

**ESTUDO DE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES
(CTCS) EM CÂNCER DE MAMA E MELANOMA**

FERNANDA MACHADO DE CARVALHO

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rafael Malagoli Rocha

Co-Orientadora: Dra. Ludmilla T. D. Chinen

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Carvalho, Fernanda Machado de
Estudos de células tumorais circulantes (CTCs) em câncer de mama e melanoma / Fernanda Machado de Carvalho – São Paulo, 2016.
184p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.
Orientador: Rafael Malagoli Rocha

Descritores: 1. CÉLULAS NEOPLÁSICAS CIRCULANTES.
2. NEOPLASIAS DA MAMA/metabolismo. 3. TRANSIÇÃO
EPITELIAL-MESENQUIMAL. 4. MELANOMA.

“Encontrei um jeito muito meu de enfrentar este momento:
Primeiramente, decidi que viveria minha cura e não minha doença!
E segundo, decidi que eu preciso ajudar nas pesquisas,
pois alguém um dia fez isso por mim! Conte comigo!”
(Resposta de uma paciente ao ser convidada para participar deste estudo).

DEDICATÓRIA

Aos pacientes que voluntariamente participaram deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rafael Malagoli Rocha, pela confiança depositada em mim para a condução deste estudo, por ser tão solícito, pelo aprendizado profissional e pessoal.

Aos colegas do laboratório *Molecular Morphology*, pelo apoio e momentos vividos: Iara (muito obrigada pela parceria!), André, Mariana, Beatriz, Júlio, Mayara, Felipe, Nayra e Érica.

À Dra. Shannon Stott, pela oportunidade da realização do estágio no exterior, pelo aprendizado e suporte científico, pela amizade.

Aos colegas e amigos do *MGH Cancer Center* e *BioMEMS*, em especial Woo, Thomas, Katy, Eduardo e Mahnaz.

Ao Dr. Stephen Michael Rothenberg, por todos os ensinamentos científicos e apoio diário.

À Dra. Shyamala Mahewasran e ao Dr. Daniel Haber, por viabilizarem a realização do estágio no exterior, pelo aprendizado científico, pela estrutura laboratorial e doação das linhagens de CTCs de mama.

À Dra. Ludmilla Chinen, pela idealização dos projetos de CTCs no AC Camargo Cancer Center e por disponibilizar o uso da plataforma ISET.

Àqueles que contribuíram para a coleta das amostras: Departamentos de Quimioterapia, Mastologia, e Análises Clínicas. Ao José Ivanildo Neves e em especial à Adriana Mazega.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares, pela estrutura do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center.

Ao Banco de Tumores do AC Camargo Cancer Center.

Aos Drs. Emmanuel Dias-Neto e Vladimir Cordeiro de Lima, pela doação das linhagens celulares de câncer de mama.

À Dra Vilma Martins, por permitir a realização dos ensaios de *Western Blot* em seu laboratório e em especial à Dra. Bruna Roz pelos ensinamentos da técnica e amizade.

À Dra. Katlin Brauer Massirer, membro da banca de qualificação, por todas as sugestões que contribuíram para a melhoria deste estudo.

À Dra. Juliana Laino, pelos ensinamentos sobre cultura de células e pela amizade.

À Bruna Malagoli, minha irmã de “batalha científica”.

A todos os funcionários da pós-graduação e da biblioteca.

Ao suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo DR: 2012/00041-6; Processo BEPE: 2014/00529-4).

Aos pacientes que participaram deste estudo.

Aos amigos e colegas do CIPE, em especial José Roberto, Maria Galli e Fernanda Giudice.

À Aliack Reis, por sua amizade durante a estadia nos Estados Unidos.

À minha família, por todo o suporte emocional.

RESUMO

Carvalho FM. **Estudos de células tumorais circulantes (CTCs) em câncer de mama e melanoma**. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

As células tumorais circulantes (CTCs) são extremamente raras no sangue periférico de pacientes com câncer e têm demonstrado refletir em tempo real o *status* do tumor primário. A elucidação da biologia dessas células permitirá a identificação de uma subpopulação metastática e, possivelmente, resistente a tratamento. Além disto, elas poderiam representar uma alternativa importante e menos invasiva às tradicionais biópsias para o monitoramento da resposta a drogas. Este estudo investigou CTCs em pacientes com câncer de mama e melanoma utilizando diferentes abordagens tecnológicas, descritas a seguir. Objetivamos isolar e caracterizar CTCs a partir de amostras de sangue de pacientes com câncer de mama e realizar a análise destas células em comparação com amostras de seus tumores primários pareados, com foco em marcadores da transição-epitélio-mesênquima (TEM) (CKs e FOXC1) e do metabolismo celular (PGC-1a, COXIV, MCT4). Para tal, pacientes com câncer de mama M0 e M+ foram recrutadas. Não houve diferença significativa entre os grupos para a mediana do valor de CTC. Ambos os grupos de pacientes apresentaram maior porcentagem de CTCs positivas para os marcadores do metabolismo oxidativo (PGC-1a e COXIV) comparado à glicólise aeróbica (MCT4). Por outro lado, houve diferença quanto à expressão dos marcadores da TEM em CTCs entre os dois grupos de pacientes. Observamos mudanças na expressão de marcadores metabólicos e da TEM em amostras de tecido primário e metástases, porém baixa ou nenhuma correlação entre as amostras de tecidos e CTCs foi encontrada. O número total de CTCs alterou após o início da terapia neoadjuvante e PGC-1a foi o único marcador metabólico que apresentou positividade em CTCs para todas as pacientes

analisadas e ainda mostrou aumento de sua expressão em tumor primário pós-tratamento. O uso de CTCs para o monitoramento seriado das mudanças dinâmicas na sinalização de células tumorais em resposta ao tratamento do melanoma com mutação em BRAF permitiria uma rápida avaliação do sucesso ou falha terapêutica. Por esta razão, desenvolvemos com sucesso uma abordagem nova e robusta de múltiplo-imunofluorescência aplicando as tecnologias de imagem multiespectral (MSI) e a amplificação do sinal por tiramida (TSA) para a identificação de CTCs e quantificação de proteínas de sinalização. Para este estudo, geramos um modelo animal de melanoma usando uma linhagem celular altamente metastática. CTCs foram isoladas a partir do sangue de camundongos utilizando um dispositivo microfluídico (^{neg}CTC-ichip). Uma vez validada, a metodologia foi aplicada à análise de CTCs isoladas a partir de amostras de sangue de pacientes com melanoma. Nosso coquetel de anticorpos contra epítomos específicos de melanoma demonstrou alta especificidade em capturar CTCs a partir de amostras de melanoma. Nenhum resultado falso positivo foi observado em células normais do sangue e raras positivities foram detectadas em amostras de indivíduos saudáveis usados como controle negativo. Alterações dinâmicas na expressão de pERK e pS6 em CTCs foram observadas como resposta ao tratamento para os inibidores de MAPK. Especificamente para as amostras de camundongos, eventos de resistência à terapia já descritos para melanoma foram observados em CTCs. Uma análise qualitativa e pareada do tecido do tumor primário e CTC demonstrou uma resposta à terapia semelhante para ambas as amostras. Os nossos resultados demonstram que esta nova abordagem é capaz de identificar CTCs a partir de amostras de sangue de pacientes e de modelo animal e que essas células podem representar um importante substituto às biópsias tumorais para identificar alterações farmacodinâmicas na expressão de marcadores em CTCs induzidas pela resposta à terapia.

SUMMARY

Carvalho FM. **[Study of circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer and melanoma]**. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Circulating tumor cells (CTCs) are extremely rare cells in the peripheral blood of cancer patients that have been shown to reflect the real time status of the primary tumor. Elucidation of their biology will allow for the identification of metastatic and, possibly, drug resistant subpopulation of cells. In addition, they could provide an important, less invasive alternative to traditional biopsies for monitoring drug response. This study investigated CTCs in breast cancer and melanoma patients using different technological approaches as described below. We aimed to isolate and characterize CTCs from peripheral blood of breast cancer patients and to perform the analysis of these cells in comparison to their paired primary tissue samples with a focus on the markers of epithelial-mesenchymal transition (EMT) (CKs and FOXC1) and cellular metabolism (PGC-1a, COXIV, MCT4). To achieve this, M0 and M+ breast cancer patients were recruited. There was no significant difference between the groups for median value of CTCs. Both patient groups presented higher percentage of positive CTCs for markers of oxidative metabolism (PGC-1a e COXIV) compared to aerobic glycolysis (MCT4). Conversely, there was difference related to EMT markers in CTCs between the two patient groups. We observed changes in expression of EMT and metabolic markers in primary tumor and metastases, however low or no concordance between tissue samples and CTCs was found. The total number of CTCs changed after the initiation of neoadjuvant therapy and PGC-1a was the only metabolic marker that presented positivity in CTCs of all patients analyzed while also demonstrated an increase in expression in primary tumor post-treatment. Serial monitoring of the dynamic changes in tumor cell signaling in response to treatment in BRAF mutant melanoma

using CTCs would allow for rapid assessment of therapeutic success or failure. For this reason, we successfully developed a novel robust fluorescent multiplexed staining approach applying Multi-Spectral Imaging (MSI) and Tyramide Signal Amplification (TSA) technologies for the identification of CTCs and the quantification of signaling proteins. For this study, we generated a melanoma mouse model using a highly metastatic melanoma cell line and CTCs were isolated from mice blood using a negative selection, microfluidic device (^{neg}CTC-ichip). Once validated, we translated our protocol for the analysis of CTCs isolated from blood samples of melanoma patients. Our cocktail of antibodies against melanoma epitopes showed a high specificity in capturing melanoma CTCs, no reaction with normal blood cells and rare false positive events in blood samples from healthy donors used as negative controls. Dynamic changes in pERK and pS6 expression in CTCs were observed as response of treatment for MAPK inhibitors. Specifically for mice samples, drug resistance events described for melanoma cancer were observed in CTCs and a paired qualitative analysis of tissue and CTCs demonstrated similar drug response for both specimens. Our results demonstrate that using this new approach, we are able to identify CTCs in blood samples from patients and mice and that these CTCs can be used as a surrogate to tumor biopsies to detect pharmacodynamics changes of expression of markers in CTC induced by response to treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Características morfológicas dos carcinomas mamários ductal e lobular.....	2
Figura 2	Representação esquemática do processo metastático.....	7
Figura 3	Representação esquemática da transição epitélio-mesênquima.....	15
Figura 4	Vias metabólicas das células tumorais.....	19
Figura 5	Progressão e estadiamento do melanoma.....	25
Figura 6	Via de sinalização MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) em melanoma com mutação BRAF V600E.....	27
Figura 7	Visão geral dos mecanismos de adaptação à ação dos inibidores da RAF em melanoma com mutação BRAF.....	29
Figura 8	Exemplos de tecnologias para isolamento e caracterização de CTCs.....	42
Figura 9	Reação de amplificação de sinal por tiramida.....	45
Figura 10	Etapas do protocolo de múltiplo-imunofluorescência para o estudo do câncer de mama.....	61
Figura 11	Etapas da análise de imagem multiespectral para tecidos.....	63

Figura 12	Múltiplo-imunofluorescência para análise de CTCs derivadas de melanoma.....	70
Figura 13	Expressão de CKs em linhagem de células tumorais de mama.....	75
Figura 14	Expressão de FOXC1 em linhagem de células tumorais de mama.....	76
Figura 15	Expressão dos marcadores metabólicos (PGC-1a, COXIV e MCT4) em linhagem de células tumorais de mama.....	78
Figura 16	Distribuição do número de CTCs entre os grupos de pacientes M0 e M+.....	83
Figura 17	Imagens representativas de Microêmbolos Tumorais em pacientes com câncer de mama.....	87
Figura 18	Expressão dos marcadores da TEM (CKs e FOXC1) em CTCs isoladas de amostras de sangue de pacientes com câncer mama.....	89
Figura 19	Expressão dos marcadores metabólicos (PGC-1a, COXIV e MCT4) em CTCs isoladas de amostras de sangue de pacientes com câncer mama.....	95
Figura 20	Curva de sobrevida livre de progressão de doença de acordo com a expressão de MCT4 em CTCs isoladas a partir do grupo de pacientes M0.....	96
Figura 21	Imagens representativas de células das linhagens de CTCs, BRX68 e BRX 142 imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (4 cores).....	101

Figura 22	Expressão quantitativa de marcadores da TEM nas linhagens de CTCs.....	102
Figura 23	Correlação entre a expressão de HER-2 e FOXC1 nas linhagens de CTCs.....	103
Figura 24	Imagens representativas de células das linhagens de CTCs, BRX68 e BRX 142 imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (5 cores).....	105
Figura 25	Expressão quantitativa de marcadores metabólicos nas linhagens de CTCs.....	106
Figura 26	Expressão dos marcadores metabólicos na linhagem de CTC BRX142.....	107
Figura 27	Imagens representativas de amostras de tecido primário e metástases imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (4 cores).....	109
Figura 28	Expressão de marcadores da TEM nas amostras de tecido primário dos diferentes grupos de pacientes (M0 e M+) e metástases.....	110
Figura 29	Imagens representativas de amostras de tecido primário e metástases imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (5 cores).....	118
Figura 30	Expressão quantitativa de marcadores metabólicos nas amostras de tecido primário dos diferentes grupos de pacientes (M0 e M+) e metástases.....	119

Figura 31	Correlação entre os valores de HScore correspondentes ao sinal fluorescente de MCT4 e CK nos tumores primários do grupo M+.....	125
Figura 32	Número de CTCs isoladas de amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama antes e após terapia neoadjuvante.....	128
Figura 33	Gráficos com os valores de HScore para os marcadores analisados antes e após terapia neoadjuvante.....	129
Figura 34	Validação dos anticorpos para imunomarcção específica em melanoma.....	132
Figura 35	Curva dose-resposta para a linhagem celular 113-6/4L para os inibidores da via MAPK.....	133
Figura 36	Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de componentes das vias MAPK e PI3K-AKT.....	136
Figura 37	Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de pERK.....	137
Figura 38	Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de DUSP6.....	138
Figura 39	Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de SPRY2.....	139
Figura 40	Etapas do ensaio de múltiplo-imunofluorescência para o melanoma.....	140
Figura 41	Modelo animal de melanoma.....	143

Figura 42	Caracterização de células isoladas a partir de amostra de sangue de camundongos.....	144
Figura 43	Monitoramento da expressão de pERK após o tratamento com dabrafenibe.....	146
Figura 44	Monitoramento da expressão de pS6 após o tratamento com dabrafenibe.....	147
Figura 45	Porcentagem de CTCs categorizadas de acordo com o <i>cutoff</i> estabelecido para os sinais fluorescentes de pERK (≥ 50) e pS6 (≥ 100).....	148
Figura 46	Validação da múltiplo-imunofluorescência utilizando amostras de pacientes com melanoma e de indivíduos saudáveis.....	152
Figura 47	Separação entre a população de CTCs e leucócitos baseado no sinal fluorescente dos marcadores tumorais e CD45.....	153
Figura 48	Sinal fluorescente para pERK e pS6 em CTCs isoladas a partir de pacientes com melanoma.....	154
Figura 49	Representação esquemática dos principais resultados obtidos para o estudo do câncer de mama.....	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínico-patológicas das pacientes.....	82
Tabela 2	<i>Status</i> de CTC em relação ao <i>status</i> da doença para os grupos M+ e M0.....	85
Tabela 3	Expressão de CKs e FOXC1 em CTCs de acordo com as características clínico-patológicas do grupo M+.....	92
Tabela 4	Expressão de MCT4 em CTCs de acordo com o <i>status</i> da doença para o grupo M0.....	96
Tabela 5	Expressão tecidual de CKs e FOXC1 em relação às características clínico-patológicas, CTCs e CTMs do grupo M0.....	112
Tabela 6	Concordância da expressão de CKs e FOXC1 entre amostras de tecido e CTCs de pacientes do grupo M0	114
Tabela 7	Concordância da expressão de CKs e FOXC1 entre amostras de tecido e CTCs de pacientes do grupo M+	114
Tabela 8	Concordância da expressão dos marcadores metabólicos entre amostras de tecido e CTCs de pacientes do grupo M0.....	121
Tabela 9	Concordância da expressão dos marcadores metabólicos entre amostras de tecido e CTCs de pacientes do grupo M+.....	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estadios clínicos dos tumores de mama de acordo com sistemaTNM.....	3
Quadro 2	Classificação dos tumores de mama baseada em perfis imunofenotípicos.....	4
Quadro 3	Tecnologias para isolamento e detecção de CTCs.....	38
Quadro 4	Anticorpos utilizados para o ensaio de <i>Western blot</i>	52
Quadro 5	Anticorpos utilizados para imunocitoquímica por dupla marcação.....	57
Quadro 6	Anticorpos utilizados para múltiplo-imunofluorescência no câncer de mama.....	59
Quadro 7	Reagentes de amplificação de sinal por tiramida.....	60
Quadro 8	Anticorpos utilizados para múltiplo-imunofluorescência no melanoma.....	69
Quadro 9	Classificação das diferentes linhagens celulares utilizadas no estudo.....	73
Quadro 10	Características das linhagens de CTCs incluídas neste estudo.....	97
Quadro 11	Número de CTCs, <i>status</i> de CTM e dos marcadores da TEM e do metabolismo em CTCs antes e após terapia neoadjuvante.....	128
Quadro 12	Dados clínicos dos pacientes com melanoma incluídos no estudo.....	151

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µm	Micrograma
α-SMA	<i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
AF488	Alexa Fluor® 488
AF594	Alexa Fluor® 594
AKT	<i>Protein Kinase B / Proteína Quinase B</i>
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AR	<i>Antigen Retrieval</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
B	<i>Baseline</i>
B27	<i>Human leukocyte antigen B27</i>
BCA	Ácido Bicinconínico
BRCA 1	<i>Breast Cancer 1, early onset</i>
BRCA 2	<i>Breast Cancer 2, early onset</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAIX	<i>Carbonic Anhydrase IX</i>
CD16	<i>Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III</i>
CD271	<i>Low affinity nerve growth factor receptor</i>
CD45	Antígeno leucocitário comum
CDH1	<i>Cadherin 1, type 1</i>
CDH2	<i>Cadherin 2, type 1/N-cadherin</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CK14	Citoqueratina 14
CK19	Citoqueratina 19
CK5	Citoqueratina 5
CKs	Citoqueratinas
COXIV	<i>Cytochrome c Oxidase subunit IV</i>
CRAF	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
CSPG4	<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4</i>
CTC	<i>Circulating Tumor Cell/Célula Tumoral Circulante</i>

CTM	<i>Circulating Tumor Microemboli/Microêmbolo Tumoral Circulante</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
CY3	Cianina 3
CY5	Cianina 5
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DUSPS	<i>Dual-specificity Phosphatases</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
EPCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ERRA	<i>Estrogen-Related Receptor Alpha</i>
ESR1	Receptor de Estrógeno 1
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FGFR2	Receptor 2 de Fator de Crescimento Fibroblástico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FN1	Fibronectina 1
FNA	<i>Fine Needle Aspiration/Aspiração por Agulha Fina</i>
FOXC1	<i>Forkhead box protein C1</i>
GALNAc-T	<i>Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLUT1	Transportador de Glicose, tipo 1
GP-100	Glicoproteína 100
GTP	Guanosina Trifosfato
^{HB}CTC-Chip	Herringbone <i>CTC-chip</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HMW-MAA	<i>Human High Molecular Weight-Melanoma-Associated Antigen</i>
HPMC	<i>Hydroxypropyl Methylcellulose</i>

HPSE	<i>Heparanase</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase/ Peroxidase de Rábano</i>
HScore	<i>Histological Score</i>
IC50	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
ICQ	Imunocitoquímica
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISET	<i>Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells</i>
kPA	Quilopascal
MAGE 3	<i>Melanoma-associated Antigen 3</i>
MAGEC	<i>Magnetic Expansion Control</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinases</i>
MCAM	<i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>
MCSP	<i>Human Mitochondrial Capsule Selenoprotein</i>
MCT1	<i>Monocarboxylate Transporter 1</i>
MCT4	<i>Monocarboxylate Transporter 4</i>
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MELAN-A	<i>Melanoma Antigen Recognized by T cells 1 (MART-1)</i>
MELCAM	<i>Melanoma Cell Adhesion</i>
MET	<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
MGH	<i>Massachusetts General Hospital</i>
MITF	<i>Microphthalmia-associated Transcription Factor</i>
mL	Mililitros
MOI	<i>Multiplicity of infection/multiplicidade de infecção</i>
MSI	<i>Multi-Spectral Imaging</i>
MUC-1	<i>Mucin 1, Cell Surface Associated</i>
NF-κB	Factor Nuclear kappa B
OS	<i>Overall Survival</i>
P	Após terapia neoadjuvante
PAI1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PAX3	<i>Paired Box 3</i>

PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
pERK	<i>Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
PFS	<i>Progression Free Survival</i>
PGC-1a	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 alpha</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha</i>
pS6	Phosphorylated Ribosomal Protein S6/ S6 Fosforilada
PTN	<i>Pleiotrophin</i>
RA	Recuperação Antigênica
RAF	<i>Serine/threonine-protein kinase</i>
RE	Receptor de Estrógeno
RH	Receptor Hormonal
RP	Receptor de Progesterona
RTKs	Receptores Tirosina Quinase
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
S100	<i>S100 calcium-binding protein</i>
S100A4	<i>S100 calcium binding protein A4</i>
S100A9	<i>S100 calcium binding protein A9</i>
SED	Sem evidência da doença
SERPINE1	<i>Serpin Peptidase Inhibitor</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SLUG	<i>Zinc finger protein SNAI2 ou Protein snail homolog 2</i>
SMAD	<i>Small mother against decapentaplegic</i>
SNAIL	<i>Zinc finger protein ou Protein snail homolog 1</i>
SOD2	<i>Superoxide Dismutase 2</i>
SPRYs	<i>Sprouty homolog 2</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM	Transição epitélio-mesênquima

TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TME	<i>Transição Mesênquima-Epitelial</i>
TORC1	<i>Transcriptional Coactivator for CREB1</i>
TSA	<i>Tyramide Signal Amplification</i>
TU	Tumor
TWIST	Família bHLH fator de transcrição
TYRP1	<i>Tyrosinase-related protein 1</i>
VIM	Vimentina
WNT3	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Mama	1
1.1.1	Células Tumorais Circulantes no câncer de mama	7
1.1.2	Transição epitélio-mesênquima (TEM).....	13
1.1.3	Reprogramação metabólica.....	18
1.2	Melanoma.....	24
1.2.1	Mecanismos de resistência à terapia	28
1.2.2	Células Tumorais Circulantes no melanoma	32
1.3	Tecnologias para o isolamento e caracterização de CTCs.....	36
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	47
2.2	Objetivos específicos.....	47
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1	Linhagens celulares.....	49
3.2	<i>Cell Spiking</i>	50
3.3	Extração e quantificação de proteínas	50
3.4	<i>Western Blot</i>	51
3.5	Pacientes e espécimes anatomopatológicos	53
3.6	Isolamento e caracterização de CTCs para o estudo do câncer de mama.....	54
3.6.1	Isolamento de CTCs pelo ISET	54
3.6.2	Imunocitoquímica por dupla marcação.....	55
3.7	Múltiplo-imunofluorescência em linhagens de CTCs e amostras de tecidos de câncer de mama.....	57
3.7.1	Preparo das lâminas para imunofluorescência	57
3.7.2	Construção da biblioteca espectral.....	58
3.7.3	Múltiplo-imunofluorescência	60

3.7.4	Análise da múltiplo-imunofluorescência.....	61
3.8	Viabilidade Celular.....	63
3.9	Imunofluorescência	64
3.10	Geração de Células 113-6/4L GFP+ estáveis	65
3.11	Modelo animal de melanoma e tratamento com inibidor da via MAPK..	66
3.12	Imunoistoquímica	67
3.13	Isolamento e caracterização de CTCs para o estudo do melanoma	67
3.13.1	Isolamento de CTCs pelo CTC-ichip	67
3.13.2	Múltiplo-imunofluorescência para detecção e caracterização de CTCs	68
3.13.3	Análise de CTCs.....	69
3.14	Análises estatísticas	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1	Avaliação da expressão de marcadores metabólicos e da TEM em CTCs e amostras de tecidos de pacientes com câncer de mama.....	72
4.1.1	Análise da expressão dos marcadores em linhagens de câncer de mama.....	72
4.1.2	Análise de CTCs em pacientes com câncer de mama	80
4.1.3	Análise da expressão dos marcadores em linhagens de CTCs de câncer de mama	97
4.1.4	Análise das amostras de tecido de câncer de mama	107
4.1.5	Análise de CTCs, de marcadores metabólicos e da TEM em pacientes submetidas à terapia neoadjuvante	125
4.2	Análise das alterações dinâmicas na sinalização celular em CTCs como resposta à terapia em melanoma com mutação em BRAF.....	129
4.2.1	Ensaio <i>in vitro</i>	129
4.2.2	Ensaio <i>in vivo</i>	141
4.2.3	Análise de CTCs em paciente com melanoma.....	149
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	155
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

ANEXOS

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do AC Camargo Cancer Center
- Anexo 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Anexo 3** Bibliotecas espectrais geradas para a análise da múltiplo-imunofluorescência de 4 e 5 cores em células e tecidos
- Anexo 4** População de células 113-6/4L com alta expressão de GFP isolada pela técnica de sorteamento de células ativada por fluorescência (FACS)
- Anexo 5** Número de CTC/*spot* da membrana do ISET
- Anexo 6** *Status* de CTC em relação às características clínico-patológicas dos grupos M+ e M0
- Anexo 7** Expressão de CKs e FOXC1 em CTCs de acordo com as características clínico-patológicas do grupo M0
- Anexo 8** Expressão de marcadores metabólicos nas amostras de tecido em relação às características clínico-patológicas, CTCs e CTM das pacientes do grupo M0 e M+
- Anexo 9** Artigo publicado na *Nature Cell Biology* em colaboração com LEBLEU et al.
- Anexo 10** Artigo CARVALHO et al. (em preparação)

1 INTRODUÇÃO

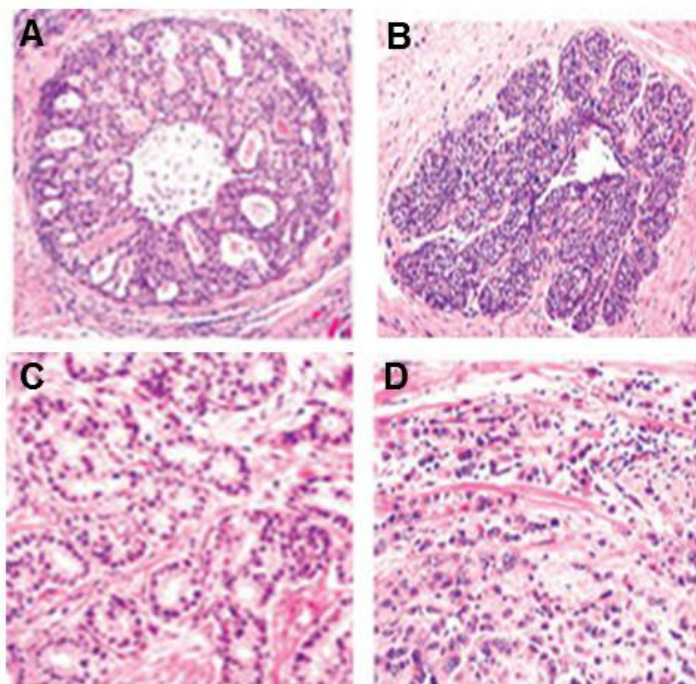
1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é, mundialmente, o tipo de câncer mais frequente entre mulheres. E, se comparado aos demais tipos de cânceres que acometem a população em geral, ocupa o segundo lugar (1,67 milhões de casos diagnosticados) e a quinta posição entre as causas de mortes (522 mil de casos de mortes) (FERLAY et al. 2015). No Brasil, em 2013, foram registradas 14.207 mortes por câncer de mama entre mulheres e foram previstos 57.960 novos casos para 2016 (Ministério da Saúde 2015).

