWITZ et al. 2004; CRUM 2004; MENON et al. 2005). As neoplasias *borderlines*, ou seja, de malignidade limítrofe ou de baixo grau de malignidade, diferenciam-se das benignas e malignas por apresentarem ausência de invasão estromal dentro do ovário; múltiplas camadas epiteliais; atividade mitótica aumentada e atipia nuclear (BOROWITZ et al. 2004; CRUM 2004). Esse tipo de neoplasia possui baixo potencial de malignidade, sendo considerada indolente (CADRON et al. 2007). A idade média ao diagnóstico é 40 anos. A sobrevida global em cinco anos é de aproximadamente 98% para os estádios iniciais (estádio I e II), e de 86% a 92% para os estádios mais avançados (estádio III e IV) (BOROWITZ et al. 2004; CADRON et al. 2007; CANNISTRA et al. 2008).

Os tumores malignos são mais comuns nas mulheres entre 40 e 65 anos de idade (BOROWITZ et al. 2004; CRUM 2004; MENON et al. 2005). Aproximadamente 70% das neoplasias epiteliais do ovário são diagnosticadas como doença avançada, que raramente é curável (EAGLE et al. 1997; MENON et al. 2005; ARMSTRONG et al. 2006; OZOLS 2006; MÖBUS et al. 2007; CANNISTRA et al. 2008). Aproximadamente 90% das neoplasias primárias originam-se no epitélio celômico (CRUM 2004; BOROWITZ et al. 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Estudos demonstram que a sobrevida em cinco anos é de 95% para os casos de tumor localizado no ovário, 72% para os casos com implantação regional e 31% para os casos com tumor disseminado. No momento do diagnóstico, 29% dos casos apresentam-se com tumor restrito aos ovários, 6% com tumores disseminados regionalmente e 59% com disseminação à distância (JEMAL et al. 2004).

Assim como a localização, a histologia e o grau são importantes fatores prognósticos. As pacientes com tumores limítrofes possuem excelente prognóstico, mesmo quando há doença extra-ovariana. No entanto, mulheres com câncer de ovário invasivo bem-diferenciado (grau histológico I) e moderadamente diferenciado (grau histológico II) têm prognóstico melhor do que aquelas com tumores pouco diferenciados ou indiferenciados (grau histológico III) (BOROWITZ et al. 2004; CRUM 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Estudos demonstram que frequentemente há comprometimento dos linfonodos regionais, podendo-se encontrar metástase pleural, hepática,

pulmonar, no trato gastrointestinal e em outros locais (BOROWITZ et al. 2004; CRUM 2004; CANNISTRA et al. 2008).

Numerosos agentes quimioterápicos têm levado a maiores chances de cura na adjuvância, já que as neoplasias de ovário são quimiossensíveis (MARKMAN e BOOKMAN 2000; BOROWITZ et al. 2004; OZOLS 2006; MÖBUS et al. 2007). Atualmente, o regime padrão para tratamento de câncer ovariano epitelial avançado é composto pela combinação de carboplatina e paclitaxel (OZOLS 2006; ARMSTRONG et al. 2006; GALLIGIONI et al. 2006), resultando em remissão completa em aproximadamente 75% do total de pacientes (MARKMAN e BOOKMAN 2000; OZOLS 2006; PIGNATA et al. 2006; GALLIGIONI et al. 2006; MÖBUS et al. 2007). A combinação desses dois quimioterápicos tem melhorado tanto a sobrevida livre de progressão (tempo entre o início do tratamento e a recidiva ou óbito sem recidiva; varia de 16 a 21 meses dependendo do volume da doença e do tempo em que a quimioterapia foi iniciada) quanto a sobrevida global (tempo entre o início do tratamento e o óbito; varia de 24 a 60 meses e é dependente também do volume da doença no diagnóstico) (OZOLS 2006; MÖBUS et al. 2007).

1.1 CÉLULAS TRONCO TUMORAIS (CTTS) E CÂNCER DE OVÁRIO

O câncer é uma doença multigênica, que de maneira geral representa proliferação descontrolada, diferenciação e metástase (SENGUPTA e

CANCELAS 2010; MAENHAUT et al. 2010). Vários pesquisadores têm buscado explicar o processo de iniciação e progressão do câncer. No entanto, nos últimos anos têm sido propostos modelos alternativos que expliquem a evolução dessa doença. Dentre eles, há um que estabelece a existência de células capazes de auto-propagar, de se diferenciar em outras células e de iniciar o tumor *in vivo* e *in vitro*. Elas são chamadas de células tronco tumorais (CTTs).

HAMBURGER e SALMON (1977) estabeleceram a ideia de que o câncer pode conter CTTs. Seus experimentos demonstraram que apenas poucas células tumorais foram capazes de formar colônias *in vitro*, produzindo todos os tipos de células dentro de um tumor e estabelecer linhagens de células imortais. Isto aumentou a hipótese de que apenas uma minoria de células auto-propagadas dentro do tumor são capazes de sustentá-lo (HAMBURGER e SALMON 1977).

As células tronco adultas normais, com a sua característica de se auto-propagar infinitamente, estão susceptíveis ao acúmulo de mutações oncogênicas do que as células diferenciadas que apresentam curta sobrevivência. Dessa forma, tem sido proposto que as CTTs originam-se de transformação maligna de células tronco normais adultas ou de células progenitoras que adquiriram as propriedades de células-tronco. Tem sido proposto também que células diferenciadas (progenitoras) readquirem características de células tronco por reativação de vias de sinalização como WNT/ β catenina, Hedgehog/Ptached, Bmi1, o que facilitaria a auto-

propagação e a transformação maligna (GAO 2008; MCDONALD et al. 2009; WELTE et al. 2010).

As CTTs possuem habilidade de auto-renovação e de geração de células diversas que compõem o tumor. Inicialmente elas foram identificadas em leucemia mieloide aguda (LAPIDOT et al. 1994), mas hoje têm sido identificadas em muitos tumores sólidos, como: ovário, mama, cérebro, próstata, pâncreas, fígado, cabeça e pescoço e tumores hematológicos (revisado por PONNUSAMY e BATRA 2008; revisado por VISVADER e LINDEMAN 2008).

1.2 MARCADORES DE CTT

Existem marcadores de superfície das células tronco normais que fornecem um guia para identificar CTTs, que se baseia na premissa de que CTTs são derivadas de células tronco normais ou na diferenciação das células progenitoras com imunofenótipo similar. Marcadores de superfície celular como CD24, CD44, CD133, C-KIT e moléculas de adesão epitelial (EpCAM), fatores de transcrição OCT-3/4, AP-2 γ e NANOG, dentre outros como CD166, CD31, NESTINA, CD34, CD38, ALDH1, BMI1 são utilizados para identificar CTTs (HILL e PERRIS 2007).

Esses marcadores são observados por meio da técnica de imunoistoquímica, identificando CTTs em muitos órgãos (BONNET e DICK 1997). O câncer de mama foi o primeiro tumor sólido no qual se identificou e

isolou CTTs, que foram descritas como células com CD44+CD24-/low e com capacidade para iniciar o tumor (AL-HAJJ et al. 2003).

Considerado um dos mais bem estabelecidos e comuns marcadores de CTTs, CD44 é uma glicoproteína transmembrânica, receptor do ácido hialurônico, com a função de adesão celular, transmissão de sinais mediando hematopoiese e apoptose. CD44 tem sido associado ao câncer clinicamente agressivo, sendo encontrado em células linfo-hematopoiéticas, tecidos epiteliais e não epiteliais. Entre os tumores que expressam esta proteína temos: carcinoma papilífero de tireóide, carcinomas de mama, gastrointestinal, bexiga, ovário, colo de útero, próstata, melanoma e linfomas não Hodgkin (VAN RHIJN et al. 2003). ZHANG et al. (2008) analisaram esferas tumorais geradas de ascites de 5 pacientes com tumor de ovário seroso. As células expressavam grande quantidade de CD44 e CD117. Essas mesmas esferas eram resistentes à quimioterapia e capazes de iniciar a formação de tumor em camundongos.

O proto-oncogene C-KIT (também conhecido com CD117) codifica uma proteína transmembrânica, o tipo III de receptor de tirosina kinase relacionada ao fator de crescimento derivado de plaquetas. A proteína C-Kit é ativada pelo seu ligante, o fator de células-tronco, e tem papel no desenvolvimento de muitos processos embrionários, incluindo gametogêneses, melanogênese e hematopoiese, bem como algumas funções de transdução de sinal em muitas células (MIETTINEN e LASOTTA 2005). Estudo demonstra que a proteína C-Kit foi super expressa em

tumores mesenquimais de útero e ovário, sugerindo que Kit tem um papel significativo na oncogenese destes tumores (ERDOGAN et al. 2007).

A família aldeído desidrogenase (ALDH) catalisa a oxidação de aldeídos alifáticos e aldeídos aromáticos a ácidos carboxílicos. O marcador ALDH1 tem papel na conversão de retinol a ácido retinóico, o que é importante para a diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula. Recentemente, foi mostrada a atividade do ALDH1, também conhecido como ALDH1A1, para identificar a fração tumorigênica em câncer de mama (VISVADER e LINDEMAN 2008). Em outro estudo com câncer de mama, a superexpressão desse marcador foi identificada em aproximadamente 70% das amostras de sangue também positivas para células tumorais circulantes (AKTAS et al. 2009). Estudo analisou a combinação na expressão de CD133 e ALDH. Os autores observaram que as células que expressavam essas duas proteínas eram capazes de iniciar tumores em camundongos. No entanto, essa capacidade foi perdida em células que expressavam apenas ALDH (KUSUMBE et al. 2009).

Também conhecida como prominina-1, CD133 é uma glicoproteína transmembrânica (CORBEIL et al. 2010). Apesar de não ter ainda sua função bem definida, CD133 é o principal marcador para CTT. FERRANDINA et al. (2008) analisaram a expressão de CD133 em 41 tumores malignos de ovário, 5 tumores benignos de ovário e em 8 ovários normais. Eles encontraram que as células que expressavam CD133 tinham maior capacidade de formação de colônia. Os autores descreveram, ainda, que as células dos ovários normais e dos ovários com tumores benignos

tinham baixa expressão dessa proteína, quando comparadas com as células dos tumores malignos de ovário. BABA et al. (2009) também demonstraram em estudo que as células que expressavam CD133 tinham maior capacidade de iniciação tumoral e eram mais resistentes à quimioterapia quando comparadas às células que não expressavam a proteína.

NESTINA é um filamento intermediário de proteína do citoesqueleto, que foi identificado pela primeira vez em células tronco neuroepiteliais, mas também está presente em outros tecidos como retina, derme, pâncreas, trato gastrointestinal, alguns tecidos adultos normais, alguns tecidos adultos lesionados ou em tumores malignos (revisado por WIESE et al. 2004).

A família de fatores de transcrição AP-2 é constituída por 5 membros: AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ , AP-2 δ e AP-2 ϵ (revisado por ECKERT et al. 2005). Alguns dos genes ativados por AP-2 é o TGF- α , o receptor de estrógeno, c-KIT, collagenase tipo IV e HER2/neu. AP-2 também regula negativamente alguns genes, dentre eles o MCAM/MUC18, c-EBP- α durante a adipogênese e c-MYC (revisado por HILGER-EVERSHEIM et al. 2000). Níveis aumentados de AP-2 têm sido encontrados em vários tipos de tumores (revisado por ECKERT et al. 2005).