Embora a etiologia exata do câncer de mama seja desconhecida, a suscetibilidade está associada a fatores ambientais e genéticos, sendo que mutações hereditárias nos genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* aumentam o risco individual de aparecimento de câncer de mama em 60 a 85% (HILL et al. 1997). Além disto, evidências experimentais e epidemiológicas sugerem que o risco da doença está relacionado com o aumento da idade e outros fatores como: exposição do organismo a hormônios (menarca precoce, menopausa tardia, uso de anticoncepcionais orais e terapia de reposição hormonal); nuliparidade e primeira gestação após os 30 anos de idade; densidade mamária; nutrição; sedentarismo; consumo de álcool e tabagismo (ELLSWORTH et al. 2010).

O câncer de mama é considerado uma doença altamente heterogênea em níveis patológico, molecular e clínico. De acordo com a caracterização histológica, os carcinomas de mama podem ser classificados em diferentes tipos e subtipos como, por exemplo, ductal e lobular (SINN e KREIPE 2013), que se confinados ou não à membrana basal são categorizados como *in situ* ou invasores, respectivamente (LOPEZ-GARCIA et al. 2010) (**Figura 1**).

Os carcinomas mamários podem ser classificado em grau 1 (bem diferenciado), grau 2 (moderadamente diferenciado) e grau 3 (pouco diferenciado) de acordo com a formação de túbulos e glândulas, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (ELSTON e ELLIS 1991).



Fonte: LOPEZ-GARCIA et al. (2010).

Figura 1 – Características morfológicas dos carcinomas mamários ductal e lobular. A – Carcinoma ductal *in situ* (CDIS); B – Carcinoma lobular *in situ* (CLIS); C – Carcinoma ductal invasor (CDI); D – Carcinoma lobular invasor.

O estadiamento clínico dos tumores de mama (0 a IV) é feito de acordo com exames físicos e diagnóstico por imagem, seguindo o sistema de classificação de tumores malignos (TNM), em que T refere-se à presença, tamanho e extensão do tumor (T0 a T4); N está relacionado à metástase em linfonodos regionais (N0 a N3) e M refere-se à metástase distante (M0 e M1) (SOBIN et al. 2012) (**Quadro 1**)

Quadro 1 – Estádios clínicos dos tumores de mama de acordo com sistema TNM.

Estadio	Tumor (T)	Linfonodo (N)	Metástase (M)	
0 (carcinoma <i>in situ</i>)	Tis	N0	M0	
I (carcinoma invasivo localizado)	IA	T1*	N0	M0
	IB	T0	N1 _{mic}	M0
T1		N1 _{mic}	M0	
II (carcinoma invasivo localmente limitado ou regionalmente disseminado)	IIA	T0	N1	M0
		T1*	N1	M0
		T2	N0	M0
	IIB	T2	N1	M0
T3		N0	M0	
III (carcinoma invasivo localmente avançado ou regionalmente disseminado)	IIIA	T0	N2	M0
		T1*	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
		T3	N2	M0
	IIIB	T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0
IIIC	Qualquer T	N3	M0	
IV (carcinoma invasivo com presença de metástase)	Qualquer T	Qualquer N	M1	

T1* = inclui T1_{mic}; T1_{mic} = microinvasão (<0,1cm em sua maior dimensão); N1_{mic} = micrometástases (0,2-2mm)

PEROU et al. (2000) e SØRLIE et al. (2001) propuseram, baseados nos perfil de expressão gênica de tumores mamários invasivos, a seguinte classificação: luminal A, luminal B, superexpressor de HER2, normal-like e basal. Recentemente, o subtipo molecular *claudin-low* foi descrito

HERSCHKOWITZ et al. 2007) e a partir destes estudos, painéis imunohistoquímicos (**Quadro 2**) têm sido propostos visando a identificação desses subtipos para aplicação na rotina clínica e decisões terapêuticas (PAREDES et al. 2007; WOLFF et al. 2007; CHEANG et al. 2009; BHARGAVA et al. 2010; HAMMOND et al. 2010; GOLDBHIRSCH et al. 2013; UNTCH et al. 2013; JACKISCH et al. 2015).

Quadro 2 – Classificação dos tumores de mama baseada em perfis imunofenotípicos.

Subtipo	Perfil imunohistoquímico
Luminal A	RE+, RP+, HER2-, Ki67<20%*
Luminal B	Luminal B HER2-negativo: RE+, HER2-, RP+ (< 20% das células neoplásicas)* e/ou Ki67≥20%* Luminal B HER2-positivo: RE+, HER2+, qualquer RP, qualquer Ki67
Superexpressor de HER2	RE-,RP-, HER2+
Triplo Negativo	RE-,RP-, HER2-, CK5+ e/ou CK14+ e/ou EGFR+ e/ou p63+(basalóide) RE-,RP-, HER2-, CK5-,CK14-,EGFR, p63- (não-basalóide)

*De acordo com 13th e 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel (GOLDBHIRSCH et al. 2013; UNTCH et al. 2013; JACKISCH et al. 2015)

Os subtipos luminais representam mais de 60% dos casos de carcinomas invasivos da mama e em sua maioria apresentam expressão de receptores de estrógeno e progesterona. O luminal A apresenta melhor prognóstico e pode ser diferenciado do luminal B pela análise da expressão de HER2 e índice de Ki-67 (CHEANG et al. 2009; UNTCH et al. 2013; JACKISCH et al. 2015).

Os casos de câncer de mama que apresentam positividade para os receptores hormonais são beneficiados pela terapia hormonal como, por

exemplo, o uso do tamoxifeno. Estudos demonstram que a terapia adjuvante com tamoxifeno por 5 anos reduziu o risco de recidiva em cerca de 40% e de mortalidade em cerca de 35% (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group - EBCTCG 2005).

O subtipo superexpressor de HER2, embora possua pior prognóstico se comparado aos luminais, é beneficiado pela terapia-alvo com trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado que produz taxas de respostas superiores a 35% no câncer de mama metastático (VOGEL et al. 2001) e melhora na sobrevida global e livre de doença quando utilizado na terapia adjuvante (ROMOND et al. 2005; PICCART-GEBHART et al. 2005; SLAMON et al. 2005; JOENSUU et al. 2006).

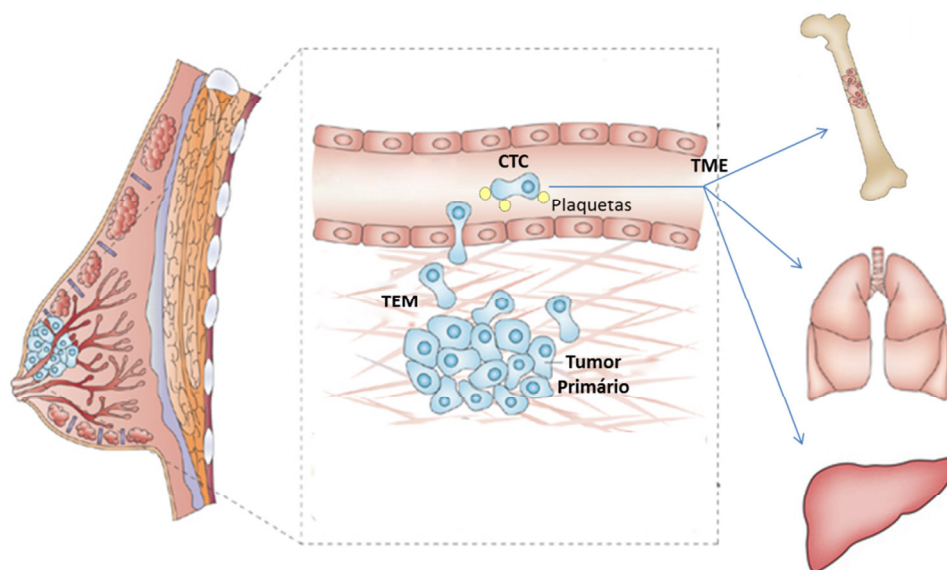
Os tumores que apresentam ausência de expressão das proteínas RE, RP e HER2 são denominados triplo negativos e podem ou não apresentar fenótipo basal de acordo com a de marcadores como CK5, CK14, EGFR e p63 (IRVIN et al. 2008; THIKE et al. 2010). Esse subtipo apresenta pior prognóstico se comparado a todos os demais e a ausência dos marcadores impede o benefício do uso do trastuzumabe e terapias hormonais, sendo desafiador o manejo terapêutico para os casos de triplo negativo. Recentemente, a inclusão de carboplatina à quimioterapia neoadjuvante foi considerada uma abordagem terapêutica promissora para esse tipo de câncer de mama (VON MINCKWITZ et al. 2014).

Apesar do aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico do câncer de mama, 7% das pacientes apresentam-se com doença metastática no momento do diagnóstico. Embora a maioria das pacientes seja

diagnosticada na fase inicial da doença, 20 a 80% dos casos, dependendo da condução do tratamento, poderão desenvolver metastásees distantes no período de 5 anos a partir do diagnóstico acometendo órgãos como ossos, pulmão, fígado e cérebro (JUNG et al. 2012).

O câncer de mama metastático é tipicamente incurável e quimioterapias convencionais parecem ter efeitos apenas paliativos. O tempo de sobrevida para pacientes com metástase varia muito, sendo considerada uma média de menos de 9 meses a 3 anos (CHANG et al. 2003).

O processo metastático envolve uma série de eventos biológicos que culminam com a colonização de locais distantes pelas células provenientes do tumor primário (KANG e PANTEL 2013) (**Figura 2**). Neste contexto, a análise de células tumorais circulantes (CTCs) representa uma importante ferramenta para avaliar a evolução da doença e a resposta à terapia.



Fonte: Adaptado de SMITH e THEODORESCU (2009).

Figura 2 - Representação esquemática do processo metastático. Células tumorais submetidas à transição epitélio-mesênquima (TEM) adquirem capacidade invasiva e são lançadas na corrente sanguínea a partir do tumor primário (FRIEDL e ALEXANDER 2011). As plaquetas em circulação funcionam como uma barreira protetiva às CTCs contra agressões mecânicas e o sistema imune além de contribuírem para manutenção da TEM via TGF- β e NF- κ B (LABELLE et al. 2011). Para o estabelecimento de metástases à distância, as CTCs recuperam o fenótipo epitelial pelo processo reverso à TEM, denominado transição mesênquima-epitelial (TME) (BRABLETZ et al. 2001).

1.1.1 Células Tumorais Circulantes no câncer de mama

A primeira evidência de CTCs em pacientes com câncer foi descrita por Thomas Ashworth em 1869 a partir de amostras de sangue *postmortem* de um paciente que possuía cerca de 30 tumores subcutâneos (ASHWORTH 1869). CTCs foram encontradas, após anos, em pacientes submetidas à mastectomia sem evidência da doença e naquelas com tumores quiescentes (LIANIDOU e MARKOU 2011).

Nos últimos dez anos, diversos estudos se dedicaram a evidenciar o papel de CTCs no processo metastático e progressão do câncer devido às potenciais aplicações clínicas oferecidas pela análise dessas células: prevenção ou detecção precoce da doença, identificação de doença residual

mínima após ressecção tumoral, monitoramento da evolução do tumor para casos de recidiva ou doença metastática, biomarcadores preditivos de resposta à terapia, elucidação de mecanismos de resistência a drogas e alvos para o desenvolvimento de novas terapias (PANTEL e SPEICHER 2015).

O valor prognóstico das CTCs para o câncer de mama foi demonstrado tanto para a doença metastática quanto precoce. CRISTOFANILLI et al. (2004) reportaram que pacientes com câncer de mama metastático (n=177) com ≥ 5 CTCs/7,5mL de sangue detectadas por *Cell Search*® possuíam menor taxa de sobrevida livre de progressão (PFS) e sobrevida global (OS) comparadas àquelas com < 5 CTCs/7,5mL de sangue. HAYES et al. (2006) publicaram os dados do seguimento clínico das pacientes do estudo de CRISTOFANILLI et al. (2004) (n=177). Neste estudo longitudinal prospectivo, as análises de CTCs foram realizadas antes do início de um novo ciclo de terapia e em intervalos específicos após o tratamento. Os autores concluíram que a presença de ≥ 5 CTCs/7,5mL de sangue em qualquer momento da terapia está relacionado com aumento nas taxas de mortalidade das pacientes com câncer de mama metastático.

Estudos recentes reforçam os dados publicados por CRISTOFANILLI et al. (2004) e HAYES et al. (2006). A contagem de CTCs como efeito prognóstico independente (≥ 5 CTCs/7,5mL de sangue) para PFS e OS na doença metastática foi confirmado por um estudo envolvendo 17 centros de pesquisa e um total de 1944 pacientes (BIDARD et al. 2014). SMERAGE et al. (2014) demonstraram pelo estudo clínico SWOG S0500 (fase 3, n=596)

que a persistência de altos valores de CTCs (≥ 5 CTCs) após 21 dias com quimioterapia de primeira linha é fator de mau prognóstico e que a mudança do esquema quimioterápico não gerou benefícios para o desfecho clínico das pacientes, sendo um indicativo de resistência à terapia.

LUCCI et al. (2012), ao estudarem o valor prognóstico de CTCs em casos de câncer de mama não metastático (estádios clínicos I a III) (n= 302) utilizando *Cell Search*®, relataram 73 pacientes com ≥ 1 CTC/7,5mL de sangue, 29 pacientes com ≥ 2 CTCs/7,5mL de sangue e 16 pacientes com ≥ 3 CTC/7,5mL de sangue. E que a detecção de ≥ 1 CTC/7,5mL de sangue foi capaz de predizer uma diminuição nas taxas de PFS e OS. Tais achados foram confirmados pelo estudo clínico SUCCESS (fase 3) que contou com uma coorte maior de pacientes (n= 2026) e incorporou análises dos dados após conclusão da quimioterapia (n=1492), demonstrando que a persistência de CTCs após a quimioterapia teve um impacto negativo sobre a sobrevida livre de doença das pacientes (RACK et al. 2014).

Alguns estudos sugeriram que CTCs são mais comumente encontradas no câncer de mama triplo-negativo (FEHM et al. 2009), enquanto outros têm sugerido uma maior prevalência de CTCs em pacientes HER2+ (LANG et al. 2009) ou HER2- (FEHM et al. 2009; AKTAS et al. 2011; NADAL et al. 2012). Entretanto, outros estudos não conseguiram detectar uma associação entre o número de CTCs e o subtipo de câncer de mama (PIERGA et al. 2012; WALLWIENER et al. 2013). Além disso, CRISTOFANILLI et al. (2007) demonstraram que CTCs têm valor prognóstico superior e independente da carga tumoral e fenótipo da doença

e podem representar um importante marcador de biologia tumoral em pacientes com câncer de mama metastático. Sugerem até mesmo que a detecção de CTCs poderia ser incluída como uma nova estratificação de estadiamento dos casos metastáticos.

A hipótese de que a disseminação de células tumorais pode ocorrer antes mesmo dos tumores se tornarem invasivos é suportada por observações clínicas em pacientes com lesões pré-invasivas, como no carcinoma ductal *in situ* (SÄNGER et al. 2011) e por achados experimentais com modelos animais em que CTCs foram detectadas semanas antes do aparecimento da doença metastática (HÜSEMANN et al. 2008).

O estabelecimento de cultura de células tumorais viáveis a partir de CTCs representa uma importante ferramenta para o entendimento da biologia dessas células, avaliação do seu potencial metastático e para aplicabilidade em testes pré-clínicos com diferentes esquemas terapêuticos.

O potencial metastático de CTCs no contexto do câncer de mama foi demonstrado por estudos que isolaram CTCs a partir de amostras de sangue de pacientes e observaram formação de metástases após injetá-las em animais imunodeficientes. ZHANG et al. (2013) reportaram que a população de CTCs EpCAM⁻ HER2⁺EGFR⁺HPSE⁺Notch1⁺ são propensas à geração de metástases cerebrais enquanto que BACCELLI et al. (2013) demonstraram que CTCs com o fenótipo EPCAM⁺CD44⁺CD47⁺MET^{+/-} geraram metástases ósseas, pulmonares e hepáticas.

YU et al. (2014) estabeleceram cultura de CTCs *in vitro* a partir de seis pacientes com câncer de mama luminal metastático utilizando o CTC-

iChip. Tais linhagens celulares têm sido mantidas *in vitro*, por mais de 1 ano, em meio de cultura sem adição de soro e suplementado com EGF e FGF básico sob condições não aderentes e de hipóxia.

Utilizando tais condições de cultivo, o grupo gerou culturas de CTCs a partir de amostras de pacientes ao longo de vários meses de terapia e obtiveram maior sucesso no estabelecimento de linhagens a partir de pacientes que apresentaram resistência à terapia se comparado àquelas obtidas de pacientes responsivas. Além disto, três (BRX-07, BRX-68 e BRX-61) de cinco linhagens de CTCs testadas foram capazes de gerar tumor em camundongos sugerindo um enriquecimento de população de células iniciadoras de tumor. O estudo foi ainda notável pela identificação de mutações pré existentes no gene PIK3CA e de novas mutações nos genes ESR1, PIK3CA e FGFR2 que foram presumivelmente adquiridas durante o curso da hormonioterapia e quimioterapia, revelando assim, novos potenciais alvos terapêuticos (YU et al. 2014).

As dificuldades e desafios quanto ao estabelecimento e à manutenção de linhagens celulares a partir de CTC isoladas de amostras de pacientes foram muito bem pontuadas e descritas por YU et al. (2014) e MAHESWARAN e HABER (2015). Desta forma, muitos estudos têm se dedicado ao estudo de CTCs geradas a partir de modelos animais.

As CTCs são lançadas na corrente sanguínea a partir do tumor primário e das metastases e podem ser encontradas como células individuais ou em grupos, denominados microêmbolos tumorais circulantes (CTMs) (HOU et al. 2012; ACETO et al. 2014).

As CTCs quando agrupadas parecem ter vantagens potenciais para a sobrevivência, resistência à quimioterapia pela composição de células não proliferativas e geração de lesões micrometastáticas em órgãos distantes (HOU et al. 2012). Diferentes estudos demonstraram que grupos de células tumorais quando injetados na circulação de camundongos apresentaram maior potencial metastático se comparados às células tumorais individuais (FIDLER 1970; LIOTTA et al. 1976; ACETO et al. 2014).

O estudo de ACETO et al. (2014), utilizando as tecnologias ^{HB}CTC-Chip (STOTT et al. 2010a) e o CTC-iChip (OZKUMUR et al. 2013) bem como amostras de pacientes com câncer de mama e modelo animal, demonstrou que os CTMs apresentam maior potencial metastático (23 a 50 vezes), maior resistência à apoptose e superexpressão de placoglobina quando comparados às CTCs individuais. O silenciamento do gene que codifica para placoglobina suprimiu a formação de CTMs e reduziu o aparecimento de metástases mostrando que o mecanismo de adesão intracelular em CTMs é dependente de placoglobina. Além disso, a presença de CTMs em pacientes com câncer de mama associou-se com pior prognóstico.

As CTCs, embora muito raras se comparada às células sanguíneas normais (1CTC: 10^9 células hematológicas em pacientes com doença metastática) (YU et al. 2011), excedem o número de lesões metastáticas em pacientes indicando que apenas uma pequena fração de CTCs sobrevivem na corrente sanguínea e são precursores metastáticos viáveis.

PLAKS et al. (2013) mencionam que uma simples enumeração das CTCs desprovida de uma caracterização molecular pode levar a conclusões clínicas errôneas. E apontam a elucidação da biologia das CTCs como uma abordagem importante para a detecção e isolamento da subpopulação de CTCs potencialmente metastática.

A transição epitélio-mesênquima (TEM) e a reprogramação metabólica são apontadas como processos celulares que contribuem para sobrevivência e potencial metastático das CTCs (PANTEL e SPEICHER 2015). A aquisição de fenótipo mesenquimal contribui para que células epiteliais resistam à *anoikis* (morte celular por perda de adesão) (ROBSON et al. 2006) e as alterações metabólicas para o suprimento das demandas energéticas durante o processo metastático (LEBLEU et al. 2014).

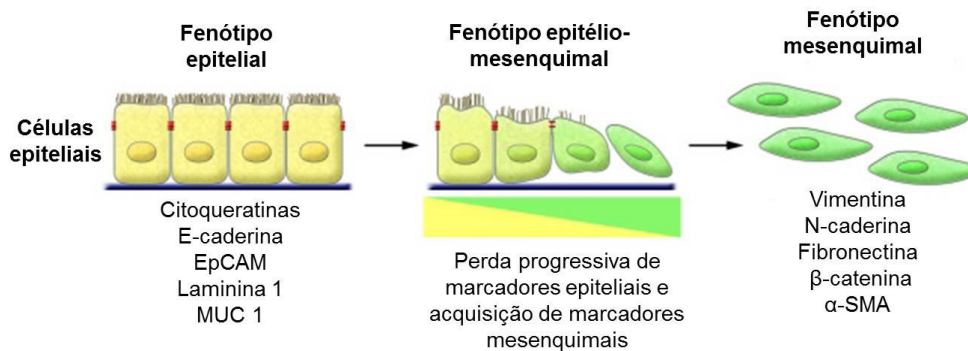
A maioria dos estudos abordando temas como TEM e metabolismo no contexto de CTCs e metástases são resultados do uso de linhagens celulares e modelos animais. Entretanto, o comportamento das CTCs pode não ser totalmente refletido por tais modelos de estudo, justificando a relevância da investigação dos mesmos em estudos com amostras de pacientes.

1.1.2 Transição epitélio-mesênquima (TEM)

A transição epitélio-mesênquima é um processo pelo qual as células epiteliais perdem o mecanismo de adesão célula-célula ao adquirirem propriedades mesenquimais refletindo sobre a morfologia celular, alteração na expressão gênica e aumento da mobilidade (THIERY 2002).

No contexto do câncer, a TEM contribui para os processos de migração, invasão, geração e sobrevivência das CTCs na corrente sanguínea, conferindo a tais células maior capacidade de se instalarem em locais distantes culminando com o aparecimento de metastases (BONNOMET et al. 2010).

A ocorrência da TEM é caracterizada pela baixa expressão de marcadores epiteliais, como CKs, E-caderina e EpCAM; e aumento da expressão daqueles considerados mesenquimais, como vimentina, N-caderina e fibronectina (**Figura 3**) (MICALIZZI et al. 2010). Em células cancerosas, foram identificadas mutações no gene codificante para E-caderina, tornando-as mais suscetíveis à TEM e aquisição de potencial metastático. Além disto, HGF, EGF, PDGF e TGF β são apontados em muitos carcinomas como responsáveis pela indução ou ativação funcional de fatores transcricionais associados à ocorrência da TEM como Snail, Slug, ZEB1, Twist e FOXC1 (KALLURI e WEINBERG 2009). Recentemente, foi demonstrado que Twist e Slug atuam conjuntamente na indução da TEM e metástase; e que há correlação entre a expressão de ambos em tumores de câncer de mama (CASAS et al. 2011). Além disto, foi observado que Snail encontra-se altamente expresso em células epiteliais e endoteliais de câncer de mama invasivo; e não é detectado em mama normal (WANG e ZHOU 2011).



Fonte: Adaptado de KALLURI e WEINBERG (2009).

Figura 3 - Representação esquemática da transição epitélio-mesênquima.

Estudos abordando o fenótipo de TEM em CTCs assim como seu potencial clínico foram realizados tanto no contexto do câncer de mama metastático como na doença precoce (ARMSTRONG et al. 2011; KALLERGI et al. 2011; MEGO et al. 2011; RAIMONDI et al. 2011; KASIMIR-BAUER et al. 2012; POWELL et al. 2012). Entretanto, o fenótipo de TEM adquirido pelas CTCs foi apontado como um obstáculo a ser transportado para a detecção efetiva dessas células a partir de amostras de sangue de pacientes, uma vez que diferentes metodologias baseiam-se na expressão de EpCAM para o isolamento de CTCs. Além disso, HOU et al. (2011) demonstraram que leucócitos expressam vimentina, o que pode acarretar resultados falsos positivos durante caracterização de CTCs.

Para superar os desafios impostos pelo fenótipo de TEM adquiridos pelas CTCs durante a disseminação tumoral, YU et al. (2013) utilizaram o ^{Hb}CTC-chip revestido com anticorpos contra EpCAM, EGFR e HER2; e a técnica de hibridização *in situ* com sondas para marcadores epiteliais (CKs 5,7,8,18,19; EpCAM; CDH1) e mesenquimais (FN1; CDH2; SERPINE1/PAI1) para o isolamento e caracterização de CTCs a partir de amostras de sangue

de pacientes com câncer de mama metastático. O grupo identificou as seguintes populações de CTCs: exclusivamente epiteliais (E), intermediárias (E > M, E = M, M > E) e exclusivamente mesenquimais (M). Além disso, os CTMs caracterizaram-se por intensa positividade para marcadores mesenquimais e pela associação com plaquetas. LABELLE et al. (2011) demonstraram que a secreção de TGF β por plaquetas e a interação direta das mesmas com células tumorais pode induzir um fenótipo de TEM pelas vias Smad e NF- κ B, respectivamente.

O estudo longitudinal também apresentado por YU et al. (2013) demonstrou que pacientes que responderam ao tratamento tiveram uma diminuição no número de CTCs e/ou da população de CTCs com fenótipo mesenquimal se comparada à epitelial. Enquanto que a população de CTC mesenquimal aumentou para os casos que tiveram progressão da doença.

A expressão de Snail, Slug e outros fatores de transcrição bem estabelecidos da TEM não foram detectados por YU et al. (2013) em CTMs que apresentaram positividade para marcadores mesenquimais. Por outro lado, em CTCs individuais e em CTMs observaram a expressão do fator de transcrição FOXC1. Além disto, POWELL et al. (2012) encontraram elevados níveis de transcritos de genes que codificam para proteínas associadas com a transição epitélio-mesênquima em CTCs, inclusive de FOXC1.

FOXC1 pertence a uma superfamília de fatores de transcrição envolvida no controle de diversos processos biológicos como por exemplo a tumorigênese (MYATT e LAM 2007). A superexpressão de FOXC1 foi identificada como uma característica diferencial entre o câncer de mama

basal-*like* e os demais subtipos moleculares (RAY et al. 2010; JENSEN et al. 2015). Além disto, a alta expressão de FOXC1 associou-se com pior sobrevida global e maior incidência de metástases em casos basal-*like* (RAY et al. 2010).

RAY et al. (2010) demonstraram que a expressão ectópica de FOXC1 em linhagens de câncer de mama induziu um fenótipo mesenquimal com diminuição da expressão de E-caderina e aumento da proliferação celular, migração e invasão celular. Outros estudos mencionam a ativação da via sinalizadora de NF- κ B (WANG et al. 2012), o aumento da expressão da metaloproteinase 7 (MM7) (SIZEMORE e KERI 2012) e regulação via EGFR (JIN et al. 2014) como possíveis mecanismos que explicam o envolvimento de FOXC1 em tais processos celulares no câncer de mama basal-*like*.

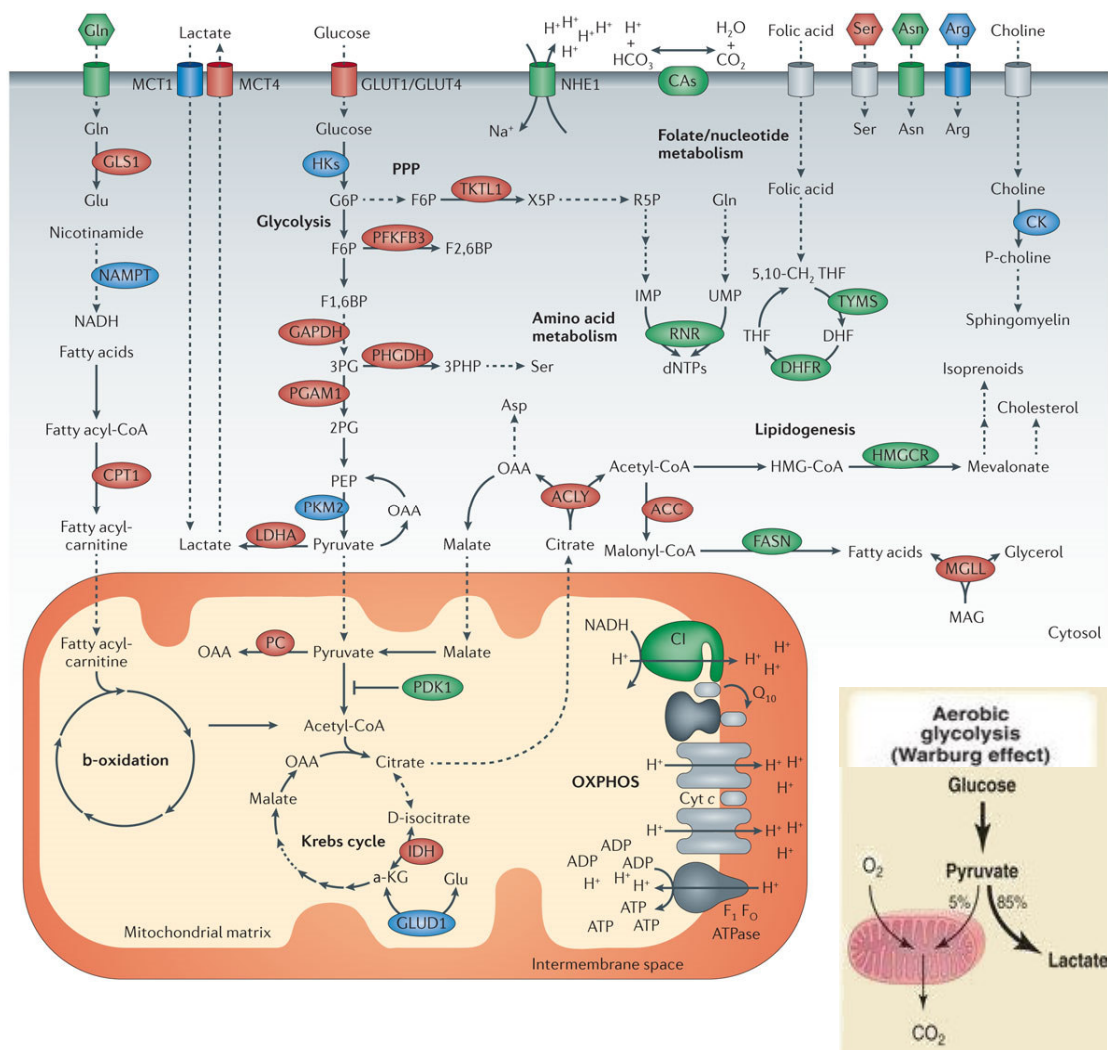
Recentemente, HAN et al. (2015) demonstrou que FOXC1 controla propriedades de células tronco tumoral no câncer de mama basal-*like* pela ativação da via de sinalização Hedgehog independente de Smoothened e que a superexpressão de FOXC1 reduziu a sensibilidade ao tratamento com inibidores desta via em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Mediante o exposto, FOXC1 representa um importante alvo de estudo no contexto do câncer de mama. Portanto, o presente estudo abordou a análise da expressão de FOXC1 em amostras de pacientes com câncer de mama correspondentes a diferentes etapas da progressão tumoral: tumor primário, CTCs e metástases.

1.1.3 Reprogramação metabólica

A reprogramação do metabolismo celular é considerada uma das características fundamentais do câncer e tem sido apontada como um dos maiores obstáculos ao desenvolvimento de novas terapias anticâncer baseadas no metabolismo das células tumorais (HANAHAN e WEINBERG 2011).

WARBURG (1956) foi um dos pioneiros em descrever alterações metabólicas apresentadas pelas células tumorais mencionando que, por apresentarem defeitos mitocondriais, tais células convertem preferencialmente glicose a lactato evitando a fosforilação oxidativa. E que isto ocorre ainda que em presença de oxigênio e gere um saldo inferior de ATP. Tal fenômeno ficou conhecido como glicólise aeróbica ou efeito de Warburg e por meio dele células cancerosas consomem glicose a uma taxa muito maior do que as células normais (**Figura 4**).



Fonte: Adaptado de GALLUZZI et al. (2013).

Figura 4 - Vias metabólicas das células tumorais. OXPHOS = fosforilação oxidativa

O transportador de monocarboxilatos, MCT4, é responsável pelo efluxo celular de lactato e atua no controle do pH intracelular de muitos tecidos que são dependentes da glicólise para a produção de energia. GALLAGHER et al. (2007) demonstraram que a expressão de MCT4 é maior em linhagens tumorais de câncer de mama do que em células normais. Portanto, tal proteína é considerada como marcador do efeito Warburg em células tumorais.

Embora menos explorados que outras proteínas envolvidas no fenótipo glicolítico e regulação do pH intracelular, a elucidação do papel dos MCTs no câncer tem se tornado alvo de estudos na literatura.

WITKIEWICZ et al. (2012) ao analisarem a expressão de MCT4 em amostras de tecido de pacientes com câncer de mama triplo negativo (TMA com mais de 180 casos) observaram que a expressão de MCT4 nas células tumorais não apresenta valor prognóstico diferentemente de quando a análise é feita em células do estroma: maior expressão de MCT4 no estroma teve associação com menor sobrevida global se comparado aos casos com ausência de expressão ($p < 10^{-32}$). O grupo menciona que o efeito “convencional” de Warburg não prediz desfecho clínico, propondo a existência do efeito “reverso” de Warburg nos tecidos de mama analisados, já que a glicólise aeróbica predomina no estroma e não nas células tumorais. E que este efeito seria responsável pela produção de moléculas energéticas como o lactato que conseqüentemente seria utilizado pelas células tumorais via metabolismo oxidativo para reações anabólicas que contribuem para o crescimento tumoral.

Um segundo estudo deste mesmo grupo de pesquisadores analisou amostras de tecido congelado de metástase linfonodal de casos de câncer de mama e demonstrou que a expressão de MCT4 predomina nas células estromais enquanto que a atividade de COXIV (proteína componente da cadeia de transporte de elétrons; considerada um marcador mitocondrial e um importante sítio de regulação da fosforilação oxidativa) foi mais intensa nas células de câncer de mama metastáticas, caracterizando o predomínio

do metabolismo mitocondrial oxidativo e não o efeito Warburg na metástase linfonodal (SOTGIA et al. 2012).

DOYEN et al. (2014), por sua vez, utilizando a análise de TMA contendo casos (n=127) correspondentes aos diferentes subtipos de câncer de mama apontaram o subtipo triplo negativo com maior perfil glicolítico (maior expressão de MCT1, MCT4, GLUT1 e CAIX), seguido pelos casos HER2+ e RH+. Ressaltando que a expressão tumoral de MCT4 (sem expressão presente no estroma) foi um fator prognóstico independente para sobrevida livre de metástase (HR = 0,47, p= 0,02) e sobrevida global (HR = 0,38, p = 0,002).

O silenciamento de MCT4 em linhagens de câncer de mama basal *like* levou à diminuição do transporte de lactato, proliferação celular, migração e invasão. Em ensaios *in vivo* afetou a formação e crescimento de tumores (MORAIS-SANTOS et al. 2015).

Mediante o exposto é possível perceber que os dados da literatura são conflitantes quanto ao papel de MCT4 no câncer de mama. Além disto, estudos recentes, contrapondo a teoria de Warburg, demonstram que muitos tumores não apresentam defeitos mitocondriais ou na habilidade em realizar fosforilação oxidativa (WARD e THOMPSON 2012) e que o metabolismo mitocondrial tem um papel importante na progressão tumoral (AHN e METALLO 2015).

CHEN et al. (2007) utilizando CTCs de pacientes com câncer de mama (estágio IV), demonstraram que a adaptação metabólica é requerida para a sobrevivência destas células ao microambiente cerebral, pois uma

análise proteômica revelou a presença de proteínas exclusivamente reguladas nas células cerebrais metastáticas e que as mesmas estão envolvidas em mecanismos antioxidantes e na obtenção de energia pela fosforilação oxidativa. Especificamente, foi detectado aumento da expressão das seguintes proteínas: i) enzimas da glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa; ii) coativadores transcricionais que promovem o metabolismo oxidativo como PGC-1a; iii) ERRa, receptor nuclear que é alvo de PGC-1a na regulação do metabolismo energético; iv) AMPK, um importante regulador da homeostase energética, e que exerce controle sob PGC-1a.

O estudo de LEBLEU et al. (2014) demonstrou que a fosforilação oxidativa é a via canônica mais diferencialmente modulada em CTCs se comparadas às células do tumor primário e metástases, com um aumento significativo dos níveis de transcritos de genes associados a essa via metabólica, como PGC-1a e COXIV. O silenciamento de PGC-1a em cultura de células diminuiu o potencial invasivo das células e atenuou a formação de metástases sem afetar a proliferação, o crescimento do tumor primário e o processo de transição epitélio- mesênquima.

TAN et al. (2015) desenvolveram modelos animais a partir de células deficientes em DNA mitocondrial e observaram que as células derivadas do tumor primário assim como as CTCs e as células presentes em sítios metastáticos progressivamente recuperaram sua função respiratória mitocondrial, com ganho de expressão de PGC-1a e COXIV, e capacidade tumorigênica. Ou seja, os resultados indicam que, no microambiente tumoral, ocorra uma transferência horizontal de DNA mitocondrial a partir de

células hospedeiras para as células tumorais com função respiratória comprometida para que sejam restabelecidas a respiração celular e a eficácia de iniciação do tumor.

O PGC-1 α é um coativador transcricional responsável por coordenar vários processos metabólicos por interagir com diferentes fatores transcricionais e receptores nucleares (LIU e LIN 2011). No contexto do câncer, estudos mencionam o envolvimento de PGC-1 α na biogênese mitocondrial, metabolismo oxidativo e da glutamina, resistência ao estresse oxidativo, lipogênese e tumorigênese. (BHALLA et al. 2011; KLIMCAKOVA et al. 2012; VAZQUEZ et al. 2013; MCGUIRK et al. 2013).

O envolvimento de PGC-1 α na biogênese mitocondrial ocorre pela coativação dos fatores respiratórios nucleares (NRF 1 e 2) e de ERR α desencadeando a expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons e transcrição do DNA mitocondrial. E a expressão de PGC-1 α é induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs) e acarreta o aumento da expressão da enzima mitocondrial antioxidante SOD2, limitando a acumulação de EROs. Desta forma, PGC-1 α ao estimular a atividade mitocondrial, acarreta maior geração de EROS e desempenha paradoxalmente uma função anti EROs, o que faz com que tal coativador seja apontado como alvo ideal para o controle e limitação do dano oxidativo resultante de defeitos na função mitocondrial (ST-PIERRE et al. 2006; LIU e LIN 2011).

A flexibilidade metabólica apresentada pelas células tumorais contribui para a sobrevivência e adaptação a novos microambientes,

entretanto, pouco se sabe sobre quais mudanças metabólicas (glicólise aeróbica *versus* fosforilação oxidativa) ocorrem ao longo da progressão tumoral. Portanto, o presente estudo avaliou, além dos marcadores da TEM, a expressão dos marcadores MCT4, PGC-1a e COXIV em amostras de tumor primário, CTCs e metástases de pacientes com câncer de mama.

1.2 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos, células encontradas na camada basal da epiderme, responsáveis pela produção de melanina e conseqüentemente pela pigmentação cutânea (UONG e ZON 2010) (**Figura 5**).

Embora represente menos de 5% dentre os casos diagnosticados como câncer de pele, o melanoma é considerado o tipo mais agressivo com aumento da incidência e casos de mortes nos últimos dez anos. Mundialmente, foram estimados 232.000 casos e 55.000 mortes por melanoma em 2012 (FERLAY et al. 2015). No Brasil, 5.670 novos casos foram estimados para 2016, sendo 3.000 entre homens e 2.670 entre mulheres (Ministério da Saúde 2015).

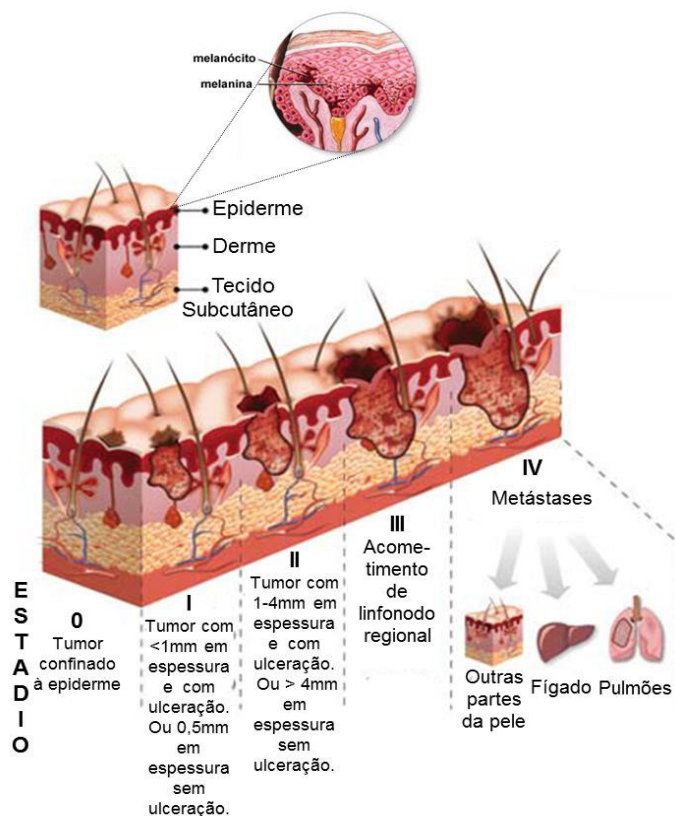


Figura 5 – Progressão e estadiamento do melanoma (BALCH et al. 2009)

Os fatores de riscos associados à ocorrência do melanoma possuem caráter genético e ambiental, como exposição à radiação ultravioleta, histórico familiar, alto número de nevos melanocíticos, aumento da idade, fenótipo individual (cor da pele), mutações no gene CDKN2A e TP53 (MEYER e ZONE 1994; RIGEL 2008).

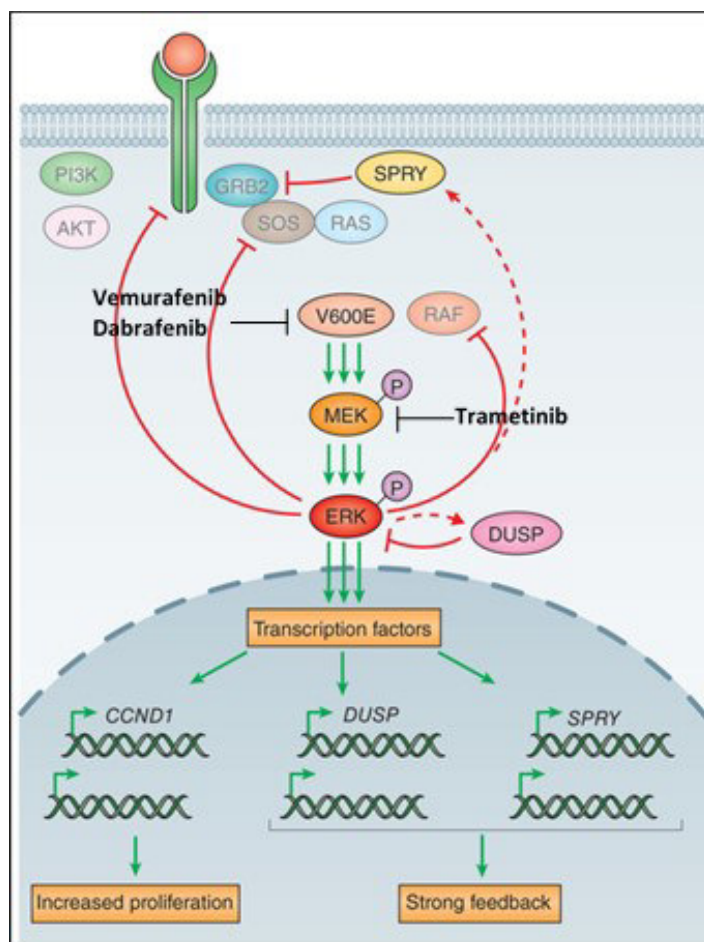
Os melanócitos migram, durante o processo embrionário, da crista neural para a epiderme (CICHOREK et al. 2013) e tal característica poderia explicar o alto potencial metastático apresentado pelo melanoma que acomete linfonodos regionais e sítios distantes como pulmões, cérebro, fígado e intestino delgado (ZBYTEK et al. 2008). Pacientes com melanoma

metastático apresentam um tempo médio de sobrevida de 6 a 10 meses e menos de 5% sobrevivem mais que 5 anos (LEE et al. 2000).

Aproximadamente 50% dos casos diagnosticados de melanoma apresentam mutações no gene BRAF, principalmente no códon 600 (BRAF V600), acarretando uma substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico (aproximadamente 70%), lisina, ácido aspártico ou arginina, representada respectivamente por BRAFV600E, BRAFV600K, BRAFV600D ou BRAFV600R. Tais mutações potencializam a atividade quinase de BRAF e desencadeiam a ativação constitutiva da via MAPK (**Figura 6**), que é essencial ao crescimento e sobrevivência de determinados tumores (DAVIES et al. 2002; WAN et al. 2004; LEE et al. 2011).

A identificação de mutações em BRAF contribuiu para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento do melanoma como vemurafenibe e mais recentemente dabrafenibe e trametinibe.

Vemurafenibe e dabrafenibe são inibidores seletivos de BRAF V600 enquanto trametinibe é um inibidor de MEK (**Figura 6**). Um estudo clínico randomizado de fase 3 mostrou que a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão bem como a taxa de resposta foram maiores para os pacientes utilizando vemurafenibe (13,6 meses, 6,9 meses e 57%, respectivamente) do que para aqueles submetidos à quimioterapia com dacarbazina (9,7 meses 1,6 meses e 9%, respectivamente) (MCARTHUR et al. 2014).



Fonte: Adaptado de LITO et al. (2013)

Figura 6 - Via de sinalização MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) em melanoma com mutação BRAF V600E

Os tratamentos com dabrafenibe ou trametinibe resultaram em uma melhor sobrevida livre de progressão do que o uso da quimioterapia (5,1 meses *versus* 2,7 meses ou 4,8 meses *versus* 1,5 meses, respectivamente) (FLAHERTY et al. 2012a).

A agência *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou, no início do ano de 2014, o uso da combinação de dabrafenibe e trametinibe para o tratamento do melanoma metastático e irressecável com mutações BRAF^{V600E} ou BRAF^{V600K}. Em um estudo clínico de fase 2, a média de

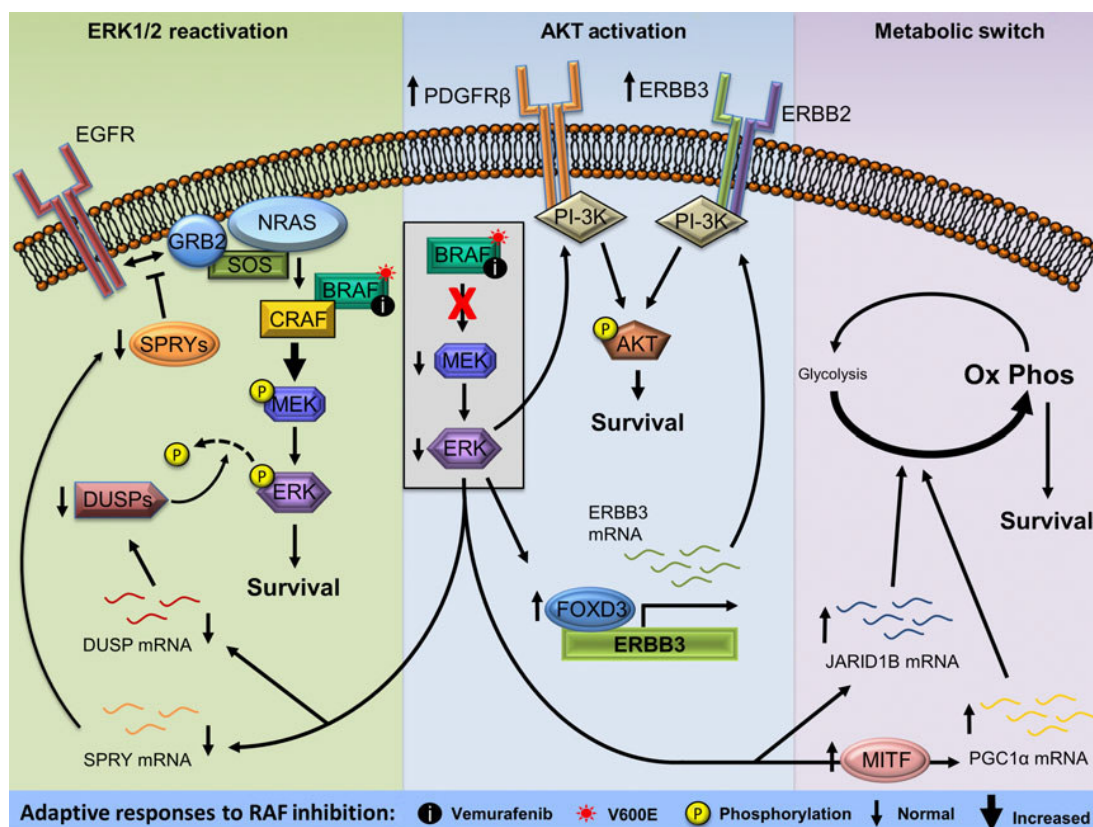
sobrevida livre de progressão de doença foi maior para os pacientes tratados com dabrafenibe (150mg, 2 vezes ao dia) e trametinibe (2mg, 1 vez ao dia) quando comparado à monoterapia com dabrafenibe (9,4 meses e 5,8 meses, respectivamente) (FLAHERTY et al. 2012b). O estudo de fase 3, COMBI-d, mostrou que a sobrevida livre de doença e a taxa global de resposta foram maiores para os tratamentos com dabrafenibe e trametinibe que para dabrefine e placebo (9,3 meses *versus* 8,8 meses e 67% *versus* 51%, respectivamente) (LONG et al. 2014).

Apesar do sucesso inicial com as terapias que alvejam a via MAPK, pacientes com melanoma BRAF V600 apresentam resistência à monoterapia com inibidores de BRAF após 6-7 meses de tratamento (CHAPMAN et al. 2011; HAUSCHILD et al. 2012). A resistência adquirida a tais inibidores está associada a múltiplos mecanismos que culminam com a reativação da via MAPK e/ou ativação de outras vias como PI3K/AKT que, por um mecanismo compensatório, acaba influenciando na resposta à inibição de BRAF/MEK (GOPAL et al. 2010; LITTLE et al. 2013).

1.2.1 Mecanismos de resistência à terapia

As respostas adaptativas ao tratamento são definidas, no contexto do melanoma BRAFV600, como mecanismos compensatórios às ações de inibidores de BRAF e MEK. Tais eventos ocorrem dentro de pouco tempo após o início do tratamento e em nível celular desencadeiam sinais que contribuem para a sobrevivência e crescimento das células tumorais ainda que em presença de uma droga (KUGEL e APLIN 2014).

Os mecanismos de adaptação podem ser divididos em 3 classes principais: reativação da via de sinalização MAPK, ativação de vias de sinalização alternativas e alterações em vias metabólicas (**Figura 7**)



Fonte: KUGEL e APLIN (2014).

Figura 7 - Visão geral dos mecanismos de adaptação à ação dos inibidores da RAF em melanoma com mutação BRAF.

A reativação da via MAPK está relacionada à inativação de fatores de transcrição (DUSPs e SPRY) responsáveis por um mecanismo de *feedback* negativo e indireto sobre a sinalização de ERK. DUSPs são fosfatases específicas para ERK (OWENS e KEYSE 2007), enquanto as proteínas SPRYs (KIM e BAR-SAGI 2004) afetam a sinalização de ERK por inibirem a

interação GRB2-SOS, impedindo, assim a ativação de RAS (LITO et al. 2012) (**Figura 6 e 7**).

Após o tratamento com inibidores de BRAF, a duração da ação de DUSPs e SPRY é dependente do tempo de meia-vida de cada proteína, permitindo então que o mecanismo de *feedback* negativo perdure por algum tempo, mesmo depois de uma inibição inicial. Entretanto, a exposição prolongada a esse tipo de droga leva à degradação dessas proteínas com consequente ativação de RAS-GTP e CRAF bem como de vias de sinalização paralelas como a via PI3K-AKT (HEIDORN et al. 2010; LITO et al. 2013). Dessa forma, uma abordagem de terapia combinada faz-se necessária para superar este tipo de mecanismo de resistência contribuindo para a máxima atividade antitumoral. LITO et al. (2012) demonstraram que a combinação de inibidores seletivos de RAF e MEK resulta em uma inibição aumentada da sinalização de ERK e do crescimento tumoral em modelo animal.

A inibição de BRAF pode ainda desencadear o aumento da sinalização de receptores tirosina quinase (RTKs) como PDGFR β e ERBB3 com consequente ativação paralela de vias de sinalização como PI3K-AKT, promovendo assim, proteção contra os sinais apoptóticos desencadeados por inibidores da RAF (**Figura 7**) (KUGEL e APLIN 2014).

Um mecanismo de adaptação a inibidores da RAF envolvendo a reprogramação metabólica foi recentemente descrito e evidenciou que a mudança do perfil glicolítico para o oxidativo contribuiu para a sobrevivência de células de melanoma com mutação BRAF (HAQ et al. 2013). Este evento

está relacionado a níveis aumentados de MITF e conseqüentemente de PGC-1 α que sabidamente induz a expressão de genes que codificam para proteínas componentes da via de fosforilação oxidativa (HAQ et al. 2013) ou ainda com o aumento da expressão de JARID1B induzido por inibidores da RAF, pois análises proteômicas identificaram aumento nas proteínas associadas com a fosforilação oxidativa como consequência da superexpressão de JARID1B (ROESCH et al. 2013).

Mediante a necessidade de se estabelecer marcadores capazes de prever resistência ao tratamento do melanoma e contribuir para a escolha de terapias para superá-la, CORCORAN et al. (2013) demonstraram que a supressão da atividade de TORC1 prediz resposta aos inibidores de RAF e MEK no melanoma com mutação em BRAF. E que tal evento pode ser monitorado pela diminuição da fosforilação de S6 (pS6).

Linhagens celulares de melanoma sensíveis à ação de vemurafenibe demonstraram diminuição nos níveis de pS6 diferentemente das linhagens resistentes em que os níveis de tal marcador se mantiverem inalterados mesmo com aumento de dose da droga. Porém, a combinação de um inibidor catalítico de mTOR (AZD8055) e vemurafenibe foi eficaz tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, levando à indução de apoptose e à resposta tumoral. Além disto, a diminuição da expressão de pS6, em amostras de pacientes submetidos ao tratamento com vemurafenibe, associou-se com melhor sobrevida livre de progressão.

O monitoramento da expressão de pS6 conduzido por CORCORAN et al. (2013) foi realizado por biópsias por agulha fina antes e após o

tratamento com vemurafenibe. Tal método é invasivo, desconfortante e de alto custo para os pacientes. Portanto, a análise de CTCs representa uma importante alternativa às tradicionais biópsias para o monitoramento da resposta à terapia.

1.2.2 Células Tumorais Circulantes no melanoma

A maioria dos estudos que abordam o tema CTC no contexto do melanoma explora sua aplicabilidade no monitoramento da evolução da doença, entretanto não há um consenso geral sobre a relevância clínica da análise de CTCs neste tipo de câncer em grande parte pelos resultados conflitantes originados a partir de estudos que utilizam diferentes abordagens para o isolamento e caracterização destas células bem como pela falta de estudos clínicos prospectivos (KHOJA et al. 2015).

A detecção de CTCs por RT-PCR variou de 16 a 80% entre diferentes estudos que avaliaram pacientes com melanoma estadio I-III. E alguns destes estudos encontraram associação entre a presença de CTC e recorrência precoce, menor sobrevida global ou livre de doença (PROEBSTLE et al. 2000; BROWNBRIDGE et al. 2001; VOIT et al. 2005; FUSI et al. 2009; HOSHIMOTO et al. 2012).

O estudo de VOIT et al. (2005) foi o único que demonstrou associação entre CTCs e o desfecho clínico para o melanoma estadio I e II. Entretanto, este estudo apresentou um longo tempo de seguimento (6,3 anos) das pacientes com alta taxa de recaída (28%) para os pacientes com estadio II, se comparado com os demais estudos.