A proteína AP-2 γ é codificada pelo gene TFAP2C, localizado no cromossomo 20q13.2 em humanos (AUMAN et al. 2002). Alta expressão da proteína AP-2 γ foi observada em câncer de mama e de testículo quando comparada com tumor benigno dos órgãos respectivos (TURNER et al. 1998; HOEI-HANSEN et al. 2004).

1.3 EVIDÊNCIAS DE CTT EM TUMORES DE OVÁRIO

Tem-se sugerido que, após a ruptura do tecido causado pela ovulação, as células-tronco normais adultas contribuem para o reparo e regeneração do epitélio normal do ovário. Sabe-se que dentro do epitélio ovariano, as células tronco se dividem de maneira assimétrica para manter a homeostase tecidual. No entanto, repetidas auto-propagações podem acumular mutações podendo levar a transformações malignas das células tronco, levando ao surgimento das CTTs (HOMBACH-KLONISCH 2008).

Sabe-se que, na maioria dos casos de neoplasia epitelial de ovário, o diagnóstico é feito após a metastatização da doença, fato que a torna a malignidade ginecológica mais letal. Mesmo respondendo à terapia primária, a maioria das pacientes apresenta doença recorrente devido à seleção ou aquisição de quimio-resistência por células residuais (VISVADER e LINDEMAN 2008).

Dentre os fatores que dão suporte à presença de CTTs em câncer de ovário, destaca-se a resistência à quimioterapia e a diversidade fenotípica histológica. Tem sido demonstrado que as CTTs, que correspondem a uma pequena população de células tumorais (menos de 5%), são responsáveis pela agressividade da doença, metástase e resistência à terapia (revisado por PONNUSAMY e BATRA 2008). Dessa forma, pode-se sugerir que CTTs contribuem para o câncer de ovário (CHIEN et al. 2007; TILLY e RUEDA 2008).

Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, realizado em nosso laboratório, buscou analisar a expressão de marcadores de CTTs em pacientes com câncer de ovário e correlacioná-la à sobrevida. Pode-se observar, por meio de imunoistoquímica, a expressão alterada de marcadores de CTTs (CD133, NESTINA, AP-2 γ , CD44 e CD117) em 129 amostras de neoplasia do epitélio de ovário obtidas do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center entre 2000 e 2009. Ao final do estudo, a alta expressão da proteína NESTINA foi associada a tumores malignos ($p=0,049$), com metástase tumoral ($0,087$). Alta expressão de C-Kit associou-se a tumores metastáticos ($p=0,0366$). Baixa expressão de CD44 e AP-2 γ foram associadas ao baixo estágio clínico ($p=0,0025$ e $p=0,0004$, respectivamente), a tumores sem metástase ($p=0,0137$ e $p=0,0026$, respectivamente), a tumores bem/moderadamente diferenciados ($p=0,0274$ e $p=0,0263$), e a tumores unilaterais ($p<0,0001$, ambos). A expressão da proteína CD133 não mostrou associação com os parâmetros analisados. Em relação à sobrevida global, pacientes com alta expressão de C-Kit e CD133 tiveram menor sobrevida ($p=0,0004$ e $p=0,0269$, respectivamente) e pacientes com alta expressão de CD44 e AP-2 γ apresentaram melhor sobrevida ($p=0,0221$ e $p=0,0269$, respectivamente). Para sobrevida livre de progressão, pacientes com pior sobrevida foram aqueles com baixa expressão de CD44 ($p=0,021$). O estudo mostrou que as proteínas relacionadas às CTTs estão presentes em vários tipos de tumores epiteliais de ovário e que a sua expressão pode ser uma ferramenta útil para avaliar o prognóstico desses tumores. No entanto, embora os marcadores

CD133, AP-2 γ , CD44, C-Kit e NESTINA estejam relacionados à presença de CTTs, não foi possível afirmar com certeza que a população de células que expressa estes marcadores seja realmente CTT (KOHAYAGAWA 2010). Para a validação desses resultados é importante que seja feita uma dupla marcação nas células tumorais, a fim de se encontrar células que expressem simultaneamente dois marcadores específicos para CTTs, conforme já descrito na literatura (ZHANG et al. 2008).

1.4 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTC)

Acredita-se que a disseminação do câncer necessita da presença de células tumorais circulantes (CTCs- *circulating tumor cells*), que são células raras circundadas por bilhões de células hematopoiéticas na circulação sanguínea (MEGO et al. 2010).

Atualmente, postula-se que as chamadas CTCs tendem a metastatizar em certos órgãos, que são seletivos para determinados tumores, conforme conceito histórico de “solo e semente”, formulado por Stephen Paget (revisado por LURJE et al. 2010).

A circulação espontânea de células tumorais e/ou de microêmbolos determina o comportamento tumoral invasivo (PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007). Geralmente é indetectável por análise histopatológica convencional e por exames de imagem de alta resolução. Por isso, ensaios imunoistoquímicos e moleculares mais sensíveis têm sido desenvolvidos e vêm permitindo a detecção específica de células tumorais metastáticas em

linfonodos regionais, sangue periférico e medula óssea (M.O.) (MULLER et al. 2006).

A detecção primária de células tumorais circulantes (CTC) pode ajudar a identificar pacientes em necessidade de terapias sistêmicas adicionais após ressecção cirúrgica do tumor primário. Apesar de todas as terapias serem desenvolvidas para prevenir a recaída metastática, a seleção de pacientes baseia-se no risco estatístico de desenvolverem recorrência, sem saber se de fato eles abrigam qualquer CTC. Isto leva a supertratamento desses pacientes com agentes tóxicos com efeitos colaterais graves (FEHM et al. 2008). Desta forma, incluir a detecção ou contagem de CTCs na análise dos pacientes tornaria o tratamento mais eficiente e com menor sofrimento para os pacientes.

Acredita-se que CTCs representem células quimiorresistentes que podem contribuir para uma recorrência tardia. Como há concordância entre níveis de CTCs e testes radiológicos, as recorrências podem ser testadas com mais frequência, sem prejuízo aos pacientes (revisado por NAGAI AH e ABRAHAM 2010).

A presença de CTC é um marcador de prognóstico independente para alguns tipos de câncer incluindo mama, próstata e colorretal metastáticos. Em recente estudo, POVEDA et al. (2011) mostraram que os números elevados de CTC denotam prognóstico desfavorável para pacientes com câncer de ovário. Foram selecionadas 672 pacientes de 124 centros em 21 países entre abril de 2005 e maio de 2007. Eram pacientes com câncer de ovário avançado previamente tratadas com fármacos baseados em platina.

Apenas 216 pacientes concordaram em participar do estudo. As CTCs foram isoladas e enumeradas usando *CellSearch System*® (Veridex, *Jonhson & Jonhson*). Historicamente, 0% dos indivíduos normais e menos de 1% dos pacientes com doença benigna têm duas ou mais CTCs em 7,5ml de sangue (POVEDA et al. 2011). Dessa forma, para a análise dos resultados, menos de 2 CTCs por 7,5 ml de sangue foi considerado favorável e um nível de 2 ou mais CTCs nesse mesmo volume de sangue foi considerado desfavorável. O estudo obteve os seguintes resultados: 14,4% das pacientes tinham 2 ou mais CTCs no início da terapia; no grupo das pacientes consideradas favoráveis, 68% eram sensíveis à platina, comparadas a 55% das pacientes do grupo das desfavoráveis. O estudo concluiu que a média de sobrevida livre de progressão (SLP) das pacientes com menos de 2 CTCs foi significativamente maior do que a SLP das pacientes com 2 ou mais CTCs.

Como já foi dito, as CTCs são uma população distinta de células cancerígenas que se destacaram do tumor primário e caíram na corrente sanguínea, podendo criar um tumor secundário. O início da metástase envolve a criação de CTCs e sabe-se que alguns fatores estimulam a transição epitélio mesênquima (TEM), necessária para a metastatização. Nesse processo células cancerígenas epiteliais primárias interagem com a membrana basal através de fatores bioquímicos, adquirindo fenótipo de células mesenquimais. Essas células migram para tecidos distantes através dos vasos sanguíneos. Sua sobrevivência depende da interação entre elas e seu hospedeiro. Durante esse processo também extravasam muitos fatores

angiogênicos e agentes de sinalização que contribuem para a colonização. Na TEM os níveis de marcadores epiteliais como E-caderina e citoqueratina diminuem. Em contraste, muitos marcadores mesenquimais, como vimentina e fibronectina, são expressos em maior quantidade e, então, as células tumorais têm sua capacidade de invasão aumentada. Dessa forma, a micrometástase ocorre seguida pela macrometástase. Assim, as CTCs podem ser consideradas como progenitoras de recidivas. O processo descrito acima nos faz pensar que as CTCs podem possuir marcadores de uma célula tronco tumoral, já que as CTTs tem capacidade de originar um novo tumor (TOLUDI et al. 2011). Sabendo que as CTTs tem capacidade de auto-renovação e divisão celular assimétrica, estando envolvidas no processo de metástase e que as CTCs também estão envolvidas nesse processo, pode ser que ambas expressem as mesmas proteínas e talvez sejam até a mesma célula. No entanto, essa hipótese necessita ser confirmada.

Segundo KSIAZKIEWICZ et al. (2012), a descoberta de células tumorais circulantes, responsáveis pela disseminação tumoral, e de células tronco tumorais, necessárias para a manutenção do crescimento tumoral, dá maior destaque à cascata metastática. Parece que CTCs e CTTs não são necessariamente populações separadas de células cancerosas. Assim como as CTCs podem ser geradas por meio do processo de transição epitélio mesênquima, esse tipo celular pode manter características de CTTs.

Apesar dos relatos na literatura sobre a identificação de CTTs e CTCs em tumores, pouco se tem falado sobre a correlação entre esses dois tipos

celulares, principalmente em tumores epiteliais de ovário. Deve-se destacar que as análises realizadas nesse estudo permitirão uma melhor caracterização morfológica dessas células. É importante também validar os resultados encontrados em um estudo prévio do grupo, por meio da realização de dupla marcação imunoistoquímica em células tumorais para se encontrar células que expressem simultaneamente dois marcadores específicos para CTTs. Após a identificação desses marcadores, é importante compará-los com as proteínas expressas pelas CTCs, já que existe uma hipótese de que esses dois tipos celulares não sejam grupos distintos. É grande a importância de se correlacionar CTCs e CTTs com sobrevida livre de recorrência e sítio metastático, como forma de entender melhor a doença. Finalmente, o estudo da biologia de CTTs e CTCs poderá sugerir o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento deste tipo de tumor, principalmente se, de fato, as CTCs e CTTs constituírem o mesmo tipo celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar as células tumorais circulantes em amostras de sangue periférico de pacientes portadoras de tumor maligno de ovário seroso, além de correlacioná-las com células tronco tumorais obtidas de amostras de tecidos parafinados de tumores malignos de ovário serosos, buscando encontrar a expressão dos mesmos marcadores nos dois tipos celulares (CTCs x CTTs).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Confirmar os resultados de um estudo prévio com material parafinado tumor epitelial de ovário, por meio da realização de uma dupla marcação imunohistoquímica para CD44 e ALDH1 nas células tumorais;
2. Identificar CTTs por meio de uma dupla marcação imunoistoquímica em tecidos parafinados de pacientes com tumor maligno de ovário seroso e correlacioná-las com sobrevida livre de recorrência e sobrevida global;
3. Definir dois marcadores de CTTs que são melhores expressos nos tecidos das pacientes com tumor maligno de ovário seroso;

4. Isolar, identificar e quantificar as CTCs no sangue periférico das pacientes com tumor maligno de ovário seroso em 3 coletas distintas;
5. Analisar e caracterizar os dois grupos celulares (CTCs e CTTs) identificados nas pacientes incluídas no estudo de CTCs, em sangue e material parafinado, respectivamente;
6. Correlacionar as CTCs e CTTs por meio dos marcadores expressos neste tipo celular.
7. Correlacionar o nível de CTCs encontradas com as variáveis clínicas apresentadas pelas pacientes do estudo e níveis séricos de CA125.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Tivemos dois grupos de estudo distintos:

1. Para a pesquisa de marcadores de CTTs selecionamos 25 pacientes que tiveram tumor maligno de ovário seroso entre os anos de 2000 e 2007, e foram tratadas no A.C. Camargo Cancer Center. Essa seleção foi feita a partir de um banco de dados montado para estudo prévio. Reunimos os blocos de parafina armazenados no Arquivo da Anatomia Patológica do mesmo hospital e confeccionamos as lâminas para imunoistoquímica.
2. Para a pesquisa de CTCs no sangue periférico selecionamos 17 pacientes com tumor maligno de ovário seroso que iniciariam o tratamento no A.C. Camargo Cancer Center.