Os dados para utilização clínica da análise de CTC parecem ser mais promissores para o melanoma estadio III devido à condução de estudos clínicos como, por exemplo, *Sunbelt Melanoma Trial* e EORTC 18991(fase 3) (KHOJA et al. 2015). A detecção de CTCs pela presença dos transcritos de genes de 4 marcadores (tirosinase, Melan-A/Mart-1, MAGE 3 e GP-100) relacionados ao melanoma em pacientes com estadio III demonstrou que a positividade para mais de 1 marcador associou-se com pior sobrevida global ($p=0,006$) e livre de doença ($p=0,0012$) (SCOGGINS CT et al. 2006; SCOGGINS CR et al. 2007). Nesta mesma coorte de pacientes, o teste positivo apenas para tirosinase associou-se com menor sobrevida livre de doença ($p=0,0007$) se comparado à ausência de detecção dos marcadores.

FUSHI et al. (2009) demonstrou, por análise multivariada, que a presença de CTC aumenta o risco do aparecimento de metástases distantes (HR = 2,23; $p < 0,001$) em pacientes com melanoma estadio III. Neste estudo a presença de CTC foi definida pela detecção dos transcritos do gene que codifica para tirosinase e/ou Melan-A/Mart-1. HOSHIMOTO et al. (2012), por sua vez, demonstraram que a presença de 2 ou mais marcadores (MART-1, MAGE-A3 e GALNAc-T), em amostras de sangue de pacientes com melanoma estadio III, associou com pior sobrevida livre de doença metastática (HR = 2,3; $p=0,009$), sobrevida livre de recorrência (HR = 1,70; $p=0,046$) e sobrevida específica por melanoma (HR = 1,88; $p=0,043$), pela análise multivariada.

A análise de CTCs em pacientes com melanoma estadio IV evidenciou que a detecção de um ou mais marcadores relacionados a este

tipo de câncer (MART1, MAGEA3 e PAX3) associou-se com pior prognóstico a partir de amostras coletadas antes do início do tratamento dos pacientes e também daquelas obtidas no decorrer do mesmo (HASHIMOTO et al. 2012).

QUAGLINO et al. (2007), utilizando apenas a detecção de transcritos do gene que codifica para tirosinase como critério para presença de CTCs, demonstrou que a expressão deste marcador, antes e durante o curso do tratamento, prediz resposta ao tratamento e está associado à presença de novos sítios metastáticos e menor sobrevida livre de progressão da doença.

KHOJA et al. (2013), utilizando a plataforma *CellSearch*® que se baseia na expressão dos marcadores MCAM e MCSP para detecção de CTCs, mostrou que a presença 1 ou mais CTCs associou-se com pior prognóstico em pacientes com melanoma metastático e com estadios III inoperáveis. E que alterações na contagem de CTCs refletiram resposta ao tratamento evidenciada pelo uso de tomografia computadorizada. Outro estudo deste mesmo grupo de pesquisa isolou CTCs pelo método de filtração ISET® e procedeu a caracterização das mesmas utilizando um painel de marcadores para melanoma (Melan-A, MITF, MelCAM, HMW-MAA, CD271, MAGEC e S100). Os resultados demonstraram uma grande heterogeneidade intra- e interpacientes para os marcadores avaliados, sugerindo que plataformas dependentes de marcadores possam ser ineficazes na detecção das diferentes populações de CTCs em melanoma.

Vale ressaltar que, com exceção dos estudos que utilizaram as plataformas ISET® e *CellSearch*®, os demais foram desprovidos de uma etapa de isolamento de CTCs intactas, baseando-se apenas na presença de

transcritos de genes que codificam para marcadores relacionados ao melanoma, o que não significa que tais moléculas são definitivamente provenientes de CTCs. Além disto, o uso da plataforma *CellSearch*® no contexto do melanoma necessita de maior validação utilizando amostras de pacientes e embora o uso de métodos de filtração para o isolamento das CTCs seja justificado pela presença de células com grande tamanho em melanoma primário, outros estudos sugerem heterogeneidade de tamanho para CTCs em melanoma (OZKUMUR et al. 2013).

Recentemente, LUO et al. (2014) utilizaram o ^{HB}CTC-Chip para captura de CTCs de melanoma utilizando anticorpos contra marcadores de superfície específicos para o melanoma seguido pela caracterização das células por imunofluorescência. A técnica foi eficaz para a captura de CTCs a partir de modelo animal e pacientes com melanoma, demonstrando que a assinatura gênica das CTCs de modelo animal correlacionou-se com capacidade invasora e motilidade celular e que o número de CTCs diminuiu em pacientes que tiveram resposta satisfatória no tratamento com inibidores de BRAF. Entretanto, especificamente para as amostras de sangue de pacientes foram utilizados 12 anticorpos contra epítomos de superfície que demonstraram mínima reatividade para leucócitos e ainda um segundo coquetel com 4 anticorpos distintos (CSPG4, MCAM, TYRP1, α -SMA) para caracterização das células capturadas.

Tal cenário reflete a necessidade de desenvolvimento de tecnologias mais eficazes e menos dispendiosas para detecção de CTCs justificando a aplicabilidade na rotina clínica. Neste contexto, o uso do CTC-ichip

(OZKUMUR et al. 2013) parece uma alternativa promissora, podendo ainda contribuir para avanços quanto à contribuição da análise de CTCs no contexto da biologia e terapia do melanoma.

1.3 TECNOLOGIAS PARA O ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CTCs

A análise de CTCs representa uma importante ferramenta para o entendimento da disseminação tumoral hematogênica. Entretanto, uma série de fatores biofísicos e biológicos são considerados obstáculos a serem transpostos para detecção e isolamento de populações de CTCs clinicamente relevantes, como o tamanho das CTCs (individuais e em grupo) em relação à dimensão dos vasos sanguíneos, mascaramento de CTCs por plaquetas ou fatores de coagulação, presença de células epiteliais circulantes benignas, heterogeneidade entre CTCs, a possibilidade de que CTCs com alto potencial metastático sejam células tronco tumorais e o fenótipo de TEM adquirido pelas CTCs no processo de disseminação (PLAKS et al. 2013).

As tecnologias utilizadas para identificação e caracterização de CTCs baseiam-se nas propriedades biológicas (por exemplo: expressão de EpCAM) e/ou físicas das células (tamanho) (**Quadro 3**).

No presente estudo, utilizamos a plataforma ISET e o CTC-ichip para o isolamento de CTCs geradas por tumores de mama e melanoma, respectivamente.

A plataforma *Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells* (ISET) (*Rarecells Diagnostics*, Paris, França) permite o isolamento, independente de um marcador específico, e a caracterização imunomorfológica e molecular das CTCs em pacientes com carcinoma. Tal método é baseado na filtração a vácuo do sangue através de uma membrana de policarbonato que contém 10 *spots* cilíndricos com poros de 8 μm de diâmetro. As células tumorais podem ser isoladas por filtração por apresentarem uma dimensão maior se comparadas aos leucócitos (diâmetro médio de 8 a 11 μm) (VONA et al. 2000) (**Figura 8A**).

Quadro 3 - Tecnologias para isolamento e detecção de CTCs.

Tecnologia	Isolamento	Detecção	Vantagens/Desvantagens
CellSearch®	Pérolas magnéticas revestidas com anti-EpCAM	ICQ para CKs, CD45 e DAPI	Aprovada pelo FDA para o câncer de mama avançado, próstata e colorretal; isolamento apenas de células EpCAM+
MagSweeper	Pérolas magnéticas revestida com antiEpCAM/varredura magnética	Visualização microscópica	Células viáveis podem ser isoladas; isolamento apenas de células EpCAM+
GILUPI cell colector®	Coletor revestido com anti-EpCAM	ICQ para CKs, EpCAM e DAPI	Coleta de CTCs <i>in vivo</i> ; permite análise molecular
CTC chip e Herringbone chip	Dispositivos microfluídicos revestidos com anti-EpCAM	ICQ para CKs (e/ou marcadores tumor-específicos), CD45 e DAPI	Alta eficiência na captura de células; isolamento apenas de células EpCAM+
CTC ichip®	Dispositivo microfluídico combinado à captura por pérolas magnéticas	ICQ para CKs (e/ou marcadores tumor-específicos), CD45 e DAPI; e/ou análise molecular	Possibilidade de uso de módulo dependente (EpCAM) ou independente (CD45) de marcador
ISOFLUX	Pérolas magnéticas revestidas com anti-EpCAM, anti-EGFR, anti-HER2 e anti-N-caderina/fluxo microfluídico	ICQ para CKs, CD45 e Hoechst	Permite análise molecular
AdnaTest	Pérolas magnéticas revestidas com anti-EpCAM e anti-MUC1	RT-PCR para painel de genes (HER2, CA15.3, GA7333-2)	Lise celular é necessária, evitando contagem das células e outras análises
ISSET®	Filtração baseada no tamanho da célula	Citomorfolgia, ICQ	Isolamento de células EpCAM+ e EpCAM-; perda de CTCs de tamanho inferior a 8µm
Screencell®	Filtração baseada no tamanho da célula	Citomorfolgia, ICQ	Isolamento de células EpCAM+ e EpCAM-; perda de CTCs de tamanho inferior a 7,5µm; possui dispositivos adicionais que permitem cultivo de células e análise molecular
EPISPOT	Abordagem imunomagnética (depleção de células CD45+ e seleção de células CXCR4+) e cultivo em placas revestidas com anticorpos que reconhecem proteínas secretadas pelas células (MUC1, anti-PSA, anti-CK19 e/ou EGFR)	Imunofluorescência utilizando anticorpos secundários contra os anticorpos primários presentes nas placas de cultivo	Detecção de células viáveis; depende de secreção ativa de proteínas pelas células e não há possibilidade de isolamento das células.

Fonte: ALIX-PANABIÈRES e PANTEL (2014); KREBS et al (2014); DOLFUS et al. (2015)

O critério do tamanho adotado pela plataforma ISET, quando comparado ao de outras tecnologias, é tido como uma limitação pela possibilidade de perda de CTCs que possuem tamanho menor que 8 μm , pois o tamanho de CTCs isoladas pelo sistema *CellSearch*[®], única plataforma aprovada pelo FDA, variou de 4 a 30 μm (ALLARD et al. 2004). Por outro lado, o comparativo entre as duas tecnologias mostrou que um maior número de CTCs foi obtido pelo ISET para diferentes tipos tumorais. A justificativa para tal achado é que a detecção de células pelo *CellSearch*[®] é dependente de EpCAM, cuja expressão é modulada durante o processo de TEM, gerando CTCs com baixa ou ausência da expressão deste marcador (FARACE et al. 2011; HOFMAN et al. 2011; KREBS et al. 2012).

A ocorrência de resultados falsos positivos por métodos de filtração é associada à ausência de marcadores durante o isolamento das células. Entretanto, um estudo citopatológico, multicêntrico e cego, ao analisar amostras de sangue de indivíduos saudáveis e de 808 pacientes com doenças malignas e benignas, detectaram CTCs-*like* isoladas pelo ISET em apenas 10 (5,3%) dos 190 pacientes com doenças benignas, sendo os casos referentes a adenomas de tireoide (n=7) e de paratireoide (n=3), cujos diagnósticos também são desafiadores por citopatologia utilizando FNA. Além disso, células consideradas como circulantes não hematológicas foram encontradas em 11,1% e 48,9% de pacientes com patologias benignas e malignas, respectivamente ($p < 0,001$). E dentre tais células aquelas que apresentaram características malignas foram observadas em 5,3% e 43,1%

de pacientes com doenças benignas e malignas, respectivamente (HOFMAN et al. 2011)

Avanços tecnológicos recentes, especialmente com relação à aplicação da teoria microfluídica, permitem um isolamento mais eficiente de CTCs, a partir de amostra de sangue de pacientes com diferentes tipos de cânceres, com aplicabilidade nos âmbitos molecular e funcional (STOTT et al. 2010a e b; MIYAMOTO et al. 2012, 2015; YU et al. 2011, 2012, 2013, 2014; ACETO et al. 2014; LUO et al. 2014).

O CTC-iChip foi recentemente desenvolvido e consiste de 3 tecnologias microfluídicas em um único dispositivo, além de operar tanto pelo módulo dependente de um marcador tumoral (^{pos}CTC-iChip) (por exemplo, EpCAM, EGFR) quanto pelo módulo independente de marcador tumoral (^{neg}CTC-iChip) que permite a exclusão de leucócitos pelo uso de imunomarcagem magnética contra os antígenos CD45 (antígeno leucocitário comum), CD66b (antígeno presente na superfície de grânulócitos) e CD16 (receptor de baixa afinidade da porção Fc de anticorpos IgG expressos em células *natural killer*, neutrófilos, monócitos e macrófagos) (OZKUMUR et al. 2013; KARABACAK et al. 2014).

Após a incubação das amostras de sangue total com pérolas magnéticas, o primeiro estágio dentro do CTC-iChip é baseado no princípio do deslocamento lateral de partículas (*deterministic lateral displacement/DLD*) (HUANG et al. 2004), uma série de colunas estrategicamente dimensionadas e posicionadas são usadas para o direcionamento e separação de células baseadas em sua deformidade e

tamanho permitindo, assim, a eficiente remoção de hemácias, plaquetas e proteínas, enquanto que as células nucleadas (CTCs e leucócitos magneticamente marcados) são direcionadas ao segundo estágio do dispositivo (canal de fluxo inercial/*inertial focusing channel*) que promove o alinhamento de todas as células em um único fluxo. Este posicionamento preciso das células culmina com a etapa final do processo: magnetoforese microfluídica. Nesta última etapa, uma força magnética é aplicada de tal modo que todas as células marcadas com pérolas magnéticas (por exemplo, leucócitos) são atraídas para uma corrente de resíduos, enquanto as CTCs (células não marcadas) são coletadas em um tubo para posterior análise ou para o estabelecimento de cultura celular (OZKUMUR et al. 2013; KARABACAK et al. 2014) (**Figura 8B-C**).

O CTC-iChip tem a capacidade de processar grandes volumes de sangue total (8mL/ hora), com alto rendimento (10^7 células/s) e grande eficiência de captura (97%). A comparação entre o ^{pos}CTC-iChip e o sistema *CellSearch*® demonstrou que o dispositivo microfluídico foi significativamente mais sensível para amostras com baixo número de CTCs (<30 CTC / 7,5 mL), indicando que a subpopulação de CTCs com baixa expressão de EpCAM foi perdida ao se utilizar o *CellSearch*® (OZKUMUR et al. 2013).

Entretanto, otimizações ainda são necessárias para que a tecnologia CTC-iChip seja implementada na rotina clínica incluindo melhorias na pureza do produto (reduzir a contaminação com elementos do sangue) para facilitar a análise molecular das células e no volume total de sangue processado para permitir detecção precoce do câncer (OZKUMUR et al. 2013).

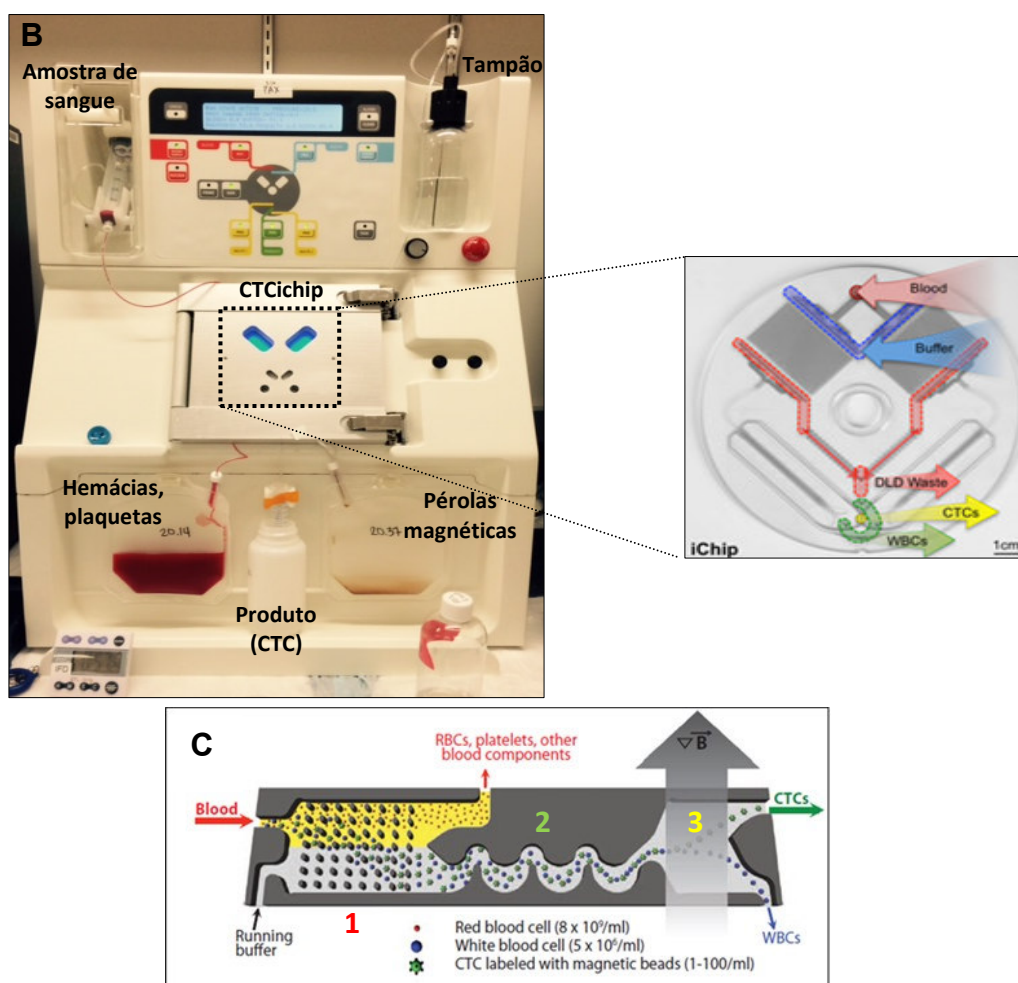
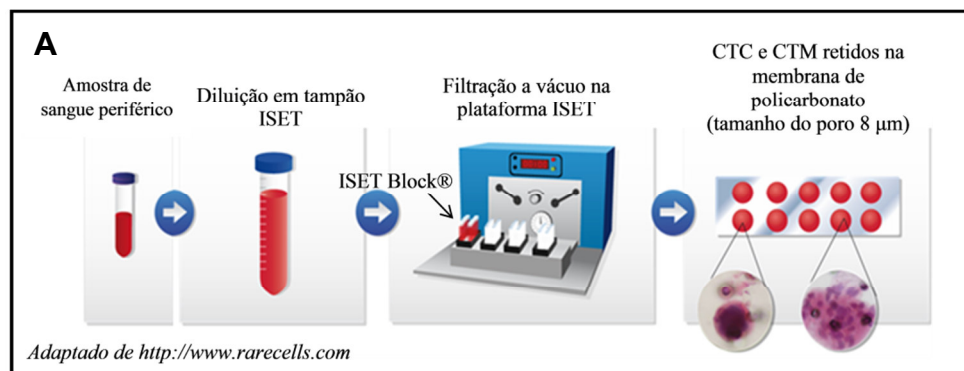


Figure 8 - Exemplos de tecnologias para isolamento e caracterização de CTCs. A: ISET (isolamento de células pela filtração de amostra de sangue) B-C: CTC-iChip (tecnologia microfluídica). B: Plataforma de processamento de amostra de sangue utilizando o CTC-iChip. O CTC-iChip é composto por 3 dispositivos microfluídicos (módulo 1, 2 e 3) C: Esquema do funcionamento do CTC-iChip. Módulo 1: Deslocamento Lateral de Partículas (*deterministic lateral displacement/DLD*). Módulo 2: Canal de Fluxo Inercial/*inertial focusing channel*. Módulo 3: Magnetoforese microfluídica (OZKUMUR et al. 2013; KARABACAK et al. 2014).

Um desafio com relação à caracterização mais complexa de CTCs é a análise de múltiplos alvos por imunomarcacão. Isto ocorre pelo número limitado de marcadores que podem ser avaliados simultaneamente em uma única célula ou em amostras de tecido. Por essa razão, o emprego de uma nova abordagem de imagem microscópica denominada imagem multiespectral (*Multi-spectral Imaging*, ou MSI) utilizando o método de amplificação de sinal por tiramida (*Tyramide Signal Amplification*, TSA) apresenta um grande potencial para abordar esta limitação após o isolamento de CTCs bem como para a análise de vários marcadores em uma única amostra de tecido.

A técnica de imagem multiespectral permite que o espectro de cada fluoróforo utilizado seja separado, permitindo a visualização e quantificação de até oito fluoróforos diferentes em uma única célula ou tecido. Desta forma, a autofluorescência de células e tecidos também pode ser definida evitando assim *crosstalk*. Outras vantagens da MSI incluem a capacidade para rastrear centenas de células individuais a uma ampliação elevada (60X) em menos de uma hora e, quando combinado com um programas automatizados para a segmentação de tecidos e células, MSI pode permitir a localização e quantificação automatizada de marcadores diferentes em amostras de tecidos e células individuais (STACK et al. 2014).

A combinação de TSA com a técnica MSI se dá pelo fato de que este método confere altos níveis de intensidade de fluorescência até mesmo a antígenos que são pouco ou moderadamente expressos ou que tiveram as expressões comprometidas por condições subótimas de fixação das

amostras. Isto se dá pela ligação covalente e altamente específica da molécula de tiramida ao epítipo alvo de um modo altamente específico (BOBROW et al. 1992). TSA pode ser aplicada à imunistoquímica convencional (IHC), imunofluorescência (IF) e hibridização *in situ* (ISH) por amplificar tanto sinal cromogênico como imunofluorescente resultando num significativo aumento da sensibilidade e sem aumento de *background*, uma vez que proporciona o aumento das diluições de anticorpo primário a serem utilizados (ADAMS 1992; VAN HEUSDEN et al. 1997).

A molécula de tiramida é um composto fenólico que pode ser conjugado com diferentes tipos de fluoróforos. Este composto quando ativado pela enzima *horseradish peroxidase* (HRP) na presença de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é convertido em uma espécie química altamente reativa que rapidamente forma ligações covalentes com regiões ricas em elétrons (predominantemente resíduos de tirosina) (ADAMS 1992; BOBROW et al. 1992; SHINDLER e ROTH 1996). **(Figura 9 A-B).**

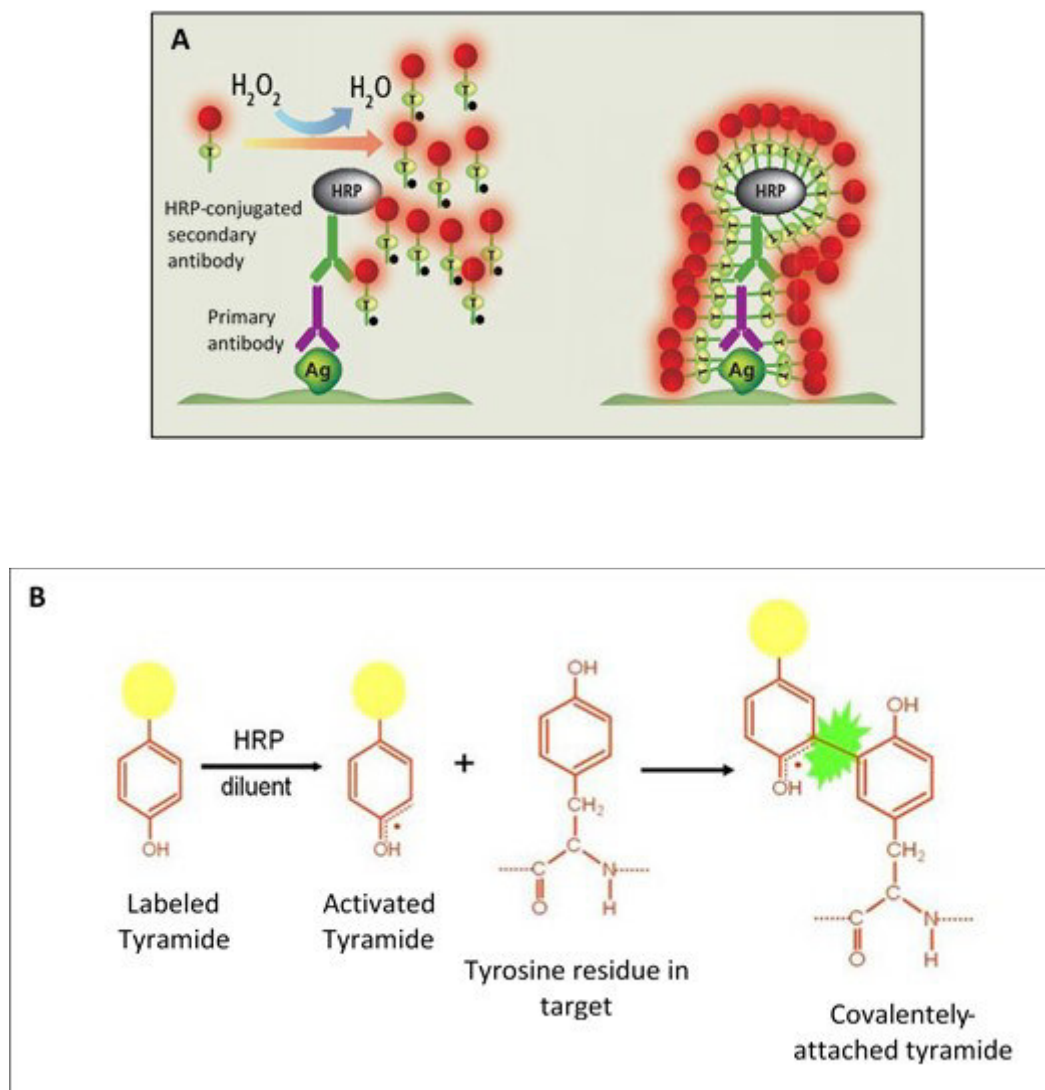


Figura 9 – Reação de amplificação de sinal por tiramida. A: Etapas da reação de amplificação por tiramida. B: Ligação covalente, mediada por HRP, da molécula de tiramida (conjugada com fluoróforo) a resíduos de tirosina do antígeno alvo. Ag: antígeno. HRP = *horseradish peroxidase* T: tiramida conjugada com fluoróforo

A aplicação da técnica de múltiplo-imunofluorescência utilizando TSA e MSI requer a elaboração de uma biblioteca espectral composta pelo espectro individual de cada fluoróforo utilizado na reação. Assim, deve ser realizada a otimização de cada marcador alvo de estudo em uma reação de imunofluorescência individual para então se obter a biblioteca espectral e dar

prosseguimento à múltiplo-imunofluorescência e sua análise. Este método oferece a vantagem de se utilizar anticorpos primários da mesma espécie sem ocorrer reatividade cruzada, adicionando à execução da técnica o tratamento por microondas que remove tanto o anticorpo primário quanto o complexo anticorpo secundário-HRP, uma vez que a irradiação é capaz de promover a quebra de ligações não covalentes, mas não as covalentes, permitindo assim que o reagente TSA permaneça ligado covalentemente ao epítipo alvo e o prosseguimento das reações sequenciais (STACK et al. 2014).

A técnica de múltiplo-imunofluorescência tem sido empregada com sucesso em amostra de tecidos (TÓTH e MEZEY 2007; GERDES et al. 2013; MITCHELL et al. 2014). STACK et al. (2014) obtiveram sucesso ao realizarem reações com 5 e 6 marcadores em uma mesma amostra tecidual. E a incorporação desta técnica no contexto de CTCs proporcionaria um método reprodutível para análise quantitativa e qualitativa dessas células revelando novos aspectos da sua heterogeneidade, identificação de uma subpopulação de células potencialmente metastática, bem como as alterações dinâmicas em vias de sinalização como resposta ao tratamento levando à concepção de novas abordagens terapêuticas combinatória.

Portanto, propusemos para este estudo o desenvolvimento e aplicação de uma técnica de múltiplo-imunofluorescência utilizando TSA e MSI para ser aplicada a células e tecidos, permitindo a detecção/caracterização de CTCs e a análise simultânea da expressão de diferentes marcadores em uma única célula ou amostra de tecido.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de marcadores da TEM e do metabolismo celular em CTCs e amostras de tecidos de pacientes com câncer de mama. E desenvolver um método de múltiplo-imunofluorescência para detecção de CTCs em melanoma com mutação BRAF e avaliação simultânea de marcadores (pERK e pS6) relacionados à aquisição de resistência a drogas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o câncer de mama:

- Isolar e quantificar CTCs a partir de amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama metastático e não metastático utilizando a plataforma ISET.
- Avaliar a expressão de marcadores do processo de TEM (CKs e FOXC1) e do metabolismo (PGC-1a, COXIV, MCT4) em CTCs e amostras de tecidos (tumor primário e metástases) das pacientes com câncer de mama.
- Verificar se há associação estatística entre a expressão dos marcadores alvos do estudo e os dados clínico-patológicos das pacientes.

- Avaliar a concordância da expressão dos marcadores propostos entre as amostras de CTCs e tecidos.

Para o melanoma:

- Isolar CTCs a partir de amostras de sangue utilizando a tecnologia microfluídica (CTC-iChip).
- Combinar as tecnologias de MSI e TSA para avaliação simultânea em CTCs da expressão de marcadores específicos para o melanoma, CD45 (controle negativo), DAPI e de marcadores (pERK e pS6) relacionados à resistência ao inibidores da via MAPK.
- Validar a metodologia proposta em modelo animal de melanoma para detecção de mudanças farmacodinâmicas na expressão de pERK e pS6 em CTCs induzidas por inibidor da via MAPK.
- Aplicar a metodologia proposta para o isolamento e caracterização de CTCs a partir de amostras de sangue de uma pequena coorte de pacientes com melanoma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares de mama MCF7, BT474, SKBR3 e MDA-MB231 foram cultivadas em meio DMEM F12 (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) e 1% antibiótico-antimicótico (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). As células foram mantidas a 37° C e 5%CO₂.

As linhagens de CTCs denominadas BRX68 e BRX142 foram gentilmente cedidas pelos grupos dos Drs. Shyamala Maheswaran e Daniel Haber. As células foram crescidas em placas de baixa aderência (Corning) contendo meio RPMI-1640 suplementada com EGF(20ng/mL) e FGF básico (20ng/mL), B27 (10mL) e antibiótico-antimicótico 1X (*Life Technologies*). As células foram incubadas em estufas de 37° C com 5%CO₂ e 4% de O₂ (YU et al. 2014).

Para o estudo do melanoma foram utilizadas a linhagem metastática 113-6/4L (CRUZ-MUNOZ et al. 2008) e a linhagem de câncer de pulmão, PC9, como controle negativo dos ensaios. Ambas foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 10% de SFB (*Life Technologies*) e 1% de antibiótico (solução de penicilina-estreptomicina/*Life Technologies*) a 37°C e 5% CO₂. As células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB e 1% de antibiótico e foram mantidas a 37°C e 5% CO₂.

3.2 CELL SPIKING

Tal metodologia consiste no enriquecimento de sangue periférico de indivíduo saudável com células de linhagens tumorais (ALLARD et al. 2004). Esta abordagem foi adotada para se avaliar a eficiência da plataforma ISET, padronização da técnica de imunocitoquímica na membrana do ISET e de imunofluorescência utilizando o CTC-ichip para o isolamento das células.

Após tripsinização, procedeu-se a contagem de 200 células e as mesmas foram acrescentadas a 10mL de sangue periférico de indivíduo saudável. Em seguida, procedeu-se a filtração a vácuo do sangue na plataforma ISET e os *spots* da membrana foram submetidos à técnica de imunocitoquímica para análise das células.

Para os ensaios de *cell spiking* utilizando o CTC-ichip, 0,5 mL da solução estoque de células (2000células/0,5 mL) foi adicionado ao sangue de indivíduos saudáveis e em seguida procedeu-se o processamento da amostra.

3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para o preparo dos extratos proteicos a partir de linhagens de câncer de mama (1×10^5 células) foram cultivadas nas condições já descritas anteriormente e após confluência de 70-80% foram lavadas 3X com PBS1X, Em seguida, adicionou-se tampão de lise proteica (tampão RIPA: 150 mM NaCl 1,0% NP-40 ou Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio 1% SDS , 50

mM Tris, pH 8,0) acrescido de inibidores de protease (*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche/10x*) (em presença de gelo). Procedeu-se centrifugação a 14000rpm, 4°C, por 15 minutos e a partir dos sobrenadantes obtidos, foi realizada a quantificação proteica utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay® (Método de Bradford).

As células da linhagem de melanoma 113-6/4L, foram lisadas sob ação do tampão MLB (*magnesium-containing lysis buffer*) (20 mM TRIS/pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 10% glycerol; 10 mM MgCl₂, 0,25%) com inibidores de protease e fosfatase (*halt protease and phosphatase inhibitor cocktail; Thermo Scientific*). A concentração de proteínas foi determinada pelo método BCA (*Thermo Scientific*).

3.4 WESTERN BLOT

Um total de 20µg de proteína obtido para cada linhagem de câncer de mama foi submetida à desnaturação pela adição do tampão Laemmli 4X (250mM Tris-HCl, pH 6,8, 40% Glicerol, 0,14mM SDS 10% β-Mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol). As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e mantidas em gelo até serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose foi feita a 100V por 1 hora, seguida de bloqueio com 5% leite desnatado em TBS-T por 1 hora e incubação a 4°C *overnight* com anticorpo primário desejado. Após incubação com anticorpo secundário 1:3.000 (*System Biosciences, Mountain View, CA, EUA*), as membranas foram reveladas com ECL Prime (*GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA*). A

expressão da proteína alfa-tubulina foi utilizada como controle do ensaio. A densitometria das bandas obtidas foi estimada utilizando o *software* ImageJ, sendo a expressão das proteína alvos de estudo normalizada pela expressão da alfa-tubulina e o valor resultante expresso em unidades arbitárias.

As amostras de linhagem de melanoma foram submetidas a eletroferese em gel e transferidas para membrana de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) utilizando o sistema *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad). A detecção das bandas foi realizada utilizando os reagentes *SuperSignal West Pico Peroxide reagent* (Thermo Scientific) ou *Western Lightning® Plus-ECL*(Perkin-Elmer) após incubação das membranas com os anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com HRP (*Cell Signaling*). A expressão de GAPDH foi utilizada como controle da reação. As informações sobre os anticorpos primários utilizados para os ensaios de *Western Blot* estão reunidas no **Quadro 4**.

Quadro 4 - Anticorpos utilizados para os ensaios de *Western blot*.

Antígeno	Clone	Fabricante	Diluição/Concentração
CK8	35βH11	<i>Dako</i>	1:1000
PGC-1a	4C1.3	<i>EMD Millipore</i>	1:500
FOXC1	-	<i>LifeSpan BioSciences</i>	0,5µg/mL
COXIV	3E11	<i>Cell Signaling</i>	1:500
SLC16A3 (MCT4)	-	<i>Abgent</i>	1:500
pERK ^{T202/Y204}	D13.14.4E	<i>Cell Signaling</i>	1:2000
pS6 ^{S240/S244}	D68F8	<i>Cell Signaling</i>	1:1000
S6	54D2	<i>Cell Signaling</i>	1:1000
pAkt ^{S473}	D9E	<i>Cell Signaling</i>	1:2000
CC3 ^{Asp175}	-	<i>Cell Signaling</i>	1:1000
DUSP6	EPR129Y	<i>Abcam</i>	1:500
SPRY2	SQ-5	<i>Santa Cruz</i>	1:400
Alfa-tubulina	DM1A	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:20000
GAPDH	6C5	<i>Millipore</i>	1:20000

3.5 PACIENTES E ESPÉCIMES ANATOMOPATOLÓGICOS

O estudo do câncer de mama contou com a participação voluntária de pacientes do AC Camargo Cancer Center após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (Protocolo 1655/12) (**Anexo 1**). Os critérios de inclusão das pacientes foram: pacientes do sexo feminino, diagnosticadas com carcinoma ductal de mama invasor (CDI), com e sem presença de metástases e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**). Já os critérios de exclusão foram: pacientes do sexo masculino com câncer de mama, pacientes do sexo feminino cujo diagnóstico anátomo-patológico apontou carcinoma de mama lobular. Além da não concordância em assinar o TCLE e aqueles casos que apresentaram falta de informações clínicas ou que não dispuserem de material suficiente para análise nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center.

A revisão das lâminas correspondentes às pacientes da nossa casuística e que estavam disponíveis nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo *Cancer Center* foi realizada por um patologista do mesmo departamento. Após a revisão, foram selecionados os blocos de parafina disponíveis no Banco de Tumores do Departamento de Anatomia Patológica contendo fragmentos tumorais da biópsia ou peça operatória, correspondentes a cada lâmina escolhida.

Para o estudo do melanoma, foram selecionados indivíduos saudáveis bem como pacientes do sexo feminino e masculino

diagnosticados com melanoma e submetidos a tratamento no *Massachusetts General Hospital* (MGH) (Boston, MA). As coletas das amostras de sangue foram realizadas mediante assinatura do termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética do MGH (protocolo IRB 05-300).

3.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CTCs PARA O ESTUDO DO CÂNCER DE MAMA

3.6.1 Isolamento de CTCs pelo ISET

Para o processamento na plataforma ISET, a amostra de sangue periférico (8 -10mL aproximadamente) foi coletada em tubo contendo EDTA. E diluída na proporção 1:10 em tampão de lise de hemácias (*ISET Buffer® - Rarecells Diagnostics*, Paris, France) acrescido de formaldeído 37% (2% do volume total). Incubou-se a solução por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação e, em seguida, a solução foi distribuída no *ISET Block®* que contém 6 compartimentos e a membrana de policarbonato com 10 *spots*: 1 compartimento com 5 *spots* que comporta um volume total de 50mL (5mL de sangue diluído 1/10 com *ISET Buffer®*) e 5 compartimentos, com 1 *spot* cada, que comportam um volume final de 10mL (1mL de sangue diluído 1/10 com *ISET Buffer®*). Procedeu-se a filtração a vácuo (-10kPa) na plataforma ISET e, ao término do procedimento, a membrana foi desacoplada do *ISET Block®*, deixando-a secar à temperatura ambiente. A membrana foi então estocada a -20°C, devidamente protegida da luz, para posterior análise.

3.6.2 Imunocitoquímica Por Dupla Marcação

A imunocitoquímica por dupla marcação utilizando as membranas do ISET foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pela *Rarecells Diagnostics* (Paris, França), fabricante de tal plataforma.

Os *spots* da membrana foram individualizados e colocados em placas de 24 poços. Em seguida, foram hidratadas com 70µL de tampão TBS (*Tris-buffered saline*) 1X (Tris HCl 0,05 M e NaCl 0,15 M) por 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 70µL de TBS 1X -0,2% Triton X-100, deixando à temperatura ambiente por 5 minutos para permeabilização das células. Em seguida, os *spots* foram lavados com TBS1X. Adicionou-se peróxido de hidrogênio 3% para bloqueio da peroxidase endógena deixando à temperatura ambiente, protegidos da luz, por 15 minutos. Os *spots* foram lavados com TBS1X e incubados com 70µL do anticorpo primário desejado (a diluição do anticorpo deve ser feita em solução de TBS1X contendo 10% de soro fetal bovino) por 1 hora à temperatura ambiente. Os *spots* foram lavados com TBS1X e incubados com 70µL do anticorpo secundário conjugado com HRP (Dual Link System HRP - Dako®) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Os *spots* foram lavados com TBS1X e incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente, com 70 µL do cromógeno diaminobenzidina (DAB) (SIGMAFAST® DAB *tablets*). Em seguida, os *spots* foram lavados com água destilada e incubados por 1 hora à temperatura ambiente com 70µL do segundo anticorpo primário. Os *spots* foram lavados com TBS1X e incubados com 70µL do anticorpo secundário conjugados com HRP durante 30 minutos e à temperatura ambiente. Os *spots* foram lavados

com TBS1X e incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente, com 70 µL do cromógeno *Permanent Red* [*Permanent Red Chromogen* – kit EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse, Dako®]. Os *spots* foram então lavados com água destilada e contracorados com hematoxilina de Harris, por 30 segundos. As informações sobre os anticorpos utilizados para imunocitoquímica por dupla marcação estão descritas no **Quadro 5**.

As células isoladas foram consideradas CTCs quando negativas para CD45, com núcleos hipercromáticos e forma irregular, o tamanho nuclear ≥ 12 µm, proporção núcleo/ citoplasma de mais de 50%, e/ou em presença de aglomerados de células CD45-negativas com três ou mais núcleos distinguíveis [Microêmbolos Tumorais Circulantes (CTM)] (KREBS et al. 2012). Ressaltando, que de acordo com a morfologia, as células positivas para pan-CK e negativas para CD45 também foram contabilizadas como CTCs considerando-se a heterogeneidade apresentada por estas células com relação a marcadores epiteliais e mesenquimais (HOU et al. 2011; KHOJA et al. 2012; KREBS et al. 2012; YU et al. 2013).

Para a contagem do número de CTCs nos baseamos na estratégia descrita por KREBS et al. (2012). Neste estudo, para determinar o número mínimo de *spots* a serem analisados para uma contagem robusta e representativa de CTC/mL de sangue, 10mL de sangue periférico de doador saudável foi enriquecido com 200 células NCI-H1299 (linhagem de câncer de pulmão humano) e as amostras processadas pela plataforma ISET. A análise de 4 ou mais *spots* forneceu uma estimativa mais precisa da média de células recuperadas. A partir disto, cada paciente teve 4 *spots*

submetidos à imunocitoquímica por dupla marcação (anti-CD45 e anti-pan-CK) para contagem de CTC e a média de CTCs encontrada foi extrapolada para o volume total de sangue utilizado.

Quadro 5 - Anticorpos utilizados para imunocitoquímica por dupla marcação.

Antígeno	Clone	Fabricante	Diluição/Concentração
CD45	2B11+PD7/26	<i>Dako</i>	1:100
pan-CK	AE1/AE3	<i>Dako</i>	1:1000
PGC-1a	4C1.3	<i>EMD Millipore</i>	1:100
FOXC1	-	<i>LifeSpan BioSciences</i>	5µg/mL
COXIV	3E11	<i>Cell Signaling</i>	1:500
SLC16A3 (MCT4)	-	<i>Abgent</i>	1:50

3.7 MÚLTIPLO-IMUNOFLUORESCÊNCIA EM LINHAGENS DE CTCs e AMOSTRAS DE TECIDOS DE CÂNCER DE MAMA

3.7.1 Preparo das lâminas para imunofluorescência

Um total de 10^3 células de BRX68 e BRX142 foi utilizado para o preparo das lâminas. Após centrifugação (500g, 5 minutos), o *pellet* obtido foi ressuspensionado em tampão PBS 1X. As células em suspensão foram submetidas à citocentrifugação (2000rpm, 5 minutos) (*Megafunnel Cytospin, Thermo Scientific*), fixadas às lâminas com 2% paraformaldeído e mantidas a -80° C. Já os cortes histológicos foram colocados em lâminas com carga elétrica que, em seguida, foram mantidas a 4° C.

3.7.2 Construção da biblioteca espectral

Para a construção da biblioteca espectral foram realizadas reações destinando uma lâmina para cada fluoróforo utilizado e para a marcação com DAPI, separadamente (**Anexo 3**).

As lâminas contendo linhagens de células tumorais foram lavadas com TBST 1X (*Tris-Buffered Saline +1% TweenTM 20*) (2X por 1 minuto). E em seguida incubadas com Triton X-100 (10 mM) por 10 minutos e novamente lavadas com TBST 1X (*Tris-Buffered Saline +1% TweenTM 20*) (2X por 1 minuto). A desparafinização dos cortes histológicos foi realizada por incubação das lâminas em xilol (3 trocas de 10 minutos cada) que em seguida foram passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100% e 95%; trocas de 5 minutos cada e brevemente em 70%;), lavadas em água destilada, incubadas por 10 minutos em formalina neutra tamponada 10% e novamente lavadas em água destilada.

Tanto as lâminas contendo células quanto tecidos foram então submetidas à recuperação antigênica (RA) em tampão citrato (pH 6,0) utilizando forno microondas de 1000W. As condições utilizadas para células foram: 1 ciclo de 45 segundos em potência máxima, seguido de 1 ciclo de 2 minutos em potência de 50%. Já os tecidos histológicos foram submetidos a 1 ciclo de 45 segundos em potência máxima, seguido de 1 ciclo de 15 minutos em potência de 20%. A etapa de bloqueio de proteínas inespecíficas foi feita com solução de BSA 0,1%. Os anticorpos primários (**Quadro 6**) foram incubados durante 1 hora em câmara úmida em temperatura ambiente, com exceção daqueles contra os marcadores tumorais que foram

incubados *overnight*. Em sequência as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários [anti-coelho ou anti-camundongo conjugados com HRP; *SuperPicture Polymer Detection HRP kit; Life Technologies*/10 minutos de incubação] e com os reagentes de amplificação de sinal por tiramida/TSA (**Quadro 7**) (1:50 em *Amplification Diluent; Perkin Elmer*/10 minutos de incubação e 1:500 em *Amplification Diluent* para o reagente TSA incubado *overnight*). Os cortes foram lavados em TBST 1X (2X, 3 minutos) após incubações com os anticorpos primários, secundários e reagentes de amplificação de sinal por tiramida. As lâminas foram incubadas com DAPI (1:2000, *Life Technologies*) para a visualização do núcleo das células e a montagem das lâminas foi feita com o uso de Fluoromount-G (*SouthernBiotech*).

Quadro 6 - Anticorpos utilizados para múltiplo-imunofluorescência no câncer de mama.

Antígeno	Clone	Espécie	Fabricante	Clonalidade	Concentração	Localização
RE	6F11	Camundongo	<i>NovoCastra</i>	Monoclonal	1µg/mL	Núcleo
HER2	29D8	Coelho	<i>Cell</i>	Monoclonal	1µg/mL	Membrana
EGFR*	-	Camundongo	<i>Cell</i>	Monoclonal	1µg/mL	Membrana
pan-CK	AE1/AE3	Camundongo	<i>Dako</i>	Monoclonal	1µg/mL	Citoplasma
FOXC1	-	Coelho	<i>LifeSpan</i>	Policlonal	1µg/mL	Núcleo
PGC-1a	4C1.3	Camundongo	<i>EMD</i>	Monoclonal	1µg/mL	Núcleo**
COXIV	3E11	Coelho	<i>Cell</i>	Policlonal	1µg/mL	Citoplasma
MCT4	-	Coelho	<i>Abgent</i>	Policlonal	1µg/mL	Membrana [#]

* Anticorpo customizado

**O anticorpo também reconhece a variante de *splicing*, NT-PGC1a, que é encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo (CHANG et al. 2010).

[#]A proteína MCT4/SLC16A3 é transmembrana e, segundo o fabricante, o anticorpo utilizado reconhece a porção C-terminal que é citoplasmática.

Quadro 7 - Reagentes de amplificação de sinal por tiramida.

Fluoróforo	Fabricante	Ex/Em(nm)	Diluição
AF488	<i>Life Technologies</i>	490/525	1:50
FITC	<i>Perkin Elmer</i>	494/517	1:50
Cy3	<i>Perkin Elmer</i>	550/570	1:50
AF594	<i>Life Technologies</i>	591/617	1:50
Cy5	<i>Perkin Elmer</i>	648/667	1:50/1:500*

Ex: excitação; Em: emissão. *Incubação *overnight* (para tecidos)

3.7.3 Múltiplo-imunofluorescência

Para os marcadores da TEM utilizamos um protocolo de múltiplo-imunofluorescência empregando 4 cores: marcador tumoral em TSA-FITC, FOXC1 em TSA-Cy3, pan-CK em TSA-Cy5 e DAPI. Os marcadores tumorais foram utilizados de acordo com o diagnóstico de cada caso incluído no estudo: RE para os casos luminais A e B (HER2 negativo), HER2 para os casos superexpressores de HER2 ou luminal B/HER2 positivo e EGFR para os casos triplo negativo. Para a análise dos marcadores metabólicos empregamos 5 cores: PGC1-a em TSA-Cy3, COXIV em TSA-AF594, MCT4 em TSA-Cy5. Incluímos ainda pan-CK, como marcador tumoral, em TSA-FITC e DAPI para coloração do núcleo.

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito para o preparo da biblioteca espectral com etapas adicionais já que em uma mesma lâmina foram utilizados diferentes anticorpos primários, secundários e reagentes TSA. A etapa de bloqueio com solução de BSA 0,1% foi repetida antes de cada incubação com anticorpo primário. Já a recuperação antigênica em microondas foi realizada após cada incubação com o reagente TSA. As incubações com os anticorpos primários, secundários e reagentes TSA

foram realizadas em sequência de acordo com os esquemas descritos na **Figura 10**. Como etapa final, as lâminas foram incubadas com DAPI (1:2000, *Life Technologies*) para visualização do núcleo das células e a montagem das lâminas foi feita com o uso de Fluoromount-G (*SouthernBiotech*).

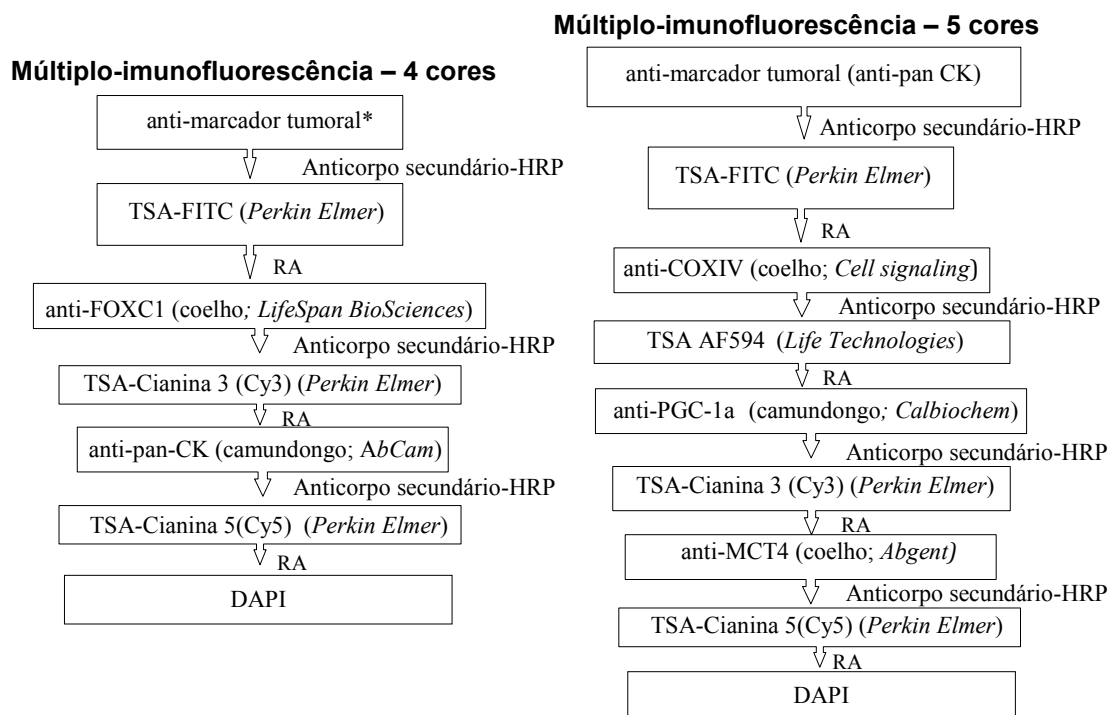


Figura 10 - Etapas do protocolo de múltiplo-imunofluorescência para o estudo do câncer de mama. Os protocolos de 4 e 5 cores foram usados, respectivamente, para a análise de marcadores da TEM e metabólicos em linhagens de CTCs e em amostras de tecidos. * Para as amostras de tecidos, o anti-marcador tumoral (RE, HER2, EGFR) foi utilizado de acordo com o diagnóstico de cada caso incluído no estudo. O anti-HER2 foi utilizado como anti-marcador tumoral para as linhagens de CTCs. RA = recuperação antigênica.

3.7.4 Análise da múltiplo-imunofluorescência

Para análise da expressão dos marcadores foi gerada uma biblioteca contendo o perfil espectral de cada fluoróforo (FITC ou AF488, Cy3, Cy5,

AF595 e DAPI) utilizando o sistema Nuance®(*PerkinElmer*). As lâminas foram escaneadas de forma automatizada utilizando o sistema Vectra® (*PerkinElmer*) que permite a aquisição de imagens multiespectrais utilizando comprimentos de onda espaçados de 10 nm, no intervalo de 400 – 720 nm, e objetiva 20X.

As imagens foram em sequência analisadas pelo *software inForm®*(*PerkinElmer*) que, ao empregar algoritmos e a biblioteca espectral previamente preparada, permite: i) segmentação automática do tecido ii) fenotipagem das células distinguindo-as em células normais, tumorais, estromais e inflamatórias iii) segmentação celular em núcleo, citoplasma e membrana iv) separação individual de cada sinal emitido permitindo a quantificação da intensidade fluorescente para cada marcador nos diferentes compartimentos subcelulares (**Figura 11**).

Categorias de intensidade fluorescente foram estabelecidas de forma arbitrária baseando-se nos valores obtidos pela análise do *software inForm®*: negativa = 0, fraca= 1, moderada= 2, e intensa= 3. Um HScore semi-quantitativo para cada caso foi obtido pelo somatório da porcentagem de células marcadas multiplicado pelo valor correspondente à intensidade do sinal (0-3) (KRAUS et al. 2012; TAO et al. 2014; REINCKE et al. 2015) . Os casos foram então categorizados por apresentarem baixa ou alta expressão dos marcadores alvos deste estudo utilizando a mediana dos valores de HScore como *cutoff*.

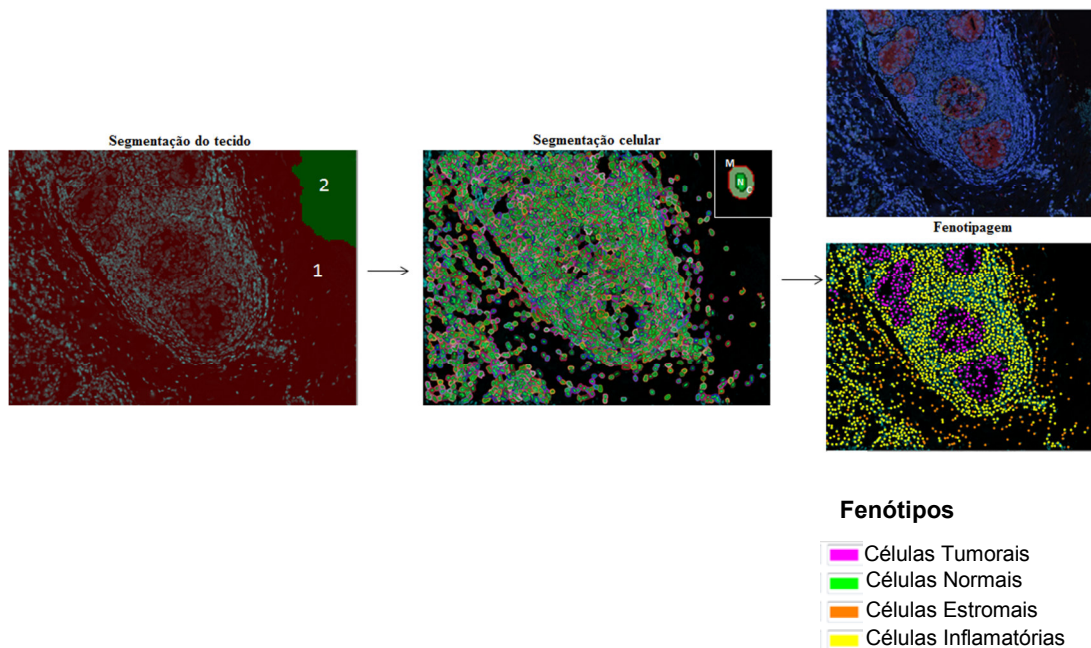


Figura 11 - Etapas da análise de imagem multispectral para tecidos. 1 = tecido (área de interesse). 2 = não tecido. M = membrana, N = núcleo, C = citoplasma.