3.1 IDENTIFICAÇÃO DE CTTS EM TECIDO PARAFINADO

3.1.1 Dupla marcação imunoistoquímica

Para avaliar a co-expressão das proteínas CD44/C-Kit e CD44/ALDH1, cortes histológicos de 4µm foram obtidos dos blocos de tecidos tumorais fixados em formalina e em parafina de 25 tumores malignos de ovário serosos de 25 pacientes, armazenados no Arquivo da Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. A dupla marcação

imunoistoquímica foi realizada manualmente seguindo protocolo adaptado que utiliza os kits Advance HRP (Dako) e Envision Flex/HRP (Dako).

O tecido foi desparafinado com banhos de xilol e álcool. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão (Pascal), seguindo a especificação do fabricante dos anticorpos. As lâminas foram banhadas com peróxido de hidrogênio 3% para o bloqueio da peroxidase endógena e em seguida foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas por meio da aplicação do Protein Block Serum-Free™ (Dako). O anticorpo primário foi diluído em Antibody Diluent with Background reducing components™ (Dako) e incubado em câmara úmida por, no mínimo, 1 hora. Após três banhos em Wash Buffer™ 1x (Dako), foi aplicado o sistema de detecção EnVision+Dual Link System - HRP (Dako), seguido do cromógeno Liquid DAB (Dako). O segundo anticorpo primário foi incubado por 1 hora, seguido por outra incubação de 20 minutos com o Rabbit/Mouse (LINK) (Kit Envision™ G/2 System/AP). Após três lavagens com Wash Buffer™ 1x (Dako), as lâminas foram incubadas por 30 minutos com AP Enzyme (Enhancer). O segundo anticorpo foi revelado por Permanent Red. A contracoloração foi realizada com hematoxilina. Após a lavagem em água corrente, as lâminas foram desidratadas em banhos de álcool e xilol e em seguida montadas com meio de montagem Entellan (Merk).

A avaliação dos resultados do estudo imunohistoquímico e a digitalização das lâminas foi feita utilizando o ScanScope™ (Aperio).

Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado, e de um controle

negativo da reação (retirada do anticorpo primário e retirada do complexo secundário) (Quadro 1).

Quadro 1 - Anticorpos e tecidos utilizados para a padronização do controle positivo.

Anticorpos	Diluições	Clones	Códigos	Fornecedores	Controle Positivo
CK7	1:50	OV-TL 12/30	M7018	Dako	Tumor de ovário
CD44	1:500	Policlonal	HPA 005785	Sigma-Aldrich	Pele
C-Kit	1:50	YR145	117R-16	Cell Marque	Pulmão normal
ALDH1	1:500	Policlonal	HPA 002123	Sigma-Aldrich	Pele
CD45	1:100	2811+PD 7/26	M0701	Dako	Leucócito

3.2 ANÁLISE DAS CTCS

3.2.1 Critérios Gerais de Inclusão

Foram incluídas nesse estudo pacientes com tumor maligno de ovário do tipo seroso, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.2.2 Critérios Gerais de Exclusão

Foram excluídas desse estudo pacientes com história prévia de outro carcinoma nos últimos dois anos e pacientes que tivessem realizado quimioterapia nos últimos 15 dias.

3.2.3 Identificação e contagem de CTCs

Amostras de sangue (16,0 mL) foram coletadas em tubos contendo EDTA no momento da punção venosa realizada antes da primeira quimioterapia. Duas novas amostras de 8,0 mL de sangue periféricos foram coletadas 60 e 120 dias após a primeira coleta, respectivamente. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e processadas dentro de 4 horas. Todo o material foi esgotado. Foi realizado um acompanhamento das pacientes por meio de busca de dados em prontuários médicos.

Na primeira coleta a identificação e contagem das células foi realizada por meio da utilização do kit da empresa Miltenyi Biotec Inc., Bergisch Gladbach, Alemanha. O enriquecimento das CTCs foi realizado por marcação direta imunomagnética das células CK positivas pela adição de 200µL de bloqueador de FcR e de 200µL anticorpos anti-CK (pool de citoqueratinas) conjugados a *beads* magnéticos (ambos da empresa Miltenyi Biotec Inc., Bergisch Gladbach, Alemanha). Após a separação, as células foram eluídas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-citoqueratinas conjugado com ficoeritrina (reconhece citoqueratinas 7 e 8) para identificar células epiteliais (MOLL et al. 2008). As lâminas foram coradas com hematoxilina para análise da morfologia nuclear. As células foram analisadas em microscópio de campo claro e CTCs foram definidas como células com núcleo oval, positivas para citoqueratinas. Como forma de seleção negativa, no mesmo experimento fazíamos a técnica de imunofluorescência. Os leucócitos eram marcados com o anticorpo anti-

CD45 (1:100, Dako, clone 2811+PD7/26, código M0701) e o núcleo com DAPI (4'.6'-Diamidino-2-Phenilindole).

3.2.4 Caracterização de CTCs

Para a análise e caracterização das CTCs, apenas na primeira coleta de sangue, usamos o sistema ISET (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells*). Trata-se de um método direto de obtenção das células epiteliais por filtração. Baseia-se na observação de que a maioria dos leucócitos do sangue periférico (linfócitos e neutrófilos) é composta pelas menores células do corpo, com um tamanho que varia de 8 a 11 μm . Desta forma, estas células podem ser eliminadas por filtração do sangue através de uma membrana de policarbonato com poros calibrados de 8 μm . A simplicidade do método evita a perda de células raras em múltiplos passos de isolamento. Após isoladas, as CTCs podem ser avaliadas por hematoxilina-eosina, ou caracterizadas por imunocitoquímica, Fluorescent in situ hybridization (FISH) ou microdissecadas para análise molecular (PATERLINI-BRECHOT e BENALI 2007).

As amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas em tubos com EDTA e diluídas com ISET BufferTM (RareCell Diagnostics, Paris, França) 1:10. Após 10 minutos de incubação as amostras foram depositadas em um poço de ISET BlockTM (RareCell Diagnostics, Paris, França), com spots cilíndricos de 8 microns de diâmetro, aderidos a uma membrana de policarbonato. A amostra de sangue foi filtrada por aspiração sob vácuo e, em seguida, a membrana foi lavada com *Phosphate Buffered Saline* (PBS),

retirada do ISET BlockTM e, após secagem no escuro à temperatura ambiente, armazenada a - 20 ° C.

Para confirmar a existência de células nos *spots*, foi feita contra coloração com hematoxilina- eosina.

Para a realização da iminocitoquímica os *spots* das membranas foram cortados e colocados em placas de 24 poços. Cada *spot* foi hidratado com *Tris Buffered Saline* (TBS) por 10 minutos. As células foram então permeabilizadas com TBS 0.2% Triton X-100 por 5 min à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com TBS, as membranas foram incubadas por 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio, e lavadas novamente com TBS. Em seguida o anticorpo foi aplicado aos *spots* e incubado por uma hora. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido. A membrana foi lavada novamente com TBS, incubada por 30 minutos em *Dual long system* HRP (DakoTM) e revelada pelo cromógeno Diaminobenzidina 3,3' (DAB) (DakoTM) (5 min). Para finalizar, os *spots* foram corados com hematoxilina por 1 minuto e aderidos às lâminas com meio de montagem aquoso (Mounting Medium, Aqueous - DakoTM).

Para a realização da dupla marcação imunocitoquímica, o mesmo protocolo descrito acima foi realizado. No entanto, após a utilização do DAB, realizamos uma incubação de uma hora com o segundo anticorpo primário, seguida por outra incubação de 20 minutos com o *Rabbit/Mouse* (LINK) (Kit EnvisionTM G/2 System/AP). Após lavar com TBS, o *spot* foi incubado por 30 minutos com *AP Enzyme (Enhancer)*. O segundo anticorpo foi revelado por

Permanent Red. Para finalizar, o *spot* foi corado com hematoxilina. Os anticorpos utilizados nessa dupla marcação imunocitoquímica foram: anticorpo anti-CD44 (1:500, Sigma, código HPA 005785); anticorpo anti-C-Kit (1:50, Cell Marque, clone YR145, código 117R-16); anticorpo anti-ALDH1 (1:500, Sigma, código HPA 002123); anticorpo anti-CD45 (1:100, Dako, clone 2811+PD7/26, código M0701). Com os anticorpos anti-c-Kit, anti-CD44 e anti-ALDH1 buscamos uma marcação na mesma célula, sugerindo a presença de uma célula tronco tumoral. Com o anticorpo anti-CD45 esperávamos uma marcação em leucócitos, excluindo a possibilidade de reação inespecífica e confirmando que as células marcadas pelos demais anticorpos não são leucócitos.

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz branca. As CTCs foram caracterizadas de acordo com os seguintes critérios: células negativas para CD45, tamanho nuclear igual ou maior que 12µm, núcleo irregular e hipercromático, presença de citoplasma visível e alta proporção núcleo-citoplasma (> 50%) (KREBS et al. 2012).

Segundo KREBS et al. (2012) leucócitos podem expressar EpCam. Assim, optou-se pela não utilização desse anticorpo para identificação de CTCs, já que se pode obter leucócitos marcados.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise descritiva das variáveis clínico-patológicas. Para avaliar interferência das CTTs nas sobrevidas global e livre de progressão, foi realizado método de Kaplan-Meier e a diferença entre as curvas foi calculada pelo teste de log-rank. Para correlacionar as variáveis clínicas com os níveis de CTCs foi feito o teste exato de Fisher. Todas as análises foram feitas no SPSS para Windows, versão 15. Os valores de p foram considerados significativos quando $\leq 0,05$.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Obtivemos material para a pesquisa de CTCs (sangue periférico) de 17 pacientes. A mediana de idade foi de 53,6 anos (17,8 – 73 anos) e todas as pacientes tiveram como tratamento inicial a citorredução e quimioterapia adjuvante. Analisando recidiva de doença, observou-se presença em 70,6% das pacientes e ausência em 29,7% delas. Analisando a presença de metástase, 52,9% das pacientes apresentaram, enquanto 47,1% das pacientes não apresentaram.