3.8 VIABILIDADE CELULAR

As células de melanoma 113-6/4L, foram incubadas em placas de 96 poços ($1,5 \times 10^4$ células) por 24 horas e tratadas com diferentes concentrações das drogas (0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,1; 0,26; 0,64; 1,60; 4 e $10 \mu\text{M}$) em 6 replicatas. Após 72 horas, as células foram fixadas utilizando formaldeído 4% e incubadas com o reagente SYTO60 (*Invitrogen*) por 1 hora, temperatura ambiente, protegidas da luz. A viabilidade celular foi avaliada pelo sinal fluorescente resultante da marcação do ácido nucléico pelo leitor *SpectraMax* (*Molecular Devices*). Os valores de sinal fluorescente foram corrigidos pelo *background* fluorescente a partir de poços vazios e

normalizados de acordo com os resultados obtidos dos poços contendo apenas meio de cultura. Os valores de IC₅₀ (*half maximal inhibitory concentration*) foram obtidos pela curva dose resposta gerada pelo software *GraphPad Prism*®.

3.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células de 113-4/6L foram crescidas em lâminas com 8 poços (10⁴ células/poço; EMD Millipore Millicell™ EZ Slides) e foram tratadas com dabrafenibe (1µM; *GSK2118436/Selleckchem*), trametinibe (1µM; *GSK1120212/ Selleckchem*) e com a combinação de ambas as drogas (1µM de cada) por 6 horas, 24 horas e 48 horas. O controle negativo foi realizado com DMSO, reagente utilizado para solubilização das drogas.

O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com tampão TNB (0,1M Tris-HCl, pH7,5; 0,5M NaCl; 0,3% Triton X-100, 0,5% *Blocking Reagent/Perkin Elmer*) por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão TNT (0,1M Tris-HCl, pH7,5; 0,15M NaCl; 0,3% Triton X-100) e procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena (2X por 5 minutos). Os anticorpos primários (1µg/mL; 1 hora de incubação), secundários (anti-coelho ou anti-mouse *SuperPicture Polymer Detection HRP kit; Life Technologies*/20 minutos) e o reagente TSA AF488 (1:50 em *Amplification Diluent; Perkin Elmer* por 10 minutos) foram utilizados em sequência, intercalando-se lavagens com o tampão TNT. A etapa de bloqueio das peroxidase endógena foi realizada anteriormente à incubação com DAPI

(1:15000; *Life Technologies*). A montagem das lâminas foi feita com o uso de Fluoromount-G (*SouthernBiotech*).

Os anticorpos primários contra as seguintes proteínas foram utilizados: pERK^{T202/Y204} (clone D13.14.4E, *Cell Signaling*); DUSP6 (clone EPR129Y, *Abcam*) e SPRY2 (clone SQ-5; *Santa Cruz*).

3.10 GERAÇÃO DE CÉLULAS 113-6/4L GFP+ ESTÁVEIS

O vetor que expressa simultaneamente GFP e luciferase (gentilmente cedido pelo Dr. Nicola Aceto; Laboratório dos Drs. Daniel Haber e Shyamala Mahewasram/MGH Cancer Center) foi co-transfectado com os vetores de empacotamento viral (pMD2.G, pRSV-Rev, pMDLg/pRRE; *Addgene*) em células HEK293T utilizando *Lipofectamine 2000* (*Invitrogen*). Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado e a concentração das partículas virais foi realizada por centrifugação (4000 g por 30 minutos a 25° C) utilizando filtro Amicon® (Millipore). Em seguida, alíquotas foram feitas e estocadas a -80° C. A infecção viral das células 113-6/4L foi realizada por meio de cultivo em placas de 6 poços (2,5x10⁴ células/poço; 4mL de meio/poço), adição de polibreno (1:1000; *Sigma*) e 100µL do estoque de partículas virais concentradas. De acordo com experimentos anteriores realizados pelo laboratório mencionado, foi visto que tal volume de partículas virais para esta quantidade de células corresponde à multiplicidade de infecção (MOI) = 10.

A eficiência da infecção viral foi avaliada pela expressão de GFP nas células 113-6/4L por citometria de fluxo. Iodeto de propídeo foi utilizado para

determinar a viabilidade celular. A citometria de fluxo e o isolamento de células 113-6/4L GFP+ foi realizado utilizando o *FACS Aria™ Fusion* (BD Biosciences) pela *Core Facility* do *MGH Cancer Center*. E o software *FACS Diva™ Version 8.0* (BD Biosciences) foi empregado para análise dos resultados (**Anexo 4**).

3.11 MODELO ANIMAL DE MELANOMA E TRATAMENTO COM INIBIDOR DA VIA MAPK

Camundongos machos NOD/SCID/IL2 γ null (NSG) (*Jackson Laboratory*) foram utilizados para o desenvolvimento do modelo animal. Os tumores foram obtidos pela injeção subcutânea de células 113-6/4L GFP+ (5×10^6 células; 1:1 de solução de células e *Matrigel® Basement Membrane Matrix High Concentration/Corning*) nos flancos dos animais sob anestesia com isoflurano. Após 4 semanas, os camundongos foram randomizados em 2 grupos: tratados e não tratados.

O veículo para a droga utilizada foi preparado com 0,5% HPMC (Hidroxipropilmetilcelulose; Sigma) e 0,2% Tween® 80 (Sigma) em água destilada, pH 8,0. Dabrafenibe (30 mg/kg) foi administrado 1 ou 2 vezes ao dia por via oral com um intervalo de 16 horas entre as doses. Considerando, o perfil farmacocinético da droga, o camundongo foi sacrificado 4 horas após a última dose de dabrafenibe sob o efeito de anestesia com isoflurano.

Buprenorfina (0,1mg/kg) foi administrada previamente à retirada dos tumores. Amostras dos tumores primários, pulmões e fígado foram coletadas

e imediatamente fixadas em formalina (*Formalin solution, Neutral Buffered* 10%; Sigma) por 24 horas e embebidas em parafina.

Os *estudos in vivo* foram realizados de acordo com as normas e o protocolo aprovado pelo *MGH Subcommittee on Research Animal Care*.

3.12 IMUNOISTOQUÍMICA

As amostras dos tumores primários, pulmões e fígado fixadas em formalina foram submetidas à *Core Pathology Facility* do *MGH Cancer Center* para processamento e realização de imunistoquímica convencional para análise da expressão de GFP (clone D5.1, *Cell Signaling*). Os tumores primários também foram submetidos a reações com os anticorpos contra pERK^{T202/Y204} (clone D13.14.4E, *Cell Signaling*) e pS6^{S240/S244} (clone D68F8; *Cell Signaling*). Por fim, as amostras foram contracoradas com hematoxilina e as imagens foram obtidas utilizando o sistema *ScanScope* (Aperio).

3.13 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CTCs PARA O ESTUDO DO MELANOMA

3.13.1 Isolamento de CTCs pelo CTC-iChip

Um volume máximo de 20 mL de sangue periférico de pacientes e indivíduos saudáveis foi coletado em tubos *Cyto-Chex® BCT* (*Streck*). Aproximadamente 15 mL de sangue foi processado utilizando o módulo ^{neg}CTC-iChip. Antes do processamento, as amostras de sangue total foram

incubadas com um coquetel de anticorpos biotinizados contra CD45 (clone H130), CD66b e CD16 (*Jassen Diagnostics*) e, em seguida, incubadas com pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina (*Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1; Invitrogen*) para a depleção de leucócitos.

Para os ensaios envolvendo o modelo animal de melanoma, aproximadamente 1 mL de sangue de cada camundongo foi coletado por punção cardíaca em *Streck Cell Preservative Tubes (Streck)* e processado pelo ^{neg}CTC-Chip após incubação com anti-CD45 biotinizado (clone 30-F11, *BD Pharmingen*) e com pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina (*Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1; Invitrogen*). Após o processamento de sangue, o produto coletado foi submetido à citocentrifugação (2000rpm, 5 minutos) (*Megafunnel Cytospin, Thermo Scientific*). As lâminas foram incubadas com paraformaldeído 2% por 10 minutos e mantidas a -80° C para posterior análise de CTCs.

3.13.2 Múltiplo-imunofluorescência para detecção e caracterização de CTCs

As lâminas geradas após o processamento de amostras de sangue foram lavadas com tampão TNT e pré-bloqueadas com anticorpo contra o fragmento Fab de IgG de camundongo (*AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)*); em tampão TNB por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão TNT e incubadas com o reagente de bloqueio de peroxidase (*Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent/Dako*). As incubações com os anticorpos primários (**Quadro 8**), secundários (anti-

camundongo específico para o isótipo utilizado, anti-coelho, anti-rato ou anti-galinha/*Jackson ImmunoResearch* ; 1:200 por 45 minutos) e reagentes TSA (**Quadro 7**) foram realizadas em sequência como descrito na **Figura 12**. As lâminas foram lavadas com tampão TNT após cada reagente utilizado e o bloqueio da peroxidase endógena foi repetido anteriormente ao uso de cada anticorpo primário. As lâminas foram incubadas com DAPI (1:2000, *Life Technologies*) para a visualização do núcleo das células e a montagem das lâminas foi feita com o uso de Fluoromount-G (*SouthernBiotech*).

Quadro 8 - Anticorpos utilizados para múltiplo-imunofluorescência no melanoma.

Antígeno	Clone	Espécie	Isótipo	Clonalidade	Fabricante	Diluição/ Concentração
Melanossomo	HMB-45	Camundongo	IgG1	Monoclonal	Dako	1µg/mL
NG2	LHM-2	Camundongo	IgG1	Monoclonal	R&D Systems	1µg/mL
Tirosinase	T311	Camundongo	IgG2a	Monoclonal	Dako	1µg/mL
GFP	-	Galinha	IgY	Policlonal	AbCam	1µg/mL
CD45	H130	Camundongo	IgG1	Monoclonal	BioLegend	2,5µg/mL
CD45	3H1363	Rato	IgG2b	Monoclonal	Santa Cruz	2,5µg/mL
CD45	30-F11	Rato	IgG2b	Monoclonal	BioLegend	2,5µg/mL
*pERK	-	Camundongo	IgG2b	Monoclonal	Cell Signaling	1µg/mL
*pS6	-	Camundongo	IgG3	Monoclonal	Cell Signaling	1µg/mL

* Anticorpo customizado

3.13.3 Análise de CTCs

A análise por imagem multiespectral foi empregada para a identificação e imunomarcagem em CTCs. Uma biblioteca espectral, a partir de lâminas contendo células de 113/6-4L, foi criada (*Nuance; Perkin Elmer*) combinando o perfil espectral de cada fluoróforo usado para os protocolos de múltiplo- imunofluorescência (AF488, Cy3, Cy5, AF594, DAPI) (**Anexo 3**).

As lâminas foram escaneadas de forma automatizada utilizando o sistema Vectra® (*PerkinElmer*) que permite a aquisição de imagens multiespectrais utilizando comprimentos de onda espaçados de 10 nm, no intervalo de 400 – 720 nm, e objetiva 60X. As imagens foram em sequência analisadas pelo *software* inForm®(*PerkinElmer*).

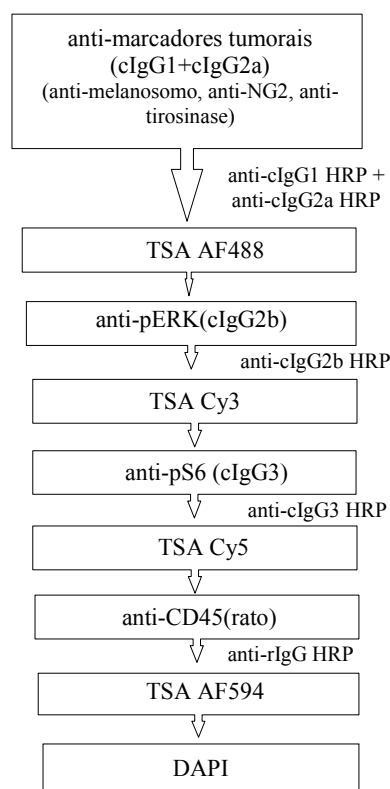


Figura 12 – Múltipla-imunofluorescência para análise de CTCs derivadas de melanoma. Protocolo utilizado para amostras de pacientes com melanoma e de camundongos. As células utilizadas para geração do modelo animal eram GFP+, neste caso, o anti-GFP (1µg/mL; galinha/Abcam) foi incluído no coquetel de anticorpos contra marcadores tumorais. Foi ainda utilizado o anticorpo contra o CD45 de camundongo (produzido em rato) (clone 30F11, Biolegend). E os respectivos anticorpos secundários foram anti-galinha HRP e anti-rato HRP (*Jackson ImmunoResearch*). c= camundongo; r=rato

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os *softwares* SPSS 18.0 (SPSS Inc.,Chicago,mIL, EUA), *MATLAB* (MathWorks, Massachusetts,EUA) e *GraphPad Prism*® (La Jolla, CA, EUA). Para análise das variáveis numéricas, a homocedasticidade foi testada, assim como a normalidade da distribuição das amostras pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os experimentos em triplicata foi aplicado o teste ANOVA *one-way*, seguida pelo pós-teste de Tukey. Para a análise da associação entre dois grupos foi usado o teste exato de Fisher devido o tamanho das amostras e por se tratar de grupos não pareados. Para comparação de medianas de dois grupos não pareados foi utilizado o teste de Mann-Whitney e para os grupos pareados o teste de Wilcoxon. O teste de Kruskal Wallis foi aplicado para a comparação de medianas para mais de dois grupos não pareados, seguido do teste *post hoc* de Dunn para identificarmos entre quais grupos se encontravam as diferenças. Os testes de correlação foram aplicados para variáveis normais (coeficiente de correlação de Pearson) e não normais (coeficiente de correlação de Spearman). Para as análises de concordância da expressão dos marcadores entre as amostras de tecidos e CTCs utilizamos a taxa de concordância global e o coeficiente de Kappa. As curvas de sobrevida foram estimadas usando-se o método de Kaplan-Meier. Foram considerados como significantes os valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES METABÓLICOS E DA TEM EM CTCs E AMOSTRAS DE TECIDOS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

4.1.1 Análise da expressão dos marcadores em linhagens de câncer de mama

Devido à heterogeneidade característica do câncer de mama (POLYAK 2011) e pelo fato deste estudo não ter como alvo um subtipo molecular específico, realizamos em um primeiro momento a análise da expressão dos marcadores em diferentes linhagens de câncer de mama (**Quadro 9**). Assim, poderíamos verificar se as mesmas apresentavam diferenças quanto ao padrão de expressão dos marcadores e estabelecer um comparativo com os dados obtidos com a análise de CTCs de pacientes com câncer de mama. Além disto, tal abordagem nos permitiu validar os anticorpos utilizados bem como padronizar a técnica ISET para isolamento e caracterização de CTCs.

Quadro 9 - Classificação das diferentes linhagens celulares utilizadas no estudo

Linhagem celular	Classificação de acordo com o subtipo molecular de câncer de mama
MCF7	Luminal A
BT474	Luminal B (HER2+)
SKBR3	Superexpressor de HER2
MDA-MB-231	Triplo negativo

Fonte: HOLLIDAY e SPEIRS (2011)

As **Figuras 13 e 14** mostram os resultados obtidos para expressão de CKs e FOXC1 nas diferentes linhagens celulares de câncer de mama. É possível observar uma heterogeneidade tanto quanto à expressão de CKs quanto para FOXC1 nos diferentes tipos celulares.

Para os ensaios de imunocitoquímica e *Cell Spiking* foi utilizado o anticorpo anti pan-CK; clones AE1/AE3. O anticorpo AE1 reage com as citoqueratinas 10 13 14 15 16 e 19. Enquanto que o anticorpo AE3 reage com as citoqueratinas 1 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (EICHNER et al. 1984; SUN et al. 1984).

Devido à impossibilidade de utilizar o mesmo anticorpo para a técnica de *Western blot* já que seriam gerados diferentes perfis de bandas, foi utilizado anti-CK8 pelo fato da citoceratina 8 (CK8) ser comumente expressa na maioria dos epitélios e tumores epiteliais (MAKINO et al. 2009).

As **Figuras 13A e 13B** demonstram que houve uma diferença estatística significativa quando se comparou a expressão de CK8 entre as linhagens MCF7 e MDA-MB231 ($p < 0,01$) bem como entre BT474 e MDA-

MB231 ($p < 0,05$). Sendo que esta última linhagem não apresentou expressão para tal proteína.

Os resultados obtidos pela técnica de *Cell Spiking* (**Figura 13 C**) foram importantes para demonstrar a eficiência da plataforma ISET na captura das células bem como a realização de imunocitoquímica nas membranas obtidas após o processamento da amostra de sangue. As células da linhagem MCF7 apresentaram positividade e uma marcação intensa para o anti-pan-CK se comparado à linhagem MDA-MB-231 em que se observa ausência de marcação para pan-CK. Ambas as linhagens apresentaram negatividade para CD45.

Com relação à expressão de FOXC1 nas diferentes linhagens celulares podemos observar pelas **Figuras 14A e 14B** que, embora, não tenha uma diferença estatística significativa e também pelas barras de erro apresentadas, há uma tendência de que a linhagem MDA-MB231 apresente maior expressão de FOXC1 em comparação com MCF7, BT474, SKBR3.

FOXC1 é um fator de transcrição que em células epiteliais mamárias induz TEM pela inibição da expressão de E-caderina (RAY et al. 2010), podendo assim haver mudanças dinâmicas na sua expressão devido à plasticidade celular que permite a aquisição do fenótipo de TEM, sendo este um dos possíveis argumentos para as barras de erro obtidas pela análise da expressão por *Western blot*.

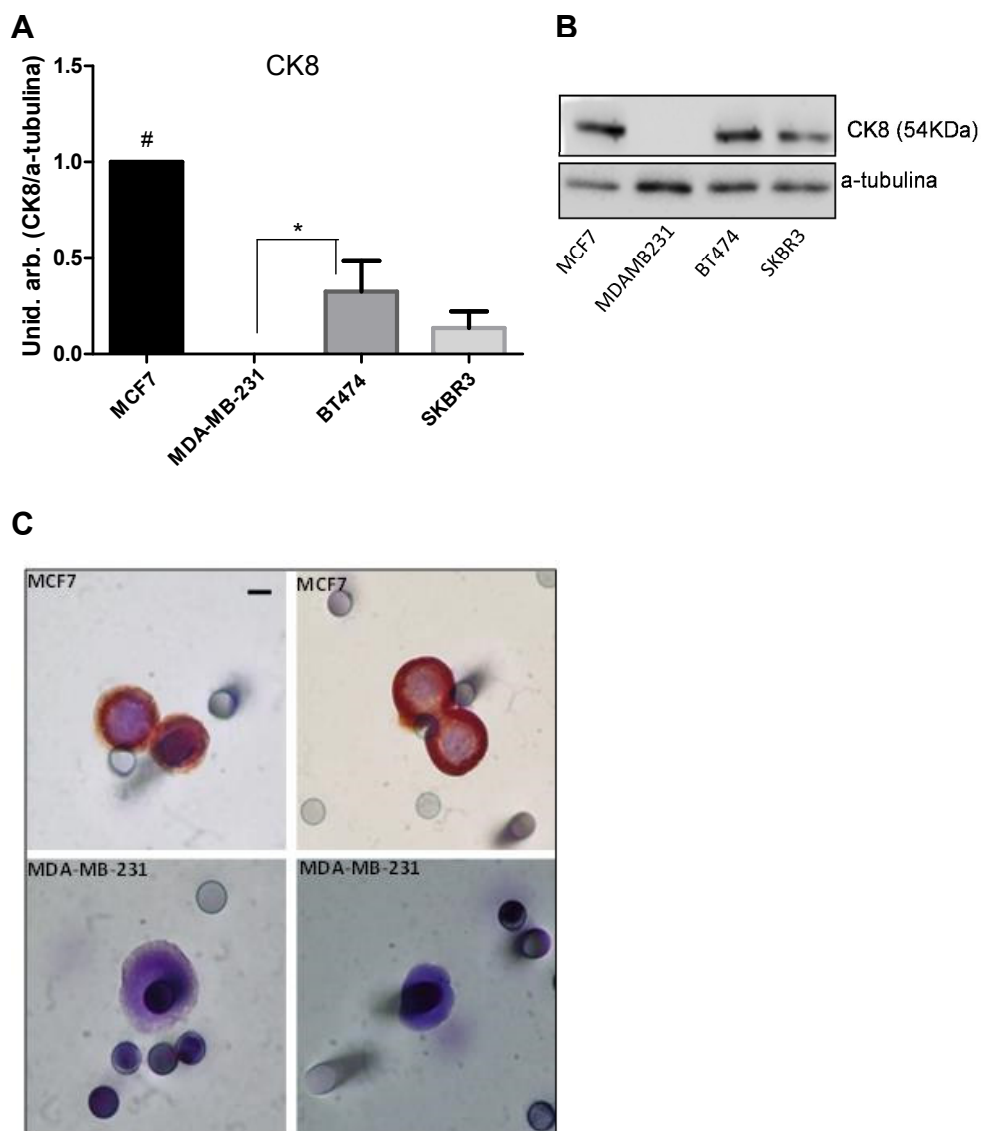


Figura 13 – Expressão de CKs em linhagem de células tumorais de mama. A - Ensaio de *Western blot*. O gráfico representa a média e o erro padrão da expressão normalizada de CK8/alfa-tubulina. ([#] $p < 0,01$; ^{*} $p < 0,05$). B - Figura representativa do ensaio de *Western blot* mostrando a expressão de CK8 e alfa-tubulina nas linhagens MCF7, BT474, SKBR3 e MDA-MB-231. C - Imunocitoquímica por dupla marcação em membrana do ISET utilizando anti-panCK (clones AE1A3), anti-CD45 e as linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 (*Cell Spiking*) (Objetiva de 100X). Unid.arb. = unidades arbitárias

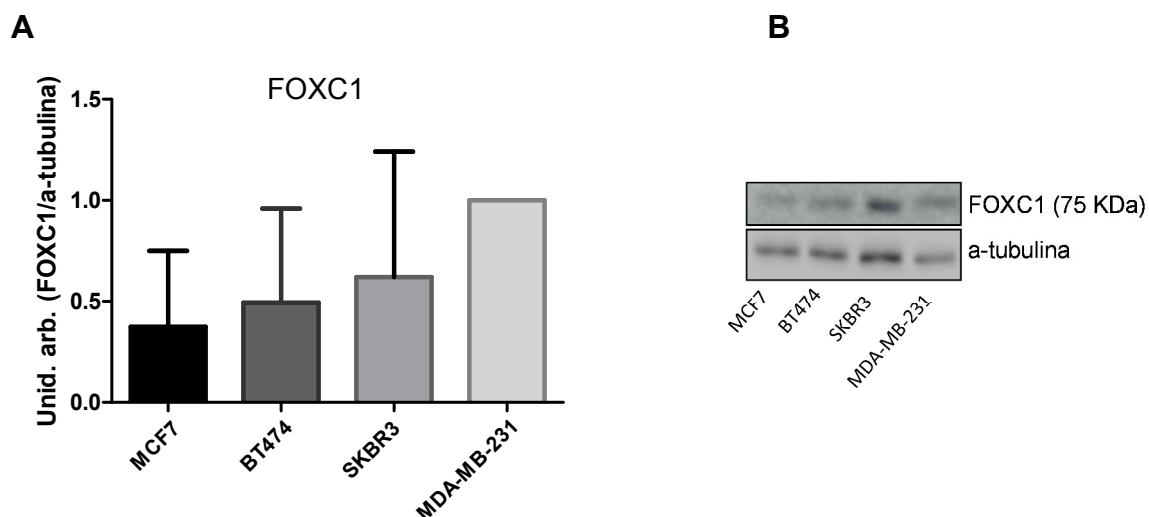


Figura 14 - Expressão de FOXC1 em linhagem de células tumorais de mama. A - Ensaio de *Western blot*. O gráfico representa a média e o erro padrão da expressão normalizada de FOXC1/alfa-tubulina. B- Figura representativa do ensaio de *Western blot* mostrando a expressão de FOXC1 e alfa-tubulina nas linhagens MCF7, BT474, SKBR3 e MDA-MB-231

Os resultados obtidos para expressão de CKs e FOXC1 nas diferentes linhagens de câncer de mama estão de acordo com dados da literatura que mencionam: i) maior expressão de CKs na linhagem MCF7 se comparada à MDA-MB-231. Em contrapartida, uma maior porcentagem de células MDA-MB-231 comparada à MCF7 apresentaram positividade para vimentina (marcador da TEM), sendo este padrão de expressão associado ao perfil mesenquimal de MDA-MB-231 e epitelial de MCF7 (GADALLA et al. 2011). ii) JOOSSE et al. 2012 investigaram o padrão de expressão de queratinas em 11 linhagens de células de câncer de mama, 50 amostras de tumores primários com suas metástases linfonodais correspondentes (TMA) e CTCs em amostras de sangue de 70 pacientes com câncer de mama metastático. O grupo utilizou um coquetel de anticorpos anti-CKs (clones

C11, AE1, AE3 e anti-CK7) e comparou com os dados obtidos com os 2 anticorpos contra pan-CK mais comumente utilizados para a detecção de células tumorais epiteliais: clones C11 e A45-B/B3. Os dados mostraram que há diferenças no padrão de CKs de acordo com o tipo de linhagem celular como também demonstrado pelos nossos resultados e que o *status* da expressão de citoqueratina em muitas das metástases linfonodais não correspondia ao do tumor primário do mesmo paciente e que o uso do coquetel anti-CKs possibilitou o aumento da detecção de CTCs. iii) superexpressão de FOXC1 foi apontada como uma característica consistente dos casos de câncer de mama *basal-like* se comparado aos demais subtipos de câncer de mama. Uma maior expressão de FOXC1 foi ainda observada em linhagens celulares de câncer de mama do tipo *basal-like*/triplo negativo como MDA-MB-231 (RAY et al. 2010).

A **Figura 15** mostra os resultados obtidos para expressão dos marcadores metabólicos: PGC-1a, COXIV e MCT4 nas diferentes linhagens celulares de câncer de mama. Com relação à expressão de PGC-1a e COXIV podemos observar pela **Figura 15 (A – D)** que houve diferença estatística entre as linhagens MCF7 e BT474 quanto à expressão de PGC-1a e entre BT474 e SKBR3 quanto à expressão de COXIV. Por outro lado, para a expressão de MCT4 não encontramos diferença estatística entre as diferentes linhagens celulares incluídas no estudo (**Figura 15 E e F**).