Até o momento da última atualização de dados, 23,53% das pacientes não estavam sendo tratadas; 29,42% recebiam Platina e Taxol; 11,77% recebiam Platina + Taxol + Avastin, e Platina + Gemzar + Avastin; 5,89% recebiam Gemzar, e Gemzar + Avastin, e Avastin, e Anastrozol (Quadro 2).

Quadro 2 - Regime quimioterápico atual de cada paciente analisada.

Regime quimioterápico atual	Nº de pacientes	%
Sem tratamento	4	23,53%
Carbo+Taxol	5	29,42%
Carbo+Taxol+Avastin	2	11,77%
Carbo+Gemzar+Avastin	2	11,77%
Gemzar	1	5,89%
Gemzar+Avastin	1	5,89%
Avastin	1	5,89%
Anastrozol	1	5,89%
TOTAL	17	100%

Analisando a graduação histológica, 53% das pacientes tiveram tumor bem/moderadamente diferenciado; 5,9% das pacientes tiveram tumor pouco diferenciado e no prontuário médico de 41,2% das pacientes não constava essa informação.

Do total de pacientes incluídas no estudo de CTCs e analisadas, 82,4% apresentaram implante peritoneal e 17,6% não apresentaram. A localização da lesão encontrada durante a cirurgia citorrredutora variou em ovário, útero, peritônio, intestino, bexiga, pâncreas, pulmão e fígado (Quadro 3).

Quadro 3 - Localização da lesão em cada paciente incluída no estudo de CTCs.

Localização da lesão	Nº de pacientes	%
Ovário	2	11,77%
Ovário+Útero	4	23,53%
Ovário+Útero+Peritôneo	4	23,53%
Ovário+Útero+Peritôneo+Intestino	1	5,89%
Ovário+Útero+Peritôneo+Bexiga	1	5,89%
Ovário+Útero+Bexiga	1	5,89%
Ovário+Peritôneo	1	5,89%
Ovário+Peritôneo+Intestino	1	5,89%
Ovário+Intestino	1	5,89%
Ovário+Intestino+Pâncreas+Pulmão+Fígado	1	5,89%
TOTAL	17	100%

Em relação ao tamanho da lesão encontrada nos ovários, em 47,1% das pacientes a lesão foi maior que 5cm; em 35,3% a lesão foi menor que 5cm e em 17,6% das pacientes não se obteve essa informação. Das 25 pacientes analisadas, 23,5% apresentaram ascite, enquanto 76,5% não apresentaram. Em relação à invasão linfonodal, 76,5% das pacientes apresentaram, enquanto 11,8% das pacientes não apresentaram. Essa informação não foi obtida em 11,8% dos casos. Analisando o atual *status* das pacientes, sabe-se que 70,6% delas seguem em tratamento, 17,6% são acompanhadas sem tratamento e 11,8% foram a óbito (Quadro 4).

Quadro 4 - Análise das variáveis clínicas das 17 pacientes com tumor maligno de ovário seroso incluídas para estudo das CTCs.

Variáveis	Pacientes	
	Nº	%
Idade		
Mediana	53,6	
Mínimo-Máximo	17,8 – 73	
Tratamento Inicial		
Citorredução+Químio	17	100%
Recidiva		
Sim	12	70,6%
Não	5	29,7%
Metástase		
Sim	9	52,9%
Não	8	47,1%
Estádio (FIGO)		
I e II	3	17,7%
III e IV	14	82,3%
Implante Peritoneal		
Sim	14	82,4%
Não	3	17,6%
Tamanho da lesão		
<5cm	8	47,1%
>5cm	6	35,3%
Sem informação	3	17,6%
Ascite		
Sim	4	23,5%
Não	13	76,5%
Invasão linfonodal		
Sim	13	76,4%
Não	2	11,8%
Sem informação	2	11,8%
Status		
Em tratamento	12	70,6%
Sem tratamento	3	17,6%
Óbito	2	11,8%

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE CTTS EM TECIDO PARAFINADO

4.1.1 Dupla marcação imunoistoquímica

Obtivemos uma dupla marcação imunoistoquímica de boa qualidade, conforme analisado por médico patologista do nosso hospital.

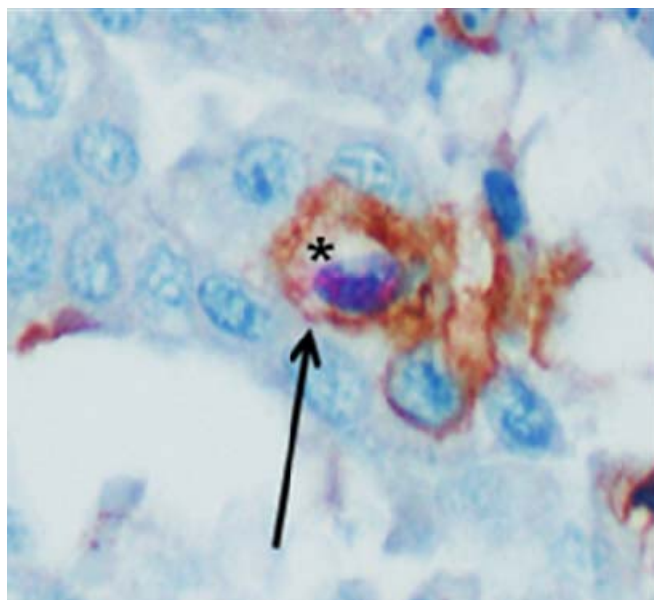


Figura 1 - Dupla marcação imunoistoquímica no tecido de tumor maligno de ovário seroso. A célula está duplamente marcada com anticorpo anti-CD44 revelado com o cromógeno DAB (marcação membranar marrom, destacada pela seta) e anticorpo anti-ALDH1 revelado com fosfatase (marcação citoplasmática rosa, destacada pelo asterísco)

Foram analisadas lâminas de 25 pacientes com tumor maligno de ovário seroso, dos quais 72% eram tumores bem/moderadamente diferenciados, 20% pouco diferenciados e 8% sem informação no prontuário médico. A mediana de idade foi de 55 anos (25,9-76,1). Considerando o estadiamento (FIGO), 20% das pacientes foram classificadas nos estádios I e II, enquanto 80% foram classificadas nos estádios III e IV. Quando analisada recidiva, 56% das pacientes apresentaram e 44% não apresentaram. Apenas duas pacientes foram tratadas inicialmente com quimioterapia, enquanto as outras 23 foram submetidas inicialmente à citorredução. Apenas uma paciente foi tratada com doxorubicina e ciclofosfamida. As demais 24 foram submetidas à quimioterapia baseada em platina.

O Quadro 5 abaixo descreve as variáveis clínicas e a presença de células duplamente marcadas com CD44 e ALDH1 nas 25 lâminas analisadas.

Quadro 5 - Variáveis clínicas e presença de células duplamente marcadas

Paciente	Idade ao diagnóstico	Data do diagnóstico	Graduação histológica	Estádio (FIGO)	Data da recidiva	Último follow-up	Número de células duplamente marcadas
1	52,6	29/07/2002	Bem/mod dif.	IV	Sem recidiva	16/08/2003 (óbito)	5
2	62,7	12/12/2002	Bem/mod dif.	III	01/05/2007	21/12/2011	19
3	48,1	01/12/2002	Bem/mod dif.	IV	27/06/2003	18/12/2003 (óbito)	24
4	61,5	09/04/2003	Bem/mod dif.	III	13/02/2004	01/02/2006 (óbito)	38
5	25,9	12/05/2003	Bem/mod dif.	III	Sem recidiva	03/10/2008	0
6	44,9	17/05/2003	Bem/mod dif.	I	03/06/2003	24/08/2008 (óbito)	3
7	76,11	17/09/2003	Bem/mod dif.	III	15/07/2006	25/04/2009	0
8	61,1	26/09/2003	Bem/mod dif.	III	Sem recidiva	01/12/204 (óbito)	1
9	45,6	07/10/2003	Bem/mod dif.	III	01/07/2005	02/03/2010	0
10	46,1	08/03/2004	Bem/mod dif.	IV	01/08/2006	21/05/2009	4
11	62,11	26/04/2004	Bem/mod dif.	III	31/03/2007	18/03/2009	23
12	68,9	08/07/2004	Bem/mod dif.	III	Sem recidiva	25/02/2006 (óbito)	7
13	33,8	01/09/2004	N/C*	III	Sem recidiva	05/07/2005	0
14	40,1	07/10/2004	Bem/mod dif.	III	01/07/2006	16/06/2009	66
15	39,1	01/11/2004	Bem/mod dif.	III	20/05/2011	07/10/2011	6
16	60,6	26/01/2005	Bem/mod dif.	II	Sem recidiva	05/07/2007	0
17	70	07/03/2008	N/C*	III	Sem recidiva	18/11/2009	0
18	68,1	27/02/2003	Bem/mod dif.	III	10/10/2002	06/02/2005 (óbito)	3
19	50,2	07/03/2003	Pouco dif.	III	24/06/2003	09/10/2003 (óbito)	6
20	61,1	01/06/2003	Bem/mod dif.	I	01/03/2005	05/02/2012 (óbito)	3
21	67,11	06/05/2004	Pouco dif.	III	Sem recidiva	05/10/2010	0
22	66,6	18/05/2004	Bem/mod dif.	III	01/02/2006	24/02/2008 (óbito)	0
23	54,9	07/08/2004	Bem/mod dif.	I	Sem recidiva	09/08/2006	0
24	46,03	30/08/2004	Bem/mod dif.	I	Sem recidiva	30/01/2007	0
25	55	05/11/2007	Pouco dif.	III	Sem recidiva	14/06/2011	7

*Não consta informação

Foi analisada a presença de células duplamente marcadas (CD44/ALDH1), obtendo uma mediana de 3 células. Pode-se observar que pacientes com número de células duplamente marcadas acima da mediana apresentou menor sobrevida quando comparadas às pacientes com número de células abaixo da mediana ($p= 0,137$) (Figura 2).

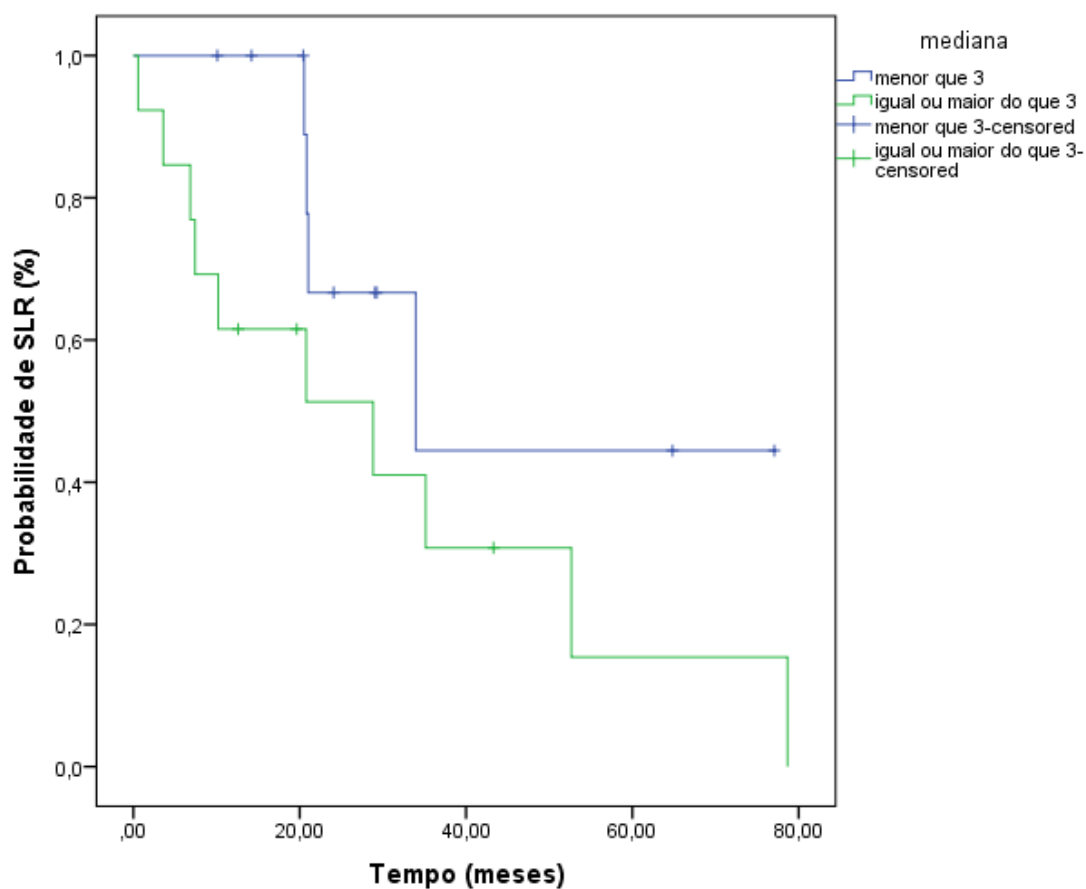


Figura 2 - Análise de sobrevida em relação ao número de células tumorais presentes no material parafinado que apresentavam dupla-marcação para CD44/ALDH1.

4.2 ANÁLISE DE CTCs

A contagem de CTCs foi realizada em três tempos, com intervalos de 60 dias entre cada um deles. Aproximadamente nas mesmas datas foi realizada dosagem sérica do marcador CA125, cuja mediana foi 185,65 na primeira coleta, 207,40 na segunda coleta e 79 na terceira coleta. Já em relação à contagem de CTCs, as medianas foram, respectivamente, em cada coleta: 3,2 CTCs/mL; 1,1 CTC/mL e 0 (Quadro 6). Das 17 pacientes analisadas, 9 tiveram os 3 tempos de coleta (Figura 3 e Quadro 7). Os motivos pelos quais as demais pacientes não tiveram os 3 tempos de coleta foram: desistência do estudo, óbito ou fim do prazo do estudo, representados pelo sinal – no Quadro 7.

Quadro 6 - Mediana de CTCs e CA125 em cada tempo de coleta

	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Mediana de CTCs	3,2	1,1	0
Mediana CA125 (U/ml)	185,65	207,40	79

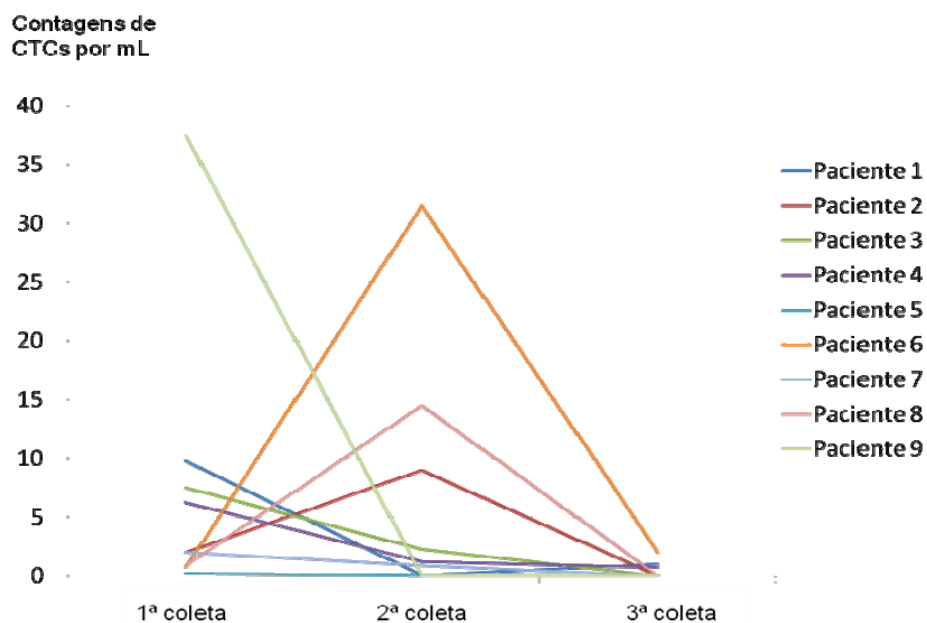


Figura 3 - Contagem de CTCs por ml de sangue de cada paciente.

Quadro 7 - Número de Células Tumorais Circulantes encontradas em 1ml de sangue de cada paciente.

Paciente	1ª coleta (antes da QT)	2ª coleta (60 dias depois)	3ª coleta (60 dias depois)
1	23,5	-	-
2	9,75	0,1	1
3	2	9	0
4	7,5	2,25	0
5	6,25	1,25	0,75
6	8	-	-
7	0,25	0	0
8	0,75	31,5	2
9	2,1	1,1	-
10	2	0,9	0
11	2,8	1,1	-
12	0,9	14,5	0
13	37,5	0	0
14	10,75	-	-
15	37,5	1,1	-
16	3,2	-	-
17	1,25	-	-

* Os motivos pelos quais as demais pacientes não tiveram os 3 tempos de coleta foram: desistência do estudo, óbito ou fim do prazo do estudo, representados pelo sinal – no quadro 7.

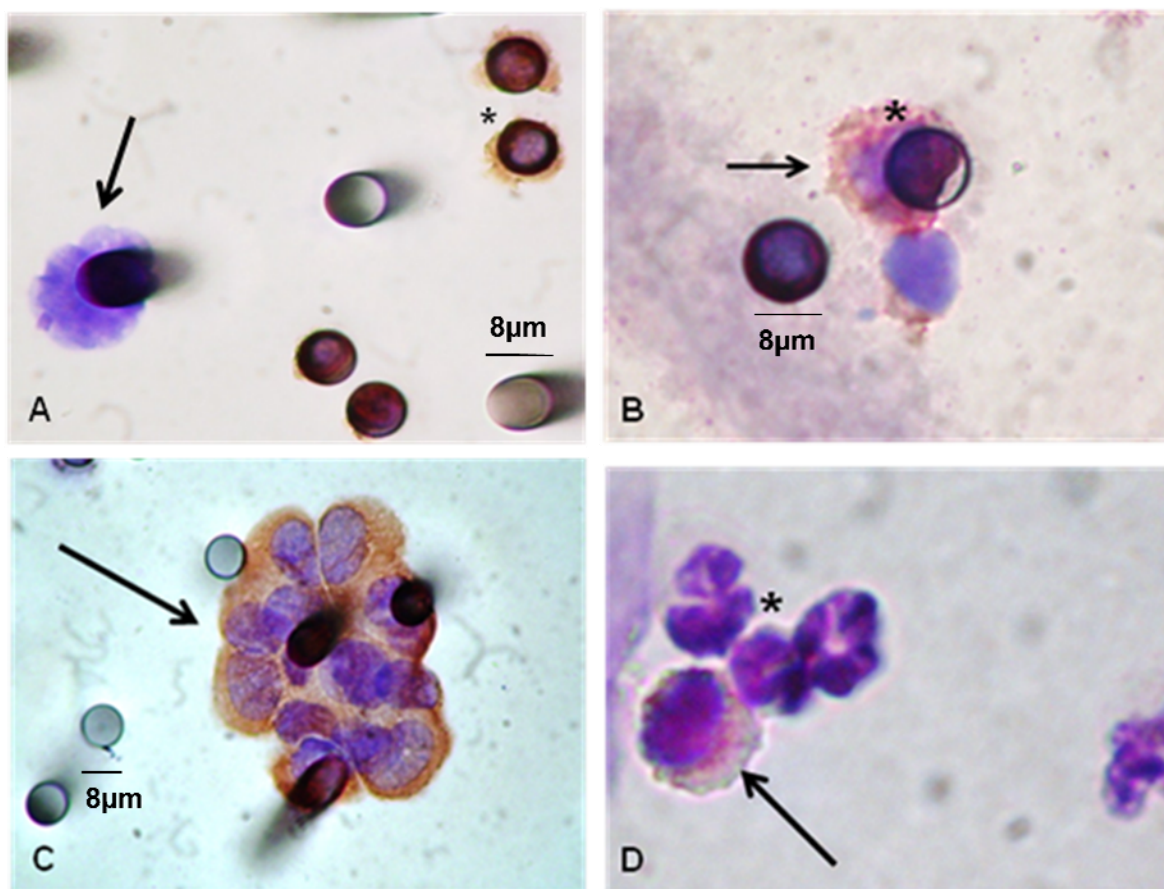


Figura 4 - Imunocitoquímica em CTCs isoladas de pacientes com câncer de ovário seroso. **A.** Dupla marcação imunocitoquímica em membrana do ISET da paciente MAAR. O asterisco mostra leucócito positivo para CD45, enquanto a seta preta mostra CTC com marcação negativa para CK e CD45 (10x). **B.** Dupla marcação imunocitoquímica em membrana do ISET da paciente MAAR. Célula positiva para c-Kit (asterisco) e CD44 (seta) (10x). **C.** Imunocitoquímica em membrana do ISET da paciente SC. A seta preta mostra um microêmbolo de CTCs com marcação positiva para o anticorpo anti-dCk (4x). **D.** Detecção de CTCs, em sangue periférico da paciente MAAR, por marcação imunomagnética com kit da empresa Miltenyi Biotec Inc., Bergisch Gladbach, Alemanha. A seta preta indica CTC positiva para CK, enquanto o asterisco indica leucócitos negativos para CK (10x).

Ao correlacionar idade com CTC, os dados mostram que em pacientes mais jovens a contagem de CTCs foi maior do que a mediana ($p < 0,001$).

Alguns estudos tentam demonstrar a relação entre a disseminação hematogênica e tamanho do tumor primário. Em nossa amostra os pacientes com níveis de CTCs superiores à média na primeira coleta tiveram lesão tumoral primária menor do que 5 cm ($p = 0,085$), embora sem significância estatística.

Em alguns estudos, observa-se que pacientes com estágio clínico avançado têm elevados níveis séricos de CA125. Nossos pacientes tiveram CA125 (média = 185,65) mensurado na mesma data da primeira coleta de CTC e mostraram uma correlação negativa entre os dois níveis. Pacientes com contagem de CTCs superior à média, na primeira coleta, tiveram baixos níveis séricos de CA125 ($p = 0,032$).

Analisando marcadores de CTTs em CTCs isoladas na primeira coleta, observa-se que as CTCs apresentaram expressão fraca e moderada de c-Kit, fraca de ALDH1 e moderada e forte de CD44/ALDH1, conhecidos na literatura como marcadores de CTTs. Nenhuma expressão de CK7 foi observada em qualquer CTC isolada.