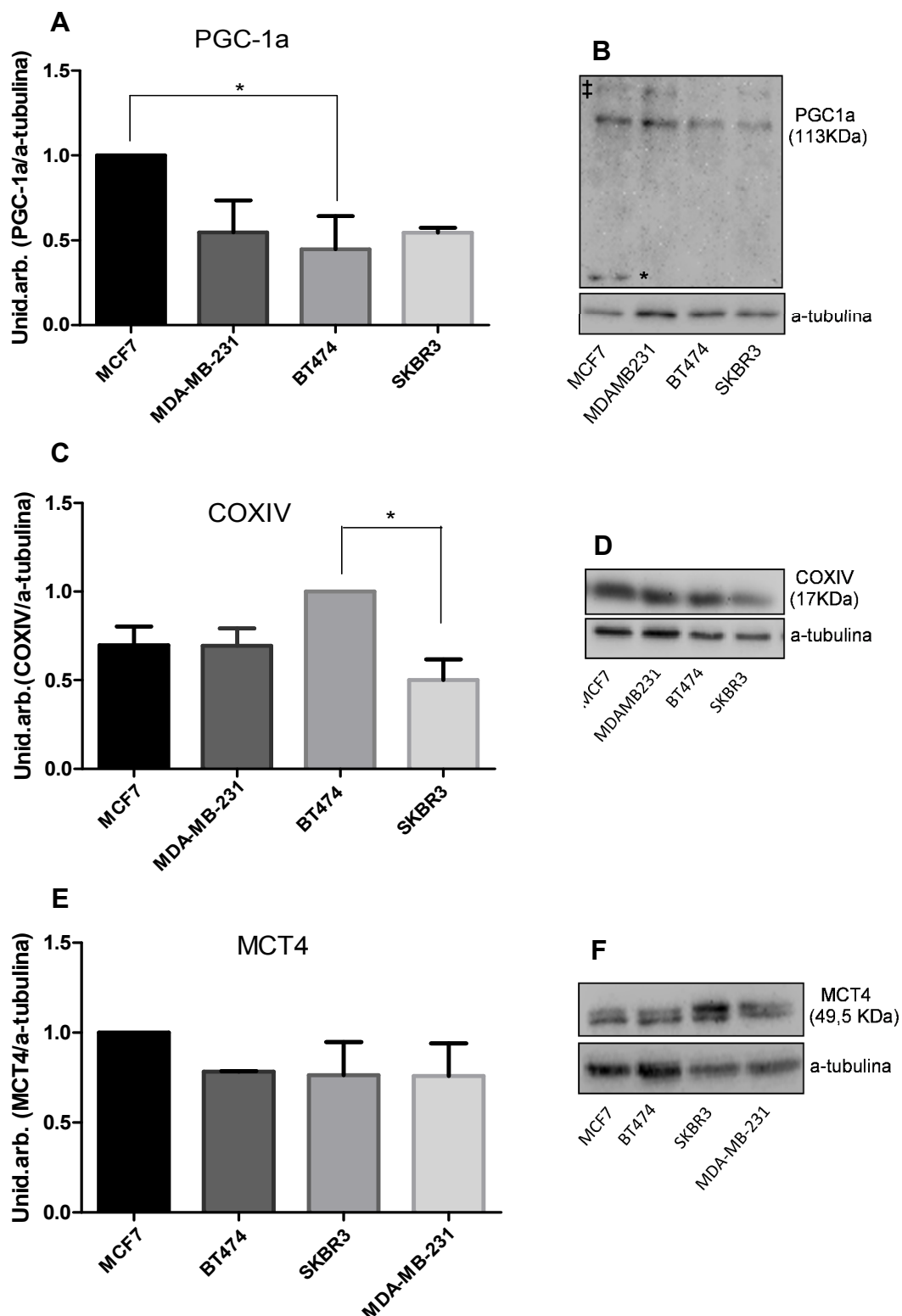


Figura 15 - Expressão dos marcadores metabólicos (PGC-1a, COXIV e MCT4) em linhagem de células tumorais de mama. A,C,E - Ensaio de *Western blot* respectivamente para PGC-1a, COXIV e MCT4. O gráfico representa a média e o erro padrão da expressão normalizada do marcador/alfa-tubulina. B,D,F - Figuras representativas do ensaio de *Western blot* mostrando, respectivamente, a expressão de PGC-1a, COXIV e MCT4 e alfa-tubulina nas linhagens MCF7, BT474, SKBR3 e MDA-MB-231. ‡Modificação pós-traducional (JENINGA et al. 2010) *NT-PGC-1a (CHANG et al. 2012).

A principal diferença entre as linhagens MCF7 (RE+ HER2-) e BT474 (RE+HER2+) é a expressão de HER2 (HOLLIDAY e SPEIRS 2011), entretanto, como não observamos diferença estatística ente MCF7 e SKBR3 quanto à expressão de PGC-1a não é possível assumir que a expressão de HER2 possa ter alguma relação com a expressão desse marcador. Considerando o resultado obtido para COXIV, uma das diferenças entre BT474(RE+HER2+) e SKBR3 (RE-HER2+) é a expressão de RE, porém, como não observamos diferença ente MCF7 e SKBR3 não é possível assumir que a expressão de RE possa ter alguma relação com a expressão de COXIV. Portanto, as diferenças encontradas para a expressão de PGC-1a e COXIV podem estar associadas a outras características dessas linhagens necessitando de maior investigação para definição das mesmas.

Com relação à expressão do marcador de glicólise aeróbica, MCT4, GALLAGHER et al. (2007) utilizando análise por RT-PCR e *Western blot* mostraram que o mesmo é mais expresso na linhagem MDA-MB-231 se comparada à MCF-7 e à linhagem normal de mama HTB-125. Entretanto, nossos resultados não evidenciaram tal diferença.

Nossos resultados, principalmente quanto aos marcadores metabólicos, não permitiram responder por completo os questionamentos quanto a uma possível associação entre o perfil de expressão dos marcadores e os diferentes subtipos de câncer de mama a que cada linhagem pertence ou ainda com o potencial metastático ou de agressividade característicos das mesmas.

A respeito do comparativo entre linhagens celulares e CTCs, POWELL et al. (2012) demonstraram um perfil transcricional distinto de CTCs de pacientes com câncer de mama (metastático e não metastático) e linhagens celulares (MCF7, SKBR3, T47D e MDA-MB-231). Níveis elevados de transcritos de genes associados com metástase (PTN, S100A4, S100A9) e TEM (VIM, TGF β 1, ZEB2, FOXC1, CXCR4) foram detectados em CTCs comparativamente às linhagens celulares. Portanto, as características encontradas em linhagens celulares nem sempre se aplicam às CTCs isoladas de amostras de sangue de pacientes.

4.1.2 Análise de CTCs em pacientes com câncer de mama

O presente estudo contou com a participação de 49 pacientes do AC Camargo Cancer Center, sendo 24 pacientes com doença não metastática e 25 pacientes com doença metastática (pacientes diagnosticadas em qualquer estadio clínico, mas que apresentaram metástase no decurso da doença). Os dados clínico-patológicos das pacientes encontram-se reunidos na **Tabela 1**.

A média de idade para o grupo de pacientes com doença não metastática (representado por M0) foi de 45 anos (24-67 anos), sendo que a maior porcentagem das pacientes (58,3%) apresentou idade inferior a 45 anos no momento da coleta de sangue para o estudo. A maioria dos casos foi diagnosticada como grau 2 (42%) e 3 (42%), índice proliferativo/Ki67 >10% (75%), com tumores T1 (37,5%) e T2 (37,5%), sem acometimento linfonodal (N0) (54,2%), subtipo molecular luminal (54,2%) e distribuição

igualitária do número de pacientes para os diferentes estágios clínicos (33,33% para os estadios I, II, e III).

Para o grupo de pacientes com doença metastática (representado por M+) a média de idade foi de 48 anos (29-66 anos), sendo que a maior porcentagem das pacientes (56%) apresentou idade inferior a 48 anos no momento da coleta de sangue para o estudo. A maioria dos casos foi diagnosticado como grau 2 (68%), índice proliferativo/Ki67 >10% (72%), com tumores T2 (36%), com acometimento linfonodal (N+) (44%), subtipo molecular luminal (64%), estadio clínico IV (52%) e estavam sob tratamento adjuvante (68%).

Tabela 1 - Características clínico-patológicas das pacientes

Características	M0 (n=24)	M+(n=25)
Idade (anos)*		
<45	14	-
≥45	10	-
<48	-	14
≥48	-	11
Grau histológico		
1	4	1
2	10	17
3	10	3
Dados não disponíveis	-	4
Ki67		
≤10%	5	2
>10%	18	18
Dados não disponíveis	1	5
Subtipo Molecular		
Luminal	13	16
Superexpressor de HER2	2	5
Triplo Negativo	9	4
Estadio clínico		
I	8	2
II	8	4
III	8	4
IV	-	13
Dados não disponíveis	-	2
T		
T1	9	2
T2	9	9
T3	4	5
T4	2	7
Dados não disponíveis	-	2
N		
N0	13	10
N+	11	11
Dados não disponíveis	-	4
M		
M0	24	0
M+	0	25
Tratamento		
Adjuvante	11 [#]	18‡
Neoadjuvante	13 [#]	0
Paliativo	0	7‡

* No momento da coleta de sangue; ** *Cut off* de 10% para Ki67 - (NIKURA et al. 2013); # Coleta de sangue realizada anteriormente ao início do tratamento; ‡ Coleta de sangue durante o tratamento.

A presença de CTC foi detectada em 92% (22/24) das pacientes do grupo M0 e em 88% (22/25) daquelas pertencentes ao grupo M+. O valor da mediana de CTC/mL de sangue periférico foi de 1,5 CTCs/mL de sangue para ambos os grupos, com intervalos de 0-7,5 CTCs/mL de sangue para o grupo M0 e de 0-8 CTCs/mL de sangue para o grupo M+ (**Figura 16; Anexo 5**).

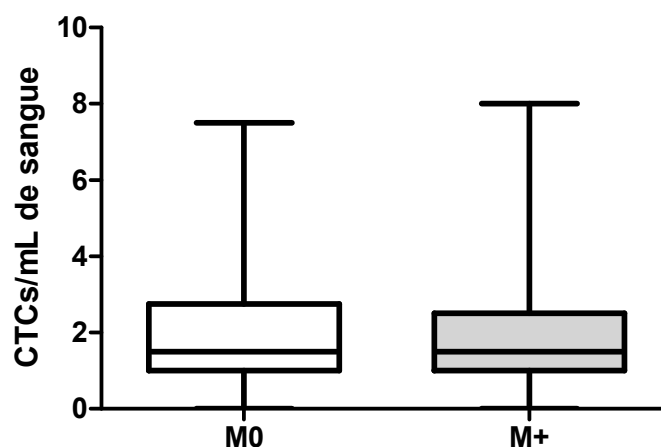


Figura 16 - Distribuição do número de CTCs entre os grupos de pacientes M0 e M+. Gráficos em *Box-plot* mostrando os valores medianos, mínimos e máximo para cada grupo de paciente.

Não podemos deixar de mencionar a possível influência do tratamento recebido pelas pacientes do grupo M+ como justificativa para os valores obtidos para a contagem de CTCs em comparação com grupo M0, uma vez que dados da literatura mostram a presença de CTC em uma maior porcentagem de casos metastáticos ou avançados (25 – 80%) que no estágio inicial da doença (12-50%) dependendo do tipo de metodologia utilizado (RIETHDORF et al. 2008; FRANKEN et al. 2012).

CRISTOFANILLI et al. (2004) reportaram um *cut off* de ≥ 5 CTCs/7,5mL de sangue como pior prognóstico em pacientes com câncer de mama metastático, enquanto LUCCHI et al. (2012) mencionaram um *cut off* de ≥ 1 CTC/7,5mL de sangue para o câncer de mama não metastático. Ambos os estudos utilizaram a plataforma *CellSearch*® que é atualmente a única aprovada pelo FDA para análise de CTCs.

Ao extrapolarmos os valores encontrados em nosso estudo para 7,5mL de sangue, volume total analisado pela plataforma *CellSearch*® observamos um número maior de CTCs que o *cutt off* estabelecido pelos estudos com *CellSearch*® para a maioria das pacientes (**Anexo 5**). Diferentes estudos comparam os dados obtidos por ISET® e *CellSearch*® (FARACE et al. 2011; HOFMAN et al. 2011; KHOJA et al. 2012; KREBS et al. 2012) e em geral, mais CTCs foram detectadas pelo ISET que pelo *CellSearch*®, o que pode ser justificado pela não detecção de CTCs com baixa ou ausência da expressão de EpCAM.

A análise estatística para verificar possíveis associações entre o número de CTC e as características clínico-patológicas das pacientes demonstrou que para o grupo M+ houve associação estatisticamente significativa entre a presença de CTC e a progressão da doença (sendo considerado aumento da lesão, novos sítios metastáticos ou morte por câncer) ($p=0,029$) (**Tabela 2**). Em relação ao grupo M0 não houve associação significativa entre a presença de CTC e a progressão da doença (sendo considerado surgimento de metástases bem como resposta patológica parcial/moderada e/ou resposta clinica parcial/moderada após

terapia neoadjuvante, uma vez que outras pacientes apresentaram resposta completa ou não evidência da doença).

Tabela 2 - *Status* de CTC em relação ao *status* da doença para os grupos M+ e M0.

Variável	Progressão da Doença*		Total	p
	Presença	Ausência		
CTC (grupo M+)				
Presença	21	1	22	0,029†
Ausência	1	2	3	
Total	22	3	25	
CTC (grupo M0)				
Presença	7	15	22	1,000
Ausência	0	2	2	
Total	7	17	24	

*Dados referentes ao seguimento das pacientes de 2012 a 2015. O teste exato de Fisher (*2-sided*) foi realizado para identificação de diferenças estatísticas significativas.

Para as demais características clínico-patológicas não encontramos associação estatisticamente significativa em relação à presença de CTCs para ambos os grupos de pacientes (**Anexo 6**). Tais resultados estão de acordo com alguns estudos da literatura: CRISTOFANILLI et al. (2007) demonstraram que CTCs têm valor prognóstico independente da carga tumoral e fenótipo da doença. RACK et al. (2014) também não encontraram associação entre os níveis de CTC e tamanho do tumor, grau histológico e *status* de receptor hormonal.

A plataforma ISET nos permite ainda isolar grupos de CTCs, denominados Microêmbolos Tumorais Circulantes (CTMs). Uma porcentagem maior de pacientes do grupo M+ apresentou CTMs (32%; 8/25)

se comparado ao grupo M0 (8%; 2/24). Para ambos os grupos foram encontradas maiores porcentagens de pacientes com células individuais.

O fato de termos encontrado maior número de pacientes do grupo M+ com CTMs em comparação com o grupo M0 pode ser explicado pelo potencial metastático dos CTMs como demonstrado por diferentes estudos (FIDLER 1970; LIOTTA et al. 1976). Além disto, é importante ressaltar que os dados clínicos atuais das pacientes do grupo M0 (n=2) que apresentaram CTMs mostram que uma delas apresentou metástases (linfonodo, fígado e osso) cerca de 20 meses após a análise da amostra de sangue. A segunda paciente apresentou recentemente nódulos suspeitos na tireoide, embora o acometimento deste local pela disseminação do câncer de mama seja considerado como raro (GERGES et al. 2006).

Os critérios para definição de CTMs foram baseados no estudo de KREBS et al. (2012), sendo considerados como grupos de células (≥ 3 núcleos distinguíveis) negativas para CD45, positivas ou não para CKs. A **Figura 17 (A-D)** corresponde a imagens representativas dos CTMs isolados a partir de amostras de sangue das pacientes com câncer de mama, ressaltando que um dos casos analisados também apresentou êmbolo tumoral na amostra de tecido do tumor primário (**Figura 17 E**), permitindo uma comparação morfológica com aqueles isolados do sangue.

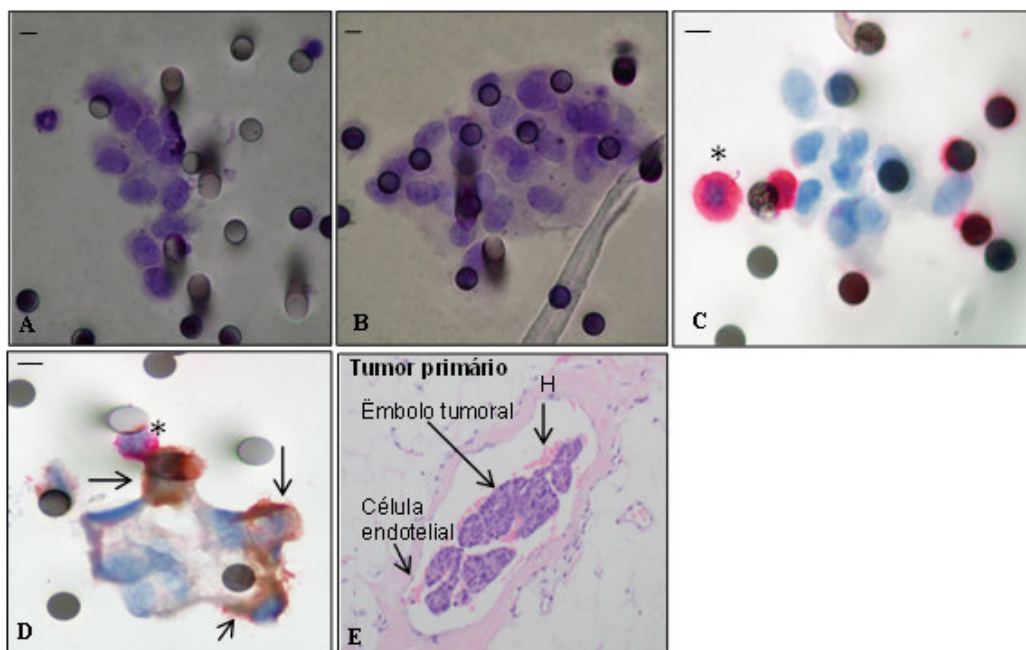


Figura 17 - Imagens representativas de Microêmbolos Tumorais em pacientes com câncer de mama. A-D: Imunocitoquímica por dupla marcação em membrana do ISET. Microêmbolos Tumorais Circulantes (CTMs) isolados de amostras de sangue de pacientes com câncer de mama apresentam negatividade para pan-CK e CD45 (A-C). No painel D, as setas indicam a presença de CTC^{CK+} em CTM. *Leucócitos CD45+. E: Êmbolo Tumoral em vaso sanguíneo do tumor primário de paciente com câncer de mama. H= hemácias. Barra de escala = 8µm

Apenas um dos casos analisados (paciente do grupo M0) apresentou CTM com CTCs positivas para pan-CK. Tal fato está de acordo com o trabalho de YU et al. (2013) em que os CTMs isolados apresentaram marcação fortemente positiva para os marcadores mesenquimais e fracamente positiva para marcadores epiteliais, inclusive quando se utilizou anti-CKs. Entretanto, em nosso estudo, CTMs não foram identificados nos *spots* destinados às análises do marcador da TEM, FOXC1, impossibilitando verificar se haveria ou não um maior número de CTM com CTCs positivas

para FOXC1, já que a grande maioria dos casos apresentou CTM com CTCs negativas para pan-CK.

Após as análises dos dados de enumeração de CTCs e detecção de CTMs, detivemo-nos aos resultados referentes às imunocitoquímicas por dupla marcação para caracterização das CTCs isoladas de pacientes do grupo M0 e M+.

As **Figuras 18A e B** mostram que ambos os grupos de pacientes (M0 e M+) apresentaram CTCs positivas para os marcadores da TEM: CKs e FOXC1. O grupo M+ apresentou 18% das pacientes com CTC^{CK+} e 23% com CTC^{FOXC1+}, enquanto que o grupo M0 apresentou 45% das pacientes com CTC^{CK+} e 36% com CTC^{FOXC1+}. As **Figuras 18 C-E** se referem às imagens representativas das CTCs isoladas a partir de amostras de sangue das pacientes com câncer de mama e que foram submetidas à imunocitoquímica por dupla marcação utilizando os anticorpos anti-pan-CK ou anti-FOXC1 juntamente com anti-CD45.

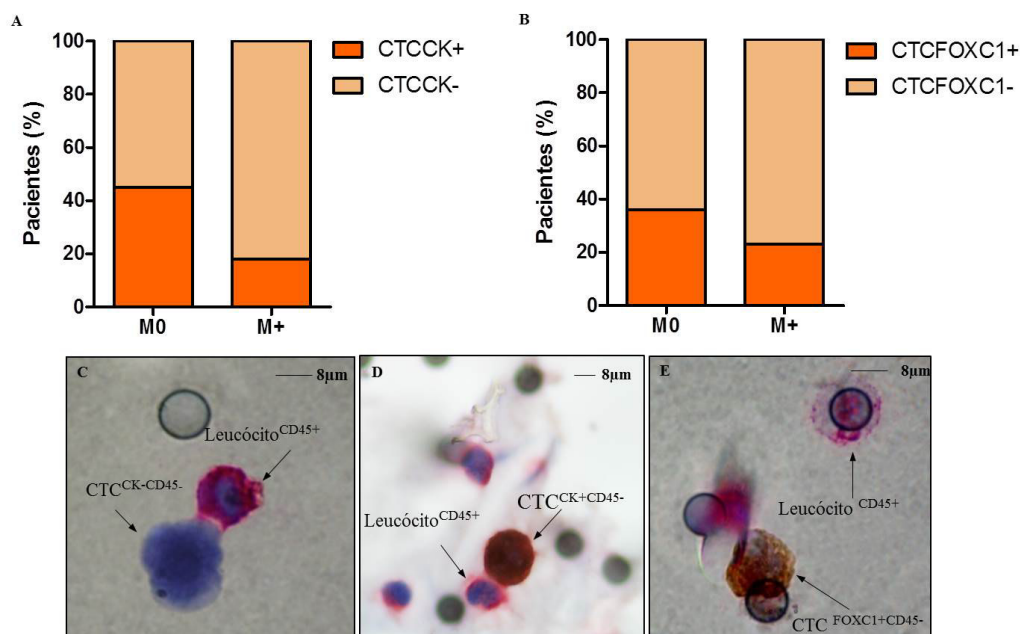


Figura 18 - Expressão dos marcadores da TEM (CKs e FOXC1) em CTCs isoladas de amostras de sangue de pacientes com câncer mama. A-B: Distribuição percentual de pacientes com câncer de mama não metastático (M0) e metastático (M+) de acordo com a positividade e negatividade para CKs e FOXC1 em CTCs. C-E: Imunocitoquímica por dupla marcação em membrana do ISET utilizando marcadores da TEM e CD45 como marcador de leucócito. C: CTC negativa para pan-CK e CD45. D: CTC positiva para pan-CK e negativa para CD45. E: CTC positiva para FOXC1 e negativa para CD45. Nos painéis C-E os leucócitos apresentam positividade para CD45.

Para o grupo M+ encontramos uma porcentagem menor de CTC^{CK+} comparado ao grupo M0, isso pode ser devido a um maior número de CTC com fenótipo de TEM para esse grupo, porém utilizando apenas FOXC1 como marcador da TEM não foi possível evidenciar tal hipótese.

Nossos resultados mostram claramente que há uma heterogeneidade com relação à presença de CTCs expressando o marcador epitelial e mesenquimal. Diferentes estudos têm demonstrado que há uma heterogeneidade evidente na expressão de marcadores de TEM em CTCs (ARMSTRONG et al. 2011; HOU et al. 2011; KALLERGI et al. 2011;

LECHARPENTIER et al. 2011; YU et al. 2013). YU et al. (2013), identificaram as seguintes populações de CTCs: exclusivamente epiteliais (E), intermediárias (E > M, E = M, M > E) e exclusivamente mesenquimais (M).

A técnica de isolamento de CTCs utilizada neste estudo (*Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells- ISET*) não nos permitia analisar múltiplos marcadores em uma mesma amostra. Desta forma, não foi possível identificarmos diferentes subpopulações de CTCs baseados na expressão de FOXC1 e CKs ou ainda utilizarmos um painel mais amplo de marcadores epiteliais e mesenquimais. Além disso, especificamente para o casos metastáticos, vale ressaltar que as amostras de sangue foram coletadas durante o curso do tratamento das pacientes e YU et al. (2013) demonstraram a ocorrência de mudanças dinâmicas nas população de CTC quanto à expressão de marcadores da TEM como resposta ao tratamento.

A análise estatística para verificar possíveis associações entre as populações de CTC quanto à expressão de CKs e FOXC1 e as características clínico-patológicas das pacientes evidenciou, para o grupo M+, associação estatisticamente significativa entre o tamanho do tumor e a expressão de FOXC1 nas CTCs ($p= 0,036$): dentre aquelas que foram diagnosticadas como T4, 80% (4/5) apresentaram CTC^{FOXC1+} (**Tabela 3**). Os tumores T4 são classificados como aqueles que apresentam qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica (inclui costelas, músculos intercostais, músculo serrátil anterior, mas não inclui o músculo peitoral) ou à pele (SOBIN et al. 2012). Tais tumores são considerados como localmente

avancados e associados ao pior prognóstico (GIORDANO 2003). Portanto, a característica de invasão local desse tipo de tumor poderia justificar a associação encontrada com a presença de CTC expressando marcador da TEM.

A presença de CTC^{FOXC1+} também apresentou associação estatisticamente significativa com o *status* de HER2 do tumor primário das pacientes do grupo M+ ($p=0,004$). Dentre as pacientes com tumor primário HER2+, 83,33% (5/6) apresentou CTC^{FOXC1+} (**Tabela 3**). Não encontramos associações estatísticas entre as populações de CTC^{CK+} e CTC^{FOXC1+} e as características clínico-patológicas das pacientes do grupo M0 (**Anexo 7**)

Esses resultados foram surpreendentes uma vez que a literatura menciona FOXC1 como um potencial biomarcador para o câncer de mama basal *like* (RAY et al. 2010). YU et al. (2013) demonstraram que há um maior número de célula tumorais com expressão de marcadores mesenquimais em tumores triplo negativo. Entretanto, neste mesmo estudo, CTCs originárias de pacientes com tumores primários HER2+ apresentaram perfil mesenquimal, apesar de um baixo número de células com expressão combinada de marcadores epiteliais e mesenquimais serem encontradas no tumor primário. Enfatizando que nossos resultados demonstraram a relação entre a expressão de HER2 e de FOXC1 para os casos metastáticos.

Tabela 3 - Expressão de CKs e FOXC1 em CTCs de acordo com as características clínico-patológicas das pacientes do grupo M+

Variável	CKs		Total de pacientes	p	FOXC1		Total de pacientes	p
	+	-			+	-		
Idade (anos)*								
<48	3	11	14	0,535	6	7	13	0,114
≥ 48	1	7	8		0	5	5	
Total	3	18	22		6	12	18	
Tamanho do tumor (T)								
T1,T2,T3	2	12	14	1,000	2	9	11	0,036[‡]
T4	1	5	5		4	1	5	
Total	3	17	20		6	10	16	
Acometimento linfonodal (N)								
N0	2	7	9	1,000	1	6	7	0,559
N+	2	7	9		3	4	7	
Total	4	14	18		4	10	14	
Estadio clínico								
I,II,III	2	7	9	0,566	2	5	7	0,633
IV	1	10	11		4	5	9	
Total	3	17	20		6	10	16	
Grau histológico								
1	0	1	1	0,624	0	0	0	1,000
2	3	13	16		5	10	15	
3	1	2	3		0	1	1	
Total	4	16	20		5	11	16	
Índice Ki67								
≤10%	1	0	1	0,222	1	0	1	0,267
>10%	3	14	17		3	11	14	
Total	4	14	18		4	11	15	
Subtipo Molecular								
Luminal	3	11	14	1,000	4	9	13	0,076
Superexpressor de HER2	0	4	4		2	0	2	
Triplo Negativo	1	3	4		0	3	3	
Total	4	18	22		6	12	18	

Cont/Tabela 3

Status								
Hormonal								
RH-	1	6	7	1,000	0	4	4	0,245
RH+	3	12	15		6	8	14	
Total	4	18	22		6	12	18	
Status HER2								
HER2-	3	10	13	0,616	1	11	12	0,004[‡]
HER2+	1	8	9		5	1	6	
Total	4	18	22		6	12	18	
Número de sítios de metástase								
1	1	3	4	1,000	1	1	2	1,000
>1	3	15	18		5	11	16	
Total	4	18	22		6	12	18	
Terapia								
Primeira Linha	1	9	10	0,559	1	5	6	0,310
Segunda linha ou subsequentes	2	6	8		4	4	8	
Total	3	15	18		5	9	14	
Tipo de tratamento								
Hormônio-, imunoterapia ou ambos	1	5	6	1,000	3	1	4	0,083
Quimioterapia apenas ou associada a outros tipos	3	13	16		3	11	14	
Total	4	18	22		6	12	18	

O teste exato de Fisher (*2-sided*) foi realizado para identificação de diferenças estatísticas significativas.

Com relação à análise da expressão dos marcadores metabólicos na CTCs isoladas a partir da amostra de sangue de pacientes podemos observar na **Figura 19 (A-C)** que em ambos os grupos (M0 e M+) a maior porcentagem de pacientes apresentou CTC com positividade para os marcadores do metabolismo oxidativo: PGC-1a e COXIV comparada à expressão do marcador de glicólise aeróbica, MCT4. O grupo M+ apresentou 91% das pacientes com CTC^{PGC1a+}, 73% com CTC^{COXIV+} e 36% com CTC^{MCT4+} enquanto que o grupo M0 apresentou 95% das pacientes com CTC^{PGC1-a+}, 68% com CTC^{COXIV+} e 36% com CTC^{MCT4+}.

As **Figuras 19 D-F** se referem às imagens representativas das CTCs isoladas a partir de amostras de sangue das pacientes com câncer de mama e que foram submetidas à imunocitoquímica por dupla marcação utilizando os anticorpos anti PGC1-a, anti- COXIV ou anti-MCT4 juntamente com anti-CD45.

A análise estatística para verificar possíveis associações entre as populações de CTC evidenciou para o grupo M0, uma associação significativamente estatística entre o *status* da doença e a expressão de MCT4 nas CTCs ($p=0,022$) (**Tabela 4**). Além disso, as pacientes que apresentavam CTC^{MCT4-} apresentaram menor tempo de sobrevida livre de progressão de doença se comparadas àquelas com CTC^{MCT4+} ($p=0,026$) (**Figura 20**).