No Quadro 8 é possível comparar o número de CTCs/ml CTC na primeira coleta, com variáveis clínicas e os marcadores descritos. Alguns pacientes não tiveram os dados disponibilizados. A expressão dos marcadores foi analisada como: 0 = nenhuma expressão; 1 = expressão fraca; 2 = expressão moderada e 3 = expressão forte (ver também Figura 1).

Quadro 8 - Correlação entre níveis de CTC na primeira coleta e idade das pacientes, tamanho da lesão, níveis séricos de CA125, expressão de CK7, c-KIT, ALDH1 e CD44/ALDH1.

Paciente	CTC/ml	Idade	Tamanho da lesão	CA125	CK7	C-kit	ALDH1	CD44/ALDH1
1	9,75	49	<5cm	640	0	0	3	3
2	2	71	>5cm	-	0	0	0	0
3	7,5	18	<5cm	26,8	0	0	1	2
4	6,25	57	>5cm	17,4	0	0	0	0
5	8	73	>5cm	-	0	0	0	2
6	0,25	61	>5cm	-	0	0	0	0
7	0,75	58	<5cm	-	0	0	1	1
8	2,1	55	>5cm	474,6	0	0	0	0
9	2	45	>5cm	63,3	0	1	1	1
10	2,8	61	<5cm	18	0	0	0	0
11	0,9	59	-	716	0	0	0	0
12	37,5	53	<5cm	-	0	0	0	0
13	10,75	41	-	-	0	0	0	0
14	3,2	56	>5cm	308	0	0	0	0
15	1,25	47	-	-	0	2	1	1

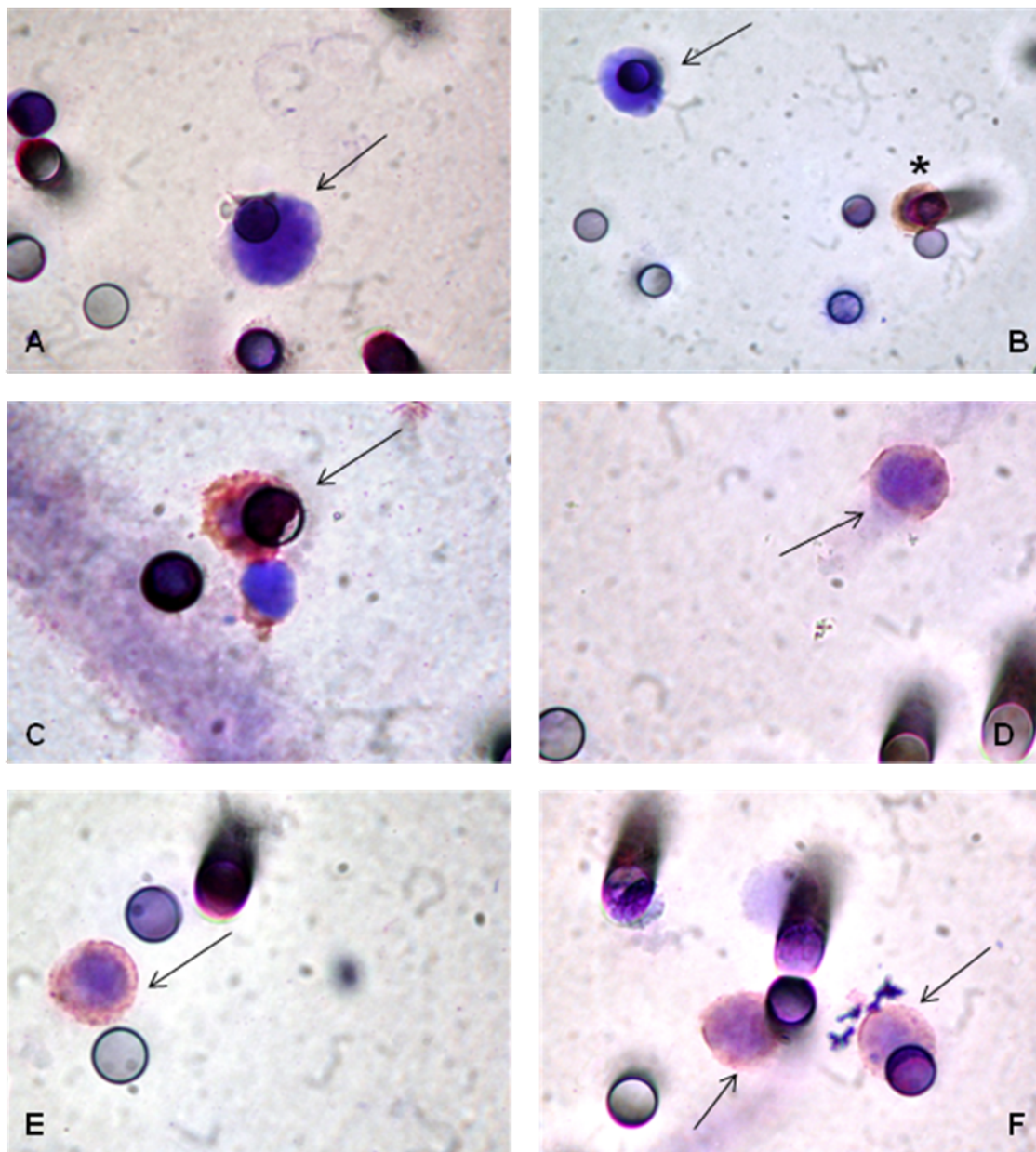


Figura 5 - Imunocitoquímica em CTCs isoladas da paciente MAAR, com câncer de ovário seroso. **A.** A seta mostra uma CTC negativa para expressão de CK7 (4x). **B.** A diferença entre CTCs (seta) e linfócitos (asterisco), que expressam CD45 (2x). **C.** A seta mostra uma CTC expressando dois marcadores de CTT: CD44 (marcação marrom) e ALDH1 (marcação vermelha) (10x). **D, E, F.** As setas mostram CTCs positivas para expressão de CD44, c-KIT e ALDH1, respectivamente (10x).

Não houve correlação estatisticamente significativa entre os níveis de CTCs na primeira coleta e as variáveis clínicas: graduação histológica ($p = 0,189$), estadio clínico ($p = 0,170$), ascite ($p = 0,502$); implante peritoneal ($p = 0,273$); recidiva ($p = 0,479$); metástase ($p = 0,474$) e invasão linfonodal ($p = 0,364$).

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que células tumorais circulantes (CTC) constituem uma população de células cancerosas que se destacaram do tumor primário e ganharam a circulação sanguínea, criando um tumor secundário.

Acredita-se que CTCs possam gerar metástases em órgãos distantes, num processo unidirecional. No entanto, acredita-se que CTCs também podem gerar e re-colonizar seus próprios tumores primários. Essas células circulantes sofrem ao infiltrar-se e crescer em outros órgãos, justificando o fato de apenas as células mais adaptáveis sobreviverem (COMEN et al. 2011).

As CTTs tem sido encontradas em número crescente de tumores hematopoiéticos e sólidos e normalmente são identificadas pela expressão de marcadores celulares, como CD24, CD44, CD133, c-Kit, ALDH1, entre outros.

É necessário a expressão de dois marcadores simultaneamente para que uma célula seja considerada uma CTT. Tem sido dito que para cada tumor há uma dupla específica de marcadores. Por exemplo, ZHANG et al. (2008) identificou e analisou oncoesferas originárias de ascite de cinco pacientes com câncer de ovário. Os autores viram que essas esferas expressavam CD44 e CD117, simultaneamente. Essas células foram resistentes à quimioterapia e capazes de iniciar e propagar tumores em camundongos. KASIMIR-BAUER et al. (2012) estudou a expressão de três

marcadores de transição epitélio-mesênquima e o marcador de células tronco tumorais ALDH1, em 502 pacientes com câncer de mama primário. O autor observou a presença de ALDH1 em 14% das amostras. Outros importantes marcadores de CTT foram originalmente descritos em CTTs de mama: CD44+/CD24-. AL-HAJJ et al. (2003) observaram células com esse fenótipo e tumorigenicidade. Esse fenótipo tem sido associado à metástase linfonodal em câncer de mama, metástase pulmonar, quimiorresistência e pior prognóstico. Recentemente esse fenótipo também foi considerado em CTTs de ovário, com propriedades de auto-renovação e quimiorresistência (SHI et al. 2010; ALVERO et al. 2009). No nosso estudo, os marcadores que melhor refletiram propriedades de CTTs em relação à progressão livre de sobrevida e expressão proteica em tumores primários serosos (n=25), testados previamente (dados ainda não publicados), foram CD44/ALH1. Essa é a razão por estarmos buscando por esses marcadores de CTT.

Modelo de progressão paralela foi apresentado por volta dos anos 50 por estudiosos que concluíram que metástases podem ser iniciadas antes do surgimento dos primeiros sintomas ou até antes do diagnóstico do tumor primário. Analisando suas taxas de crescimento, as metástases eram muito grandes para serem explicadas pela iniciação em fase avançada do desenvolvimento do tumor primário (COLLINS et al. 1956).

A progressão paralela não contradiz os mecanismos de crescimento tumoral como seleção clonal ou aquisição de mutações genéticas. No entanto, esse modelo não coloca a célula responsável pela metástase próxima ao final de desenvolvimento do tumor primário. Além disso, a

disseminação de células tumorais pode levar à seleção e expansão de diferentes células adaptadas à microambientes específicos. Dessa forma, devido a mecanismos de seleção e a instabilidade genética das células tumorais, a progressão paralela prediz boa diferença entre iniciadores de metástase e células do tumor primário. Assim, o modelo de progressão paralela faz três previsões testáveis. A primeira é o acúmulo paralelo e independente de alterações genéticas e epigenéticas no tumor de origem comparado à metástase. A segunda é a disseminação, em paralelo, das células tumorais em locais distantes. A terceira são as alterações paralelas de células metastáticas que se disseminaram do sítio primário, em momentos diferentes. Na progressão paralela, na maioria dos casos, células fundadoras de metástases são disseminadas antes da doença detectável clinicamente (KLEIN 2009).

De acordo com o modelo de progressão paralela, nossos dados mostraram que pacientes com mais CTCs apresentaram menor tamanho de lesão tumoral. Independente do tamanho do tumor primário, células podem ser liberadas e, pelo processo de transição epitélio-mesênquima, circular em vasos sanguíneos.

Tumores maiores possuem células mais proliferativas e, então, eles são mais afetados pelo tratamento. Dessa forma, esse tipo de câncer é mais agressivo localmente e composto por células diferenciadas. Além disso, células em constante proliferação são submetidas a mais “pontos de checagem” do ciclo celular, o que torna mais difícil a sua sobrevivência (PAVEY et al. 2013). Dessa forma, nossos dados mostraram que pacientes

com menos CTCs detectadas e grande tamanho de lesão tumoral possuem maior agressividade local e menor capacidade de disseminação.

CA125 é o marcador mais utilizado para o rastreamento do câncer de ovário. Em condições fisiológicas normais as células epiteliais do ovário não expressam CA125. O nível sérico desse biomarcador é considerado normal quando é menor que 35 U/mL. Níveis altos de CA125 são encontrados em 90% dos pacientes com doença em estágio avançado, e em 50% dos pacientes em estágio I (LONGUESPÉE et al. 2012). Tumores de ovário maiores possuem mais células epiteliais e então expressam mais CA125, como demonstrado pelos nossos dados. Em nosso estudo, pacientes com mais CTCs detectadas possuem lesão tumoral menor e, conseqüentemente, menor expressão de CA125.

Por outro lado, sabe-se que o CA125 é um biomarcador de implante peritoneal (WON et al. 2013). CTCs são marcadores de disseminação hematogênica. Dessa forma, CTCs e CA125 são biomarcadores diferentes que mostram diferentes rotas de disseminação do câncer de ovário.

No nosso estudo, pacientes apresentaram expressão fraca e moderada de c-KIT e ALDH1. Assim, nossa hipótese é que algumas CTCs possuem baixa taxa de proliferação.

A título de comparação, o pericito é um componente do tecido vascular e sua deleção leva à hipóxia. Sabe-se que esse fato causa diminuição no crescimento tumoral, ativação da transição epitélio-mesênquima e conseqüente migração celular (COOKE et al. 2012). De acordo com essa afirmação, as células que estão migrando (CTCs) possuem

baixa atividade proliferativa, o que justifica a expressão fraca e moderada de c-KIT e ALDH1 nas pacientes com câncer de ovário. Ao contrário, essas mesmas células são mais agressivas e desdiferenciadas, justificando a perda da expressão de CK7, fato que indica também um processo de transição epitélio-mesênquima.

A forte expressão de CD44/ALDH1 nas CTCs das pacientes do nosso estudo confirmam a hipótese de que a população de CTCs expressa marcadores de CTTs. Assim, é possível pensar que as CTTs estão incluídas em uma vasta maioria de CTCs. As propriedades das células tronco tumorais podem justificar a capacidade apresentada pelas CTCs de migração e iniciação de metástase.

Pacientes jovens possuíam mais CTCs. Em geral, tumores em pacientes jovens são mais agressivos, já que a proliferação celular em organismos jovens é muito eficaz, e isso inclui as células tumorais. Pensando que um paciente jovem possui um sistema imunológico eficiente, para passar pelos “pontos de checagem” do ciclo celular é necessário que a mutação celular seja discreta, mas grave (ALBERTS et al. 2002). Pensando que o idoso possui um sistema imunológico mais deficiente, mutações simples passam pelos “pontos de checagem” do ciclo celular mais facilmente, criando tumores menos agressivos.

Por outro ponto de vista, pode-se pensar no câncer hereditário. Pacientes jovens podem desenvolver tumores por mutações genéticas e esses tumores são geralmente mais agressivos.

6 CONCLUSÃO

- Os resultados do estudo prévio do nosso grupo de pesquisa foram confirmados por meio da observação de dupla marcação imunohistoquímica (CD44/ALDH1) nas células tumorais de tecido parafinado de pacientes com câncer de ovário maligno. Ainda no tecido parafinado, definimos os dois marcadores de CTTs que são melhores expressos nos tecidos das pacientes com tumor maligno de ovário seroso: CD44/ALDH1.
- Isolamos, identificamos e quantificamos as CTCs no sangue periférico das pacientes com tumor maligno de ovário seroso em 3 coletas distintas. Nosso estudo mostra uma relação estatisticamente significativa entre o número de CTCs encontradas e idade do paciente, níveis séricos de CA125 e expressão de marcadores de células-tronco.
- É importante destacar que, atualmente, o estudo de CTC tem um papel importante na medicina personalizada e pode ser fundamental na decisão de tratamento individualizado.
- Os dados apresentados em nosso estudo nos fazer acreditar na hipótese de que o câncer de pacientes jovens é mais agressivo, com maior capacidade de invasão, o que justifica o elevado número de CTCs.

- Acreditando que tumores maiores são compostos de mais células epiteliais do ovário, é possível justificar a alta expressão de CA125.
- A forte expressão de CD44/ALDH1 em CTCs confirma a hipótese de que essa população expressa marcadores de CTT. Assim, é possível pensar que as CTTs estão incluídas na grande maioria das CTCs. As propriedades das CTTs podem justificar a capacidade das CTCs de migrarem e se disseminarem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimming R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2009; 11:R46.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science Pu; 2002. The cell cycle and programmed cell death; p.983-1026.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:3983-8.

Alvero AB, Chen R, Fu HH, et al. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. **Cell Cycle** 2009; 8:158-66.

Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. **N Engl J Med** 2006; 354:34-43.

Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, Winger Q, Donaldson S, Williams T. Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. **Development** 2002; 129:2733-47. Erratum in: **Development** 2002; 129:3280.

Baba T, Convery PA, Matsumura N, et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. **Oncogene** 2009; 28:209-18.

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med** 1997 3:730-7.

Borowitz M, Westra W, Cooley LD. Pathology and laboratory medicine. In: Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, editors. **Clinical oncology**. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 2004. p.299-319.

Cadron I, Leunen K, Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I. Management of borderline ovarian neoplasms. **J Clin Oncol** 2007; 25: 2928-37.

Cannistra SA, Gerhenson DM, Recht A. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. **Cancer principles & practice of oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p.1568-92.

Chien JR, Aletti G, Bell DA, Keeney GL, Shridhar V, Hartmann LC. Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer. **J Cell Biochem** 2007; 102:1117-29.

Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. **Cancer Cell** 2012; 21:66-81.

Collins VP, Loeffler RK, Tivey H. Observations on growth rates of human tumors. **Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med** 1956; 76:988-1000.

Comen E, Norton L, Massagué J. Clinical implications of cancer self-seeding. **Nat Rev Clin Oncol** 2011; 8:369-77.

Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. **FEBS Lett** 2010; 584:1659-64.

Crum CP. The female genital tract. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ, editors. **Robbins pathologic basis of disease**. 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004. p.959-71.

Eagle K, Ledermann JA. Tumor markers in ovarian malignancies. **Oncologist** 1997; 2:324-9.

Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. **Genome Biol** 2005; 6:246.

Erdogan G, Bassorgun CI, Pestereli HE, Simsek T, Karaveli S. C-kit protein expression in uterine and ovarian mesenchymal tumours. **APMIS** 2007; 115:204-9.

Fehm T, Muller V, Alix-Panabieres C, Pantel K. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. **Breast Cancer Res** 2008; 10 Suppl 1:S1.

Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, et al. Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2008; 18:506-14.

Galligioni E, Arcuri C, Sorio R, Griso C. Gemcitabine and anthracyclines in platinumresistent ovarian cancer. **Ann Oncol** 2006; 17:195-98.

Gao JX. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. **J Cell Mol Med** 2008; 12:67-96.

Hamburger A, Salmon SE. Primary bioassay of human myeloma stem cells. **J Clin Invest** 1977; 60:846-54.

Hill RP, Perris R. "Destemming" cancer stem cells. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:1435-40.

Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. **Gene** 2000; 260:1-12.

Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, et al. Transcription factor AP-2gamma is a developmentally regulated marker of testicular carcinoma in situ and germ cell tumors. **Clin Cancer Res** 2004; 10:8521-30.

Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiechec E, et al. Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)** 2008; 56:165-80.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:8-29.

Kallakury BV, Sheehan CE, Ross JS. Co-downregulation of cell adhesion proteins alpha- and beta-catenins, p120CTN, E-cadherin, and CD44 in prostatic adenocarcinomas. **Hum Pathol** 2001; 32:849-55.

Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimmig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R15.

Klein CA. Parallel progression of primary tumours and metastases. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:302-12.

Kohayagawa MJ. **Análise da expressão protéica de marcadores de células-tronco tumorais em neoplasias ovarianas epiteliais**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. **J Thorac Oncol** 2012; 7:306-15.

Kusumbe AP, Mali AM, Bapat SA. CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. **Stem Cells** 2009; 27:498-508.

Ksiazkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. **Pathobiology** 2012; 79:195-208.

Longuespée R, Boyon C, Desmons A, et al. Ovarian cancer molecular pathology. **Cancer Metastasis Rev** 2012; 31:713-32.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature** 1994; 367:645-8.

Luo L, Zeng J, Liang B, et al. Ovarian cancer cells with the CD117 phenotype are highly tumorigenic and are related to chemotherapy outcome. **Exp Mol Pathol** 2011; 91:596-602.

Lurje G, Schiesser M, Claudius A, Schneider MP. Circulating tumor cells in gastrointestinal malignancies current techniques and clinical implications. **J Oncol** 2010; 2010:392652.

Maenhaut C, Dumont JE, Roger PP, van Staveren WC. Cancer stem cells: a reality, a myth, a fuzzy concept or a misnomer? an analysis. **Carcinogenesis** 2010; 31:149-58.

Markman M, Bookman MA. Second-line treatment of ovarian cancer. **Oncologist** 2000; 5:26-35.

McDonald SA, Graham TA, Schier S, Wright NA, Alison MR. Stem cells and solid cancers. **Virchows Arch** 2009; 455:1-13.

Mego M, Mani SA, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications. **Nat Rev Clin Oncol** 2010; 7:693-701.

Menon U, Skates SJ, Lewis S, et al. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:7919-26.

Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2005; 13:205-20.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Brasil. **Estimativa/2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro; INCA; 2011.

Möbus V, Wandt H, Frickhofen N, et al. Phase III trial of high-dose sequential chemotherapy with peripheral blood stem cell support compared with standard dose chemotherapy for first-line treatment of advanced ovarian Cancer: Intergroup Trial of the AGO-Ovar/ AIO and EBMT. **J Clin Oncol** 2007; 27:4187-93.

Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. **Histochem Cell Biol** 2008; 129:705-33.

Muller V, Hayes DF, Pantel K. Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2006; 8:110-3.

Nagaiah G, Abraham J. Circulating tumor cells in the management of breast cancer. **Clin Breast Cancer** 2010; 10:209-16.

Ozols EF. Challenges for chemotherapy in ovarian cancer. **Ann Oncol** 2006; 5:181-7.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:74-108.

Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection; clinical impact and future directions. **Cancer Lett** 2007; 253:180-204.

Pavey S, Spierri L, Haass NK, Gabrielli B. DNA repair and cell cycle checkpoint defects as drivers and therapeutic targets in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 2013; 26:805-16.

Pignata S, Pisano C, Di Maio M, et al. Symposium article: medical treatment of resistant or recurrent epithelial ovarian cancer. **Ann Oncol** 2006; 7:49-50.

Ponnusamy MP, Batra SK. Ovarian cancer: emerging concept on cancer stem cells. **J Ovarian Res** 2008; 1:4.

Poveda A, Kaye SB, McCormack R, et al. Circulating tumor cells predict progression free survival and overall survival in patients with relapsed/recurrent advanced ovarian cancer. **Gynecol Oncol** 2011; 122:567-72.

Sengupta A, Cancelas JA. Cancer stem cells: a stride towards cancer cure? **J Cell Physiol** 2010; 225:7-14.

Shi MF, Jiao J, Lu WG, et al. Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line. **Cell Mol Life Sci** 2010; 67:3915-25.

Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011. **CA Cancer J Clin** 2011; 61: 212-36.

Tilly JL, Rueda BR. Minireview: stem cell contribution to ovarian development, function, and disease. **Endocrinology** 2008; 149:4307-11.

Toludi M, Apostolou P, Chatziioannou M, Papasotirioi I. Correlation between cancer stem cells and circulating tumor cells and their value. **Case Rep Oncol** 2011; 4:44-54.

Turner BC, Zhang J, Gumbs AA, et al. Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signaling pathways. **Cancer Res** 1998; 58:5466-72.

van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and mib-1 superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. **J Clin Oncol** 2003; 21:1912-21.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. **Nature Rev Cancer** 2008; 8:755-68.

Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? **Cell Commun Signal** 2010; 8:6.

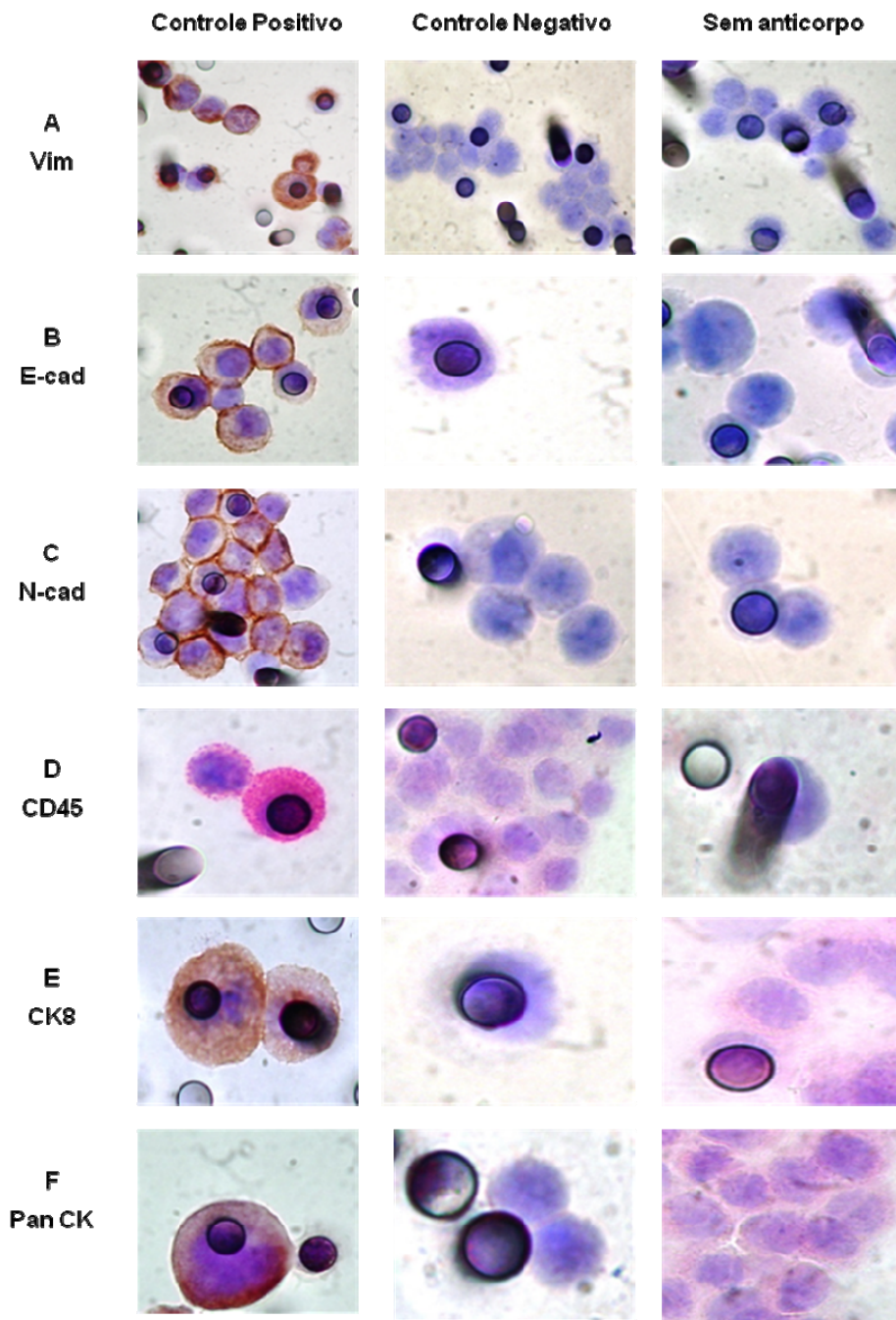
Wiese C, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression- a property of multi-lineage progenitor cells? **Cell Mol Life Sci** 2004; 61:2510-22.

Won E, Hurria A, Feng T, et al. CA125 level association with chemotherapy toxicity and functional status in older women with ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2013; 23:1022-8.

Zhan Q, Wang C, Ngai S. Ovarian cancer stem cells: a new target for cancer therapy. **Biomed Res Int** 2013; 2013:916819.

Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. **Cancer Res** 2008; 68:4311-20.

Anexo 1 - Imagens do Controle Positivo dos anticorpos



A, B e C. Sangue de indivíduo saudável com células de cultura A549 (*"spiked cells"*) (controle positivo) e sangue do mesmo indivíduo com células de cultura HCT 116 (*"spiked cells"*) (controle negativo) marcadas com vimentina, E-caderiane N-caderina, respectivamente. **D.** Leucócitos de indivíduo saudável (controle positivo) e células de linhagem tumoral (HCT 116) colocadas em sangue saudável (controle negativo) marcadas com CD45. **E e F.** Sangue de indivíduo saudável com células de linhagem (A549) (controle positivo) e leucócitos (controle negativo) marcadas com CK 8 e pan-CK, respectivamente. Para todas as reações um *spot* sem anticorpo foi mostrado.

Anexo 2 - Termo de consentimento livre esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do estudo:

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS
EM TUMORES MALIGNOS DE OVÁRIO E SUA CORRELAÇÃO COM
CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES**

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Nome do (a) Voluntário (a)

RGH: _____

Por favor, leia cuidadosamente este formulário, pois ele informa o que você necessita saber sobre os objetivos deste estudo. Se concordar em tomar parte neste estudo, deverá assinar e datar este formulário. A sua assinatura significa que recebeu as informações necessárias e que deseja participar deste estudo.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Usar um equipamento laboratorial novo no mercado para detectar células tumorais circulantes (são células que se desprendem do tumor) no sangue periférico e correlacionar seus níveis com:

- marcadores tumorais sanguíneos, observados pelo exame de sangue que você faz a pedido do seu médico;
- resposta ao tratamento (verificaremos se há diminuição dos níveis dessas células durante e após o seu tratamento);

- genes de resistência a drogas;
- tempo de vida após o tratamento.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao concordar em participar deste estudo, você será submetido a três coletas de sangue (aproximadamente 20 mL), em três momentos: antes do início do tratamento sistêmico, 3 ou quatro semanas após o início do tratamento e a cada 9 ou 12 semanas, dependendo do tratamento, por dois anos ou, se a doença progredir, até a progressão.

A identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo, caso você participe ou não deste estudo. Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo.

Os riscos a que você estará sujeito são os riscos inerentes a qualquer punção venosa como: dor local no ato da punção, sangramento no local, hematoma e raramente flebite (infecção na veia puncionada), mas isto será evitado pela limpeza adequada do local de punção e realização do procedimento por profissional capacitado. Apesar de raro, pode ser que ocorra equimose (quando o sangue sai para a pele, resultando em uma mancha azul ou púrpura, redonda não elevada ou irregular) após a coleta de sangue. Caso isso aconteça com você, não há nada a ser feito, a não ser esperar que desapareça (desaparece em até 7 dias).

Os exames realizados em seu sangue não implicarão em nenhuma mudança em seu tratamento ou qualquer conduta médica que esteja sendo realizada ou venha a ser realizada no seu seguimento, uma vez que a pesquisa de CTCs no Brasil ainda é experimental, não havendo nenhum prejuízo para o sucesso das condutas médicas outras aos quais você esteja se submetendo.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios de qualquer espécie para os voluntários, apenas a importância de contribuir para uma pesquisa científica cujos dados obtidos poderão trazer benefícios para pessoas com câncer. A recusa em participar,

não acarretará prejuízo na qualidade do tratamento. O pesquisador responsável se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber algum risco ou dano à sua saúde, que não previsto neste termo de consentimento.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

Apesar de métodos alternativos serem aprovados e usados na prática clínica em outros países, no Brasil, esses métodos ainda não estão disponíveis.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo, porém, por se tratar de nova tecnologia, os resultados não poderão indicar cura ou piora do seu quadro, pois ainda não temos valores de referência para estabelecer uma comparação. Contatos dos pesquisadores: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000, ramal 2776); Dr. Marcello F. Fanelli (2189- 5000, ramal 2765).

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para os voluntários por sua participação neste estudo.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos neste estudo. Os dados obtidos pela análise do seu sangue são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para publicação.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais tem direito.

SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Você terá acesso aos seus dados de exames, atendimentos médicos e administração de terapia, quando solicitados.

ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar participar deste estudo. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes. Não existe nenhum tipo de indenização para complicações causadas pelo tratamento.

ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

A sua participação no estudo é voluntária. Você tem o direito de sair do estudo a qualquer momento e por qualquer motivo. Caso venha a abandonar o estudo ou decidir não participar do mesmo, o seu tratamento não será prejudicado. No entanto, se você decidir sair da pesquisa, deverá informar ao seu médico.

INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS

Esclarecimentos para questões sobre os direitos dos participantes na pesquisa e/ou danos relacionados à pesquisa, contatar os pesquisadores Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189 5000 ramal 2776) ou Dr. Marcello F. Fanelli (2189 5000 ramal 2779). Se o pesquisador principal não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente- Hospital do Câncer- A.C. Camargo/ SP, cujo horário de funcionamento é de segunda a quinta-feira, das 07:00 às 18:00h e de sexta-feira das 07:00 às 16:00h (Telefone 2189-5020; endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211- Liberdade- São Paulo, SP).

Você receberá cópia deste documento e o original será arquivado no prontuário do médico. Somente assine este documento se consentir integralmente com seus termos.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós lhe estimulamos a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Se tiver perguntas relacionadas aos seus direitos como participante do estudo

clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital A.C.Camargo.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo. Entendo que não serei submetido a nenhum exame adicional e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____/_____/_____
Assinatura do (a) voluntário (a) dia mês ano

Nome do (a) voluntário (a) - letra de forma

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

Anexo 3 - Ficha de coleta de dados

Ficha de Coleta de Dados

Nome do estudo: **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS EM TUMORES MALIGNOS DE OVÁRIO E SUA CORRELAÇÃO COM CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES**

Nome da pte: _____
RGH: _____ sexo _____ DN.: _____
T _____ N _____ M _____ estágio: _____
Em caso de meta, qual o local? _____
Diag.: _____
Data Diag.: _____
Tipo Histológico: _____
Descrição Anatomopatológico: _____
Data Anatomopatológico: _____
Tratamento previsto:
Cirurgia:
Sim _____ não _____ data: _____
QT:
sim _____ não _____ início previsto: _____
Ciclos programados: _____
Progressão da doença
Sim _____ não _____ data: _____
Níveis de CTCs antes da cirurgia.: _____
Níveis de CTCs no momento da recidiva: _____
Marcadores expressos nas CTTs:
Marcadores expressos nas CTCs:

Anexo 4 - Folha de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

São Paulo, 13 de Abril de 2012.

À

Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Aluna: Bruna Maria Malagoli Rocha (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1653/12

"Identificação e caracterização de células-tronco tumorais em tumores epiteliais de ovário".

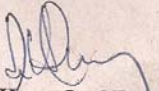
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/04/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 28/02/2012, aprovaram a realização do estudo em referência (versão II de fevereiro/2012), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre o Plano de recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela Obtenção do TCLE;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de infraestrutura e instalações do Departamento de Oncologia Clínica;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Ginecologia.

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP para este centro único.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1