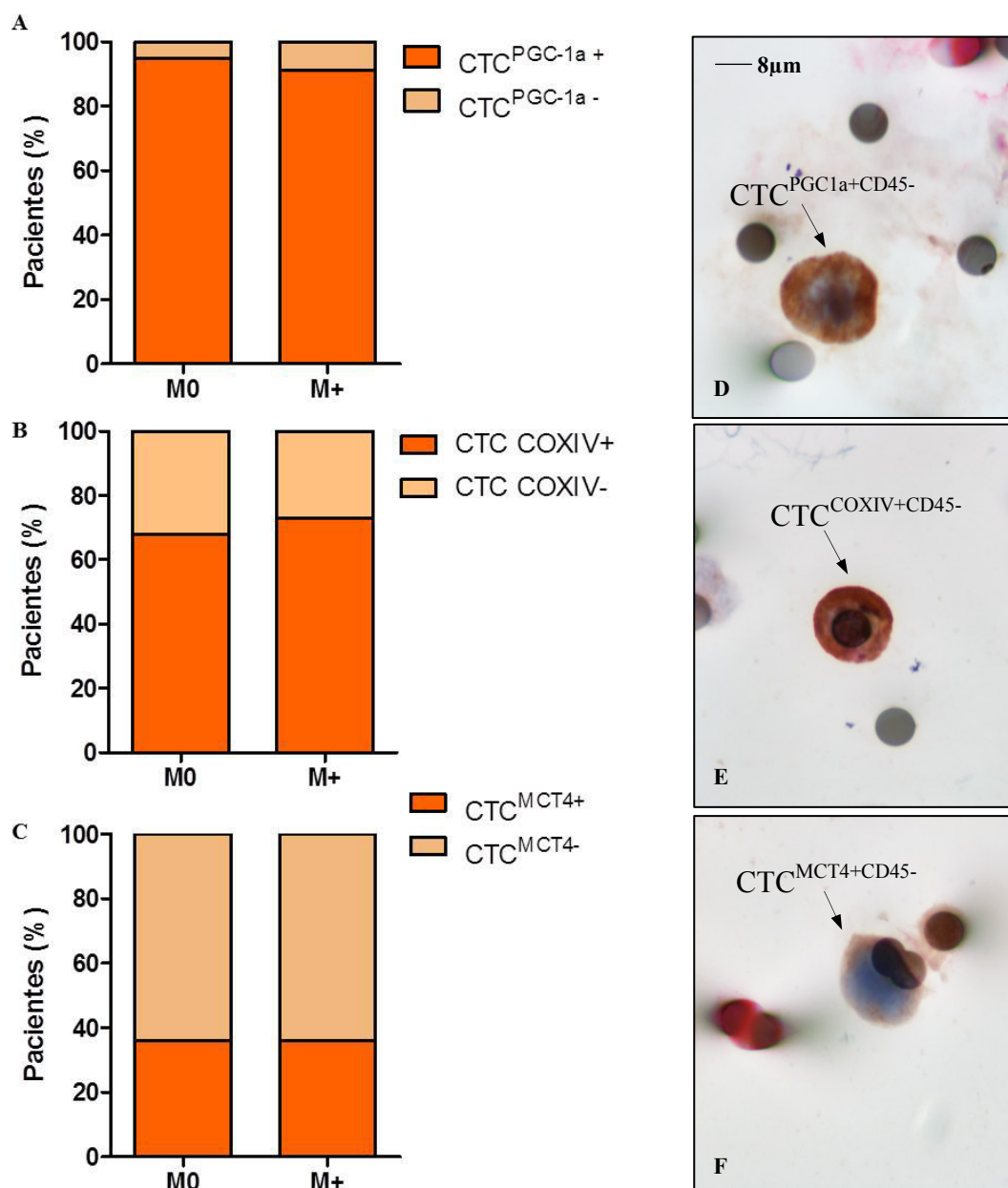


Figura 19 - Expressão dos marcadores metabólicos (PGC-1a, COXIV e MCT4) em CTCs isoladas de amostras de sangue de pacientes com câncer mama. A-C: Distribuição percentual de pacientes com câncer de mama não metastático (M0) e metastático (M+) de acordo com a positividade e negatividade para marcadores metabólicos em CTCs. D-F: Imunocitoquímica por dupla marcação em membrana do ISET utilizando marcadores metabólicos e CD45 como marcador de leucócitos. D: CTC positiva para PGC-1a e negativa para CD45. E: CTC positiva para COXIV e negativa para CD45. F: CTC positiva para MCT4 e negativa para CD45

Tabela 4 - Expressão de MCT4 em CTCs de acordo com o *status* da doença para o grupo M0

<i>Status</i> da doença	Expressão de MCT4 (CTC)		Total	p
	Presença	Ausência		
Estáve/Remissão	8	7	15	0,022
Progressão	0	7	7	
Total	8	14	22	

*Dados referentes ao seguimento das pacientes de 2012 a 2015. O teste exato de Fisher (*2-sided*) foi realizado para identificação de diferenças estatísticas significativas.

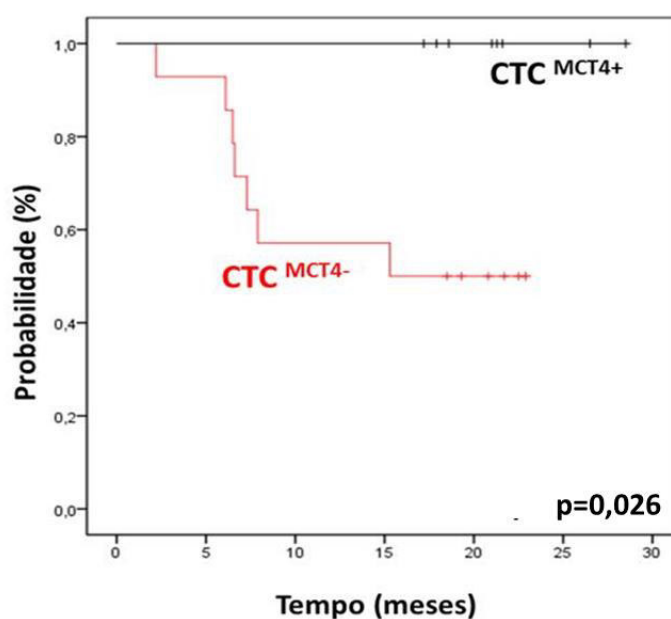


Figura 20 - Curva de sobrevida livre de progressão de doença de acordo com a expressão de MCT4 em CTCs isoladas a partir do grupo de pacientes M0 ($p=0,026$).

A baixa prevalência da positividade de MCT4 e alta positividade de PGC-1a e COXIV nas CTCs demonstra um perfil metabólico mais voltado à ocorrência da fosforilação oxidativa que à glicólise aeróbica. É possível notar que a positividade para PGC-1a nas CTCs foi predominante se comparada aos demais marcadores metabólicos. LEBLEU et al. (2014) demonstraram

que CTCs de câncer de mama apresentam maior expressão de genes associados com a biogênese mitocondrial e fosforilação oxidativa como PGC-1a e COXIV.

4.1.3 Análise da expressão dos marcadores em linhagens de CTCs de câncer de mama

A realização do estágio no exterior durante o doutorado viabilizou a inclusão da análise de algumas das linhagens de CTCs de câncer de mama.

Tais linhagens foram geradas a partir do isolamento de CTCs do sangue periférico de pacientes com câncer de mama luminal metastático usando o CTC-ichip. Tais células foram mantidas em condições não aderentes já que apresentaram senescência quando mantidas em monocamada aderente (YU et al. 2014).

Especificamente foram incluídas em nosso estudo as linhagens BRX68 e BRX142 cujas características estão descritas no **Quadro 10**.

Quadro 10- Características das linhagens de CTCs incluídas neste estudo

Linhagem de CTC	Característica do tumor originário	Mutações	Proliferação#	Tumorigênica
BRX68*	Ductal/Luminal (RE+,PR+,HER2-)*	TP53,ESR1, PIK3CA,MSN*	Média	Sim*
BRX142	Ductal/Luminal (RE+,PR+,HER2-)#	PIK3CA#	Alta	Sim#

*YU et al. (2014)

#Dados não publicados

A técnica de múltiplo-imunofluorescência que combina MSI e TSA foi utilizada para avaliar a expressão dos marcadores alvos deste estudo. Como marcador tumoral utilizamos anti-HER2, pois segundo dados não publicados do grupo dos Drs. Daniel Haber e Shyamala Maheswaran algumas linhagens de CTCs, embora isoladas de pacientes diagnosticadas com câncer de mama luminal HER2- metástático, apresentam subpopulações de células HER2+ e HER2-.

O objetivo em incluir a análise de HER2 deve-se ao resultado previamente apresentado de que, para o grupo M+, a presença de CTC^{FOXC1+} apresentou associação significativamente estatística com o *status* de HER2 no tumor primário das pacientes ($p=0,004$). Portanto, avaliamos se nas linhagens de CTCs haveria ou não relação entre a expressão de HER2 e de FOXC1.

A **Figura 21** reúne imagens representativas da expressão de HER2, FOXC1 e CKs nas linhagens BRX68 e BRX142, evidenciando a robustez da técnica aplicada em detectar individualmente o sinal fluorescente de cada marcador em diferentes compartimentos celulares.

Não foram encontradas diferenças significativamente estatísticas entre as linhagens BRX68 e BRX142 com relação à expressão de HER2, FOXC1 e CKs (**Figura 22**). Entretanto, para ambas as linhagens foi encontrada uma correlação positiva entre as expressões de HER2 e FOXC1: $r = 0,409; p=1,58e^{-31}$ (**Figura 23**). O valor de p no contexto desta análise indica a probabilidade do acaso explicar a correlação observada. Portanto, nossos resultados demonstram que tal probabilidade seria baixa, reforçando o achado

de que a variação na expressão de FOXC1 seria explicada ainda que moderadamente pela variação na expressão de HER2.

Aproximadamente 25-30% dos cânceres de mama apresentam superexpressão de HER2 e tal característica está relacionada a um pior prognóstico e menores taxas de sobrevida livre de doença (SLAMON et al. 1987). Embora HER2 represente um potente alvo terapêutico no contexto do câncer de mama, apenas cerca de 23% dos casos tratados com trastuzumabe respondem completamente à droga, indicando o desenvolvimento de resistência durante o tratamento (VOGEL et al. 2002).

Desta forma, muitos estudos têm focado na elucidação de mecanismos de resistência à terapia para os casos de câncer de mama HER2+. Evidências apontam que há uma relação entre a expressão de HER2 e o processo de TEM e que isto contribui para um maior potencial metastático e resistência ao tratamento. GUPTA e SRIVASTAVA (2014) demonstraram que a superexpressão estável de HER2 favorece a expressão de Snail e ZEB-1 (indutores da TEM) em células de câncer de mama. E que a regulação do processo de TEM por HER2 foi mediada pelo aumento na produção de TGF β . Além disso, a supressão da sinalização HER2/TGF β pela droga cucurbitacina B reverteu o processo de TEM, levando à redução de metástases em modelo animal de câncer de mama. WU et al. (2012), por sua vez, demonstraram que a superexpressão de Wnt3 ativa a via de sinalização Wnt/ β -catenina desencadeando eventos relacionados ao processo de TEM (aumento da expressão de N-caderina, Twist, Slug e diminuição de E-caderina) em linhagens de câncer de mama insensíveis ao trastuzumabe. Os autores

apontam que tal evidência representaria um importante mecanismo desencadeador da resistência ao trastuzumabe.

Tanto GUPTA e SRIVASTAVA (2014) quanto WU et al. (2012) demonstraram a relação entre a expressão de HER2 e a expressão de marcadores bem estabelecidos do processo de TEM como Snail, Slug e Twist; entretanto, YU et al. (2013) não detectaram a expressão destes e de outros marcadores bem estabelecidos do processo de TEM na população de CTC caracterizada como mesenquimal. Por outro lado, FOXC1 foi detectada. Além disso, subpopulações de CTCs caracterizadas pela presença de marcadores epiteliais e mesenquimais ou apenas mesenquimais foram encontradas em maior porcentagem nos casos HER2+ e triplo negativos.

Os resultados que obtivemos com as CTCs a partir de amostras de pacientes e linhagens de CTCs de câncer de mama metastático demonstram a existência de um possível mecanismo entre HER2 e FOXC1 a ser explorado, principalmente para o entendimento e modulação do processo de TEM no contexto de CTCs.

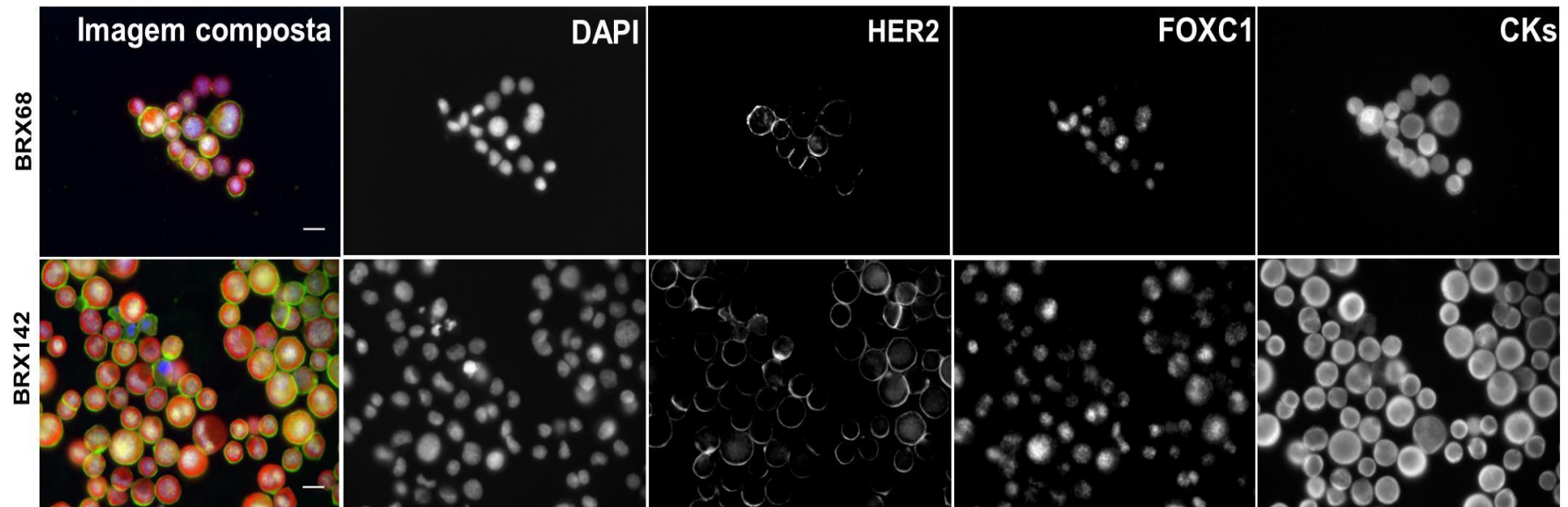


Figura 21 - Imagens representativas de células das linhagens de CTCs, BRX68 e BRX 142 imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (4 cores). HER2 (AF488), FOXC1(Cy3), CKs (Cy5) e DAPI. As imagens foram obtidas utilizando objetiva de 20X e sistema de microscopia multiespectral. Barra de escala = 10 μ m

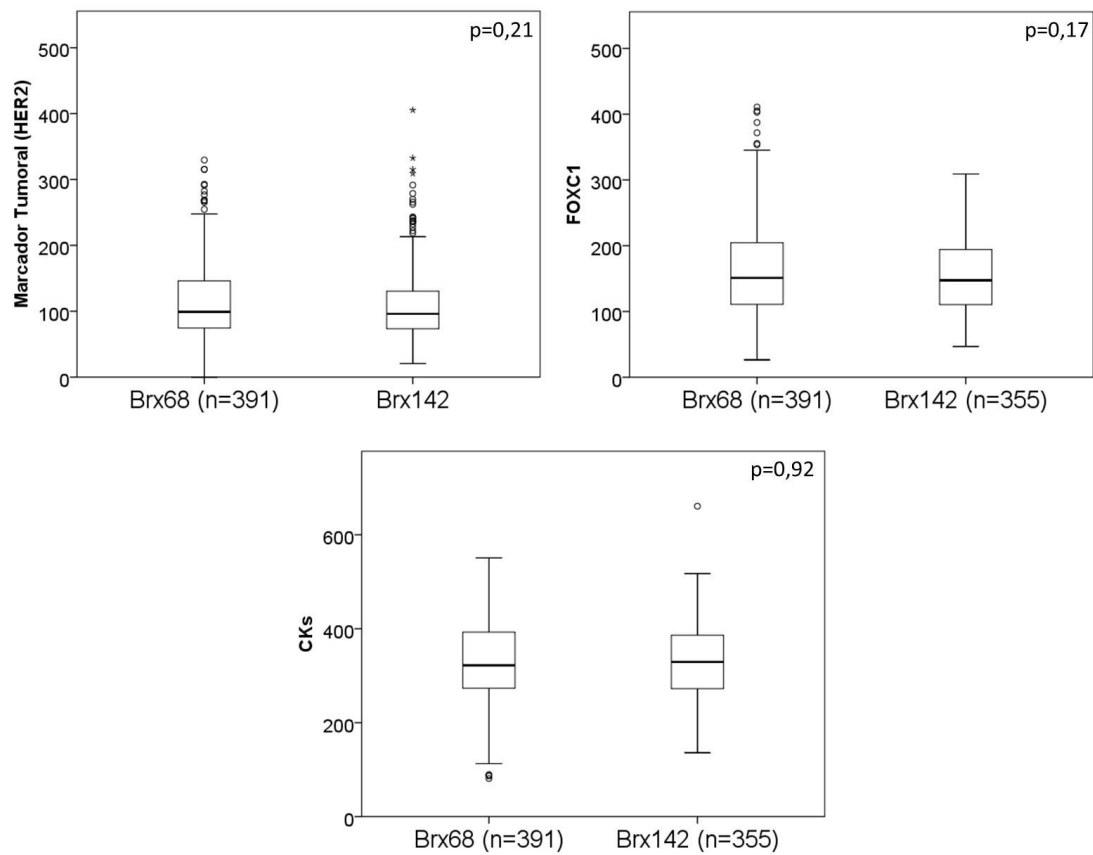


Figura 22 - Expressão de marcadores da TEM nas linhagens de CTCs. *Boxplots* mostrando os valores das medianas correspondentes ao sinal fluorescente de HER2, FOXC1 e CKs nas linhagens BRX68 e BRX142.

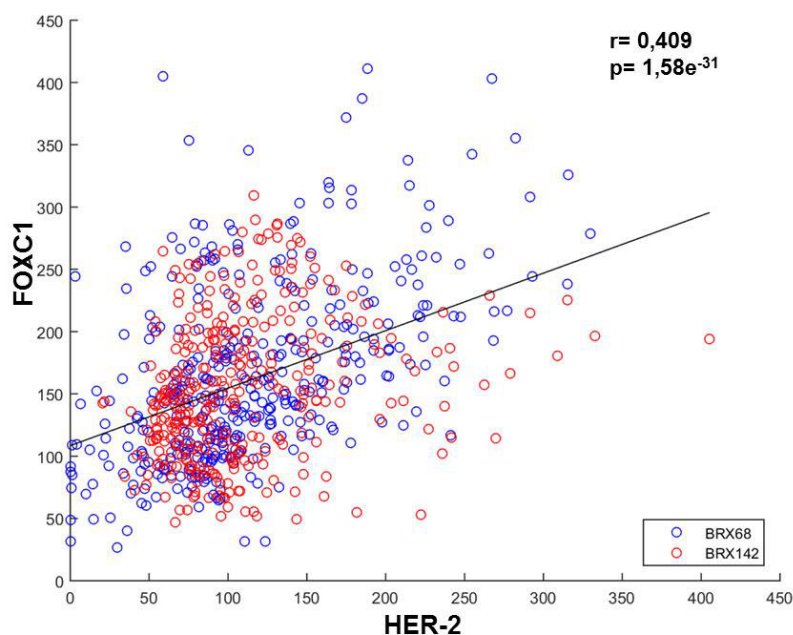


Figura 23 - Correlação entre a expressão de HER2 e FOXC1 nas linhagens de CTCs. Os gráficos mostram uma correlação positiva entre os valores correspondentes ao sinal fluorescente de HER2 e FOXC1 nas linhagens BRX68 e BRX142.

Para a análise dos marcadores metabólicos propostos (PGC-1a, COXIV, MCT4) utilizamos o protocolo de múltiplo-imunofluorescência de 5 cores, mantendo HER2 como o marcador tumoral das células de BRX68 e BRX142. Imagens representativas da expressão de tais marcadores nas linhagens BRX68 e BRX142 foram apresentadas na **Figura 24**.

Nossos resultados mostram diferenças estatísticas para a expressão de todos marcadores metabólicos estudados entre as linhagens de CTCs. A linhagem BRX 68 apresentou uma maior expressão para PGC1-a e MCT4 em comparação à BRX 142 ($p = 1,15e^{-55}$ e $p = 1,66e^{-22}$, respectivamente), que por sua vez apresentou uma maior expressão para COXIV ($p = 5,54 e^{-78}$) (**Figura 25**).

No contexto do metabolismo energético, PGC1- α está envolvido na indução da fosforilação oxidativa e a expressão ectópica deste fator de transcrição em células musculares culminou com a elevação nos níveis de COXIV (WU et al. 1999). Embora, BRX142 tenha apresentado uma menor expressão de PGC-1 α e maior expressão de COXIV em comparação com BRX68, tal linhagem celular apresentou correlação entre a expressão de PGC-1 α e COXIV ($r=0,59$; $p=4,88e^{-31}$) (**Figura 26A**).

Ao estabelecermos um *cut off* para o sinal fluorescente de PGC-1 α , COXIV e MCT4 (≥ 100 , ≥ 700 e ≥ 100 , respectivamente) para analisarmos a porcentagem de células com alta expressão de tais marcadores, observamos que 60% e 69% do total de células apresentam alta expressão para PGC-1 α e COXIV, respectivamente; enquanto que 33% das células apresentam alta expressão de MCT4 (**Figura 26B**). Os resultados obtidos para BRX142 foi semelhante ao encontrado para CTCs de ambos os grupos de pacientes M0 e M+: uma maior porcentagem de CTCs foram positivas para os marcadores do metabolismo oxidativo, CTC^{PGC1 α +} e CTC^{COXIV+}, quando comparado ao marcador de glicólise aeróbica, CTC^{MCT4+}.

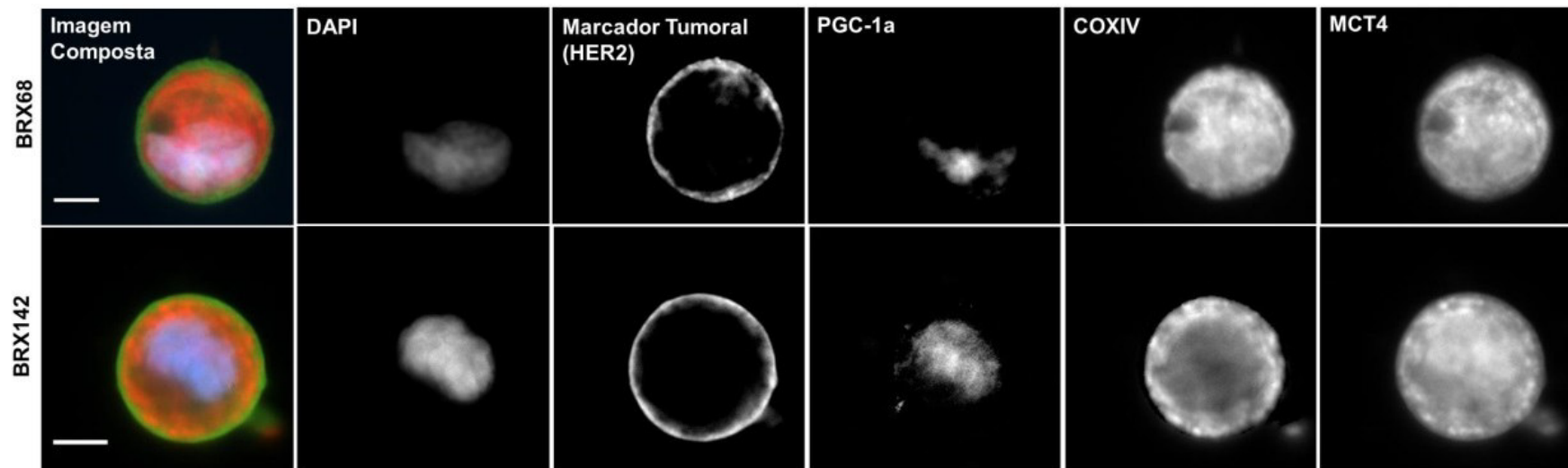


Figura 24 - Imagens representativas de células das linhagens de CTCs, BRX68 e BRX 142 imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (5 cores). HER2 (AF488), PGC-1a (Cy3), COXIV (AF594), MCT4 (Cy5) e DAPI. As imagens foram obtidas utilizando objetiva de 60X e sistema de microscopia multiespectral. Barra de escala = 5 μ m.

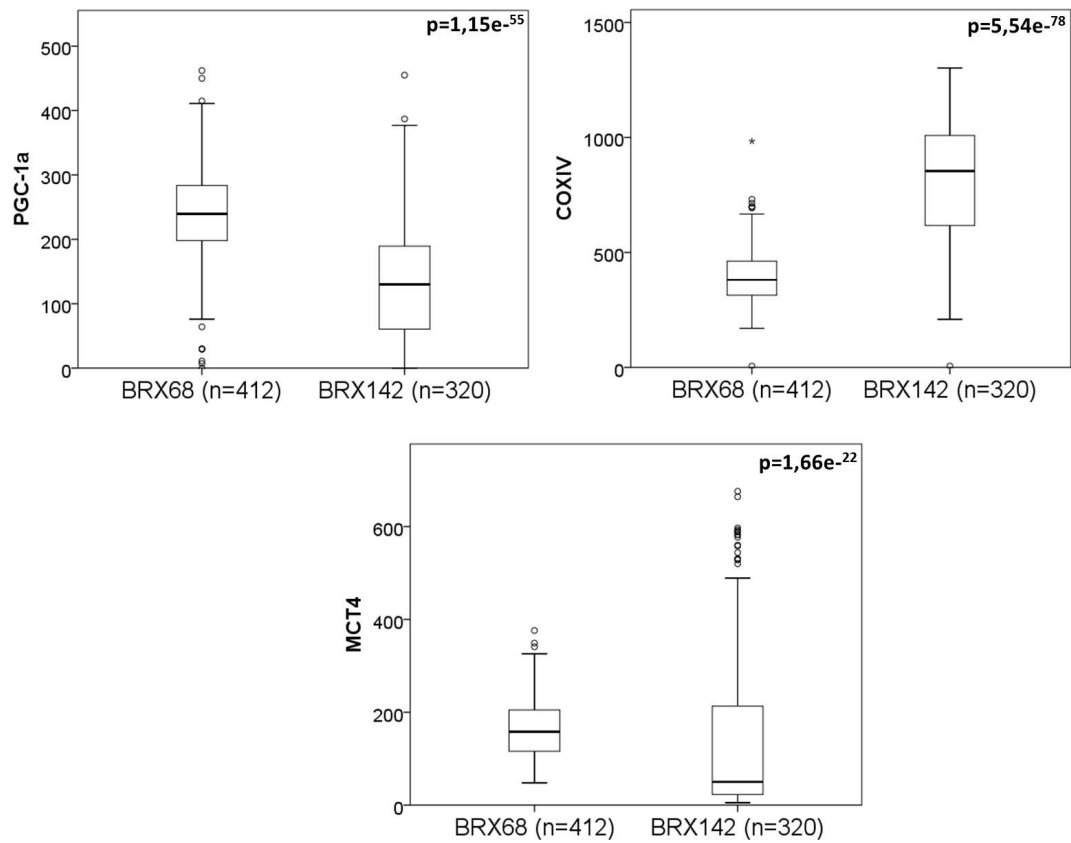


Figura 25 - Expressão quantitativa de marcadores metabólicos nas linhagens de CTCs. *Boxplots* mostrando os valores das medianas correspondentes ao sinal fluorescente de PGC-1a, COXIV e MCT4 nas linhagens BRX68 e BRX142.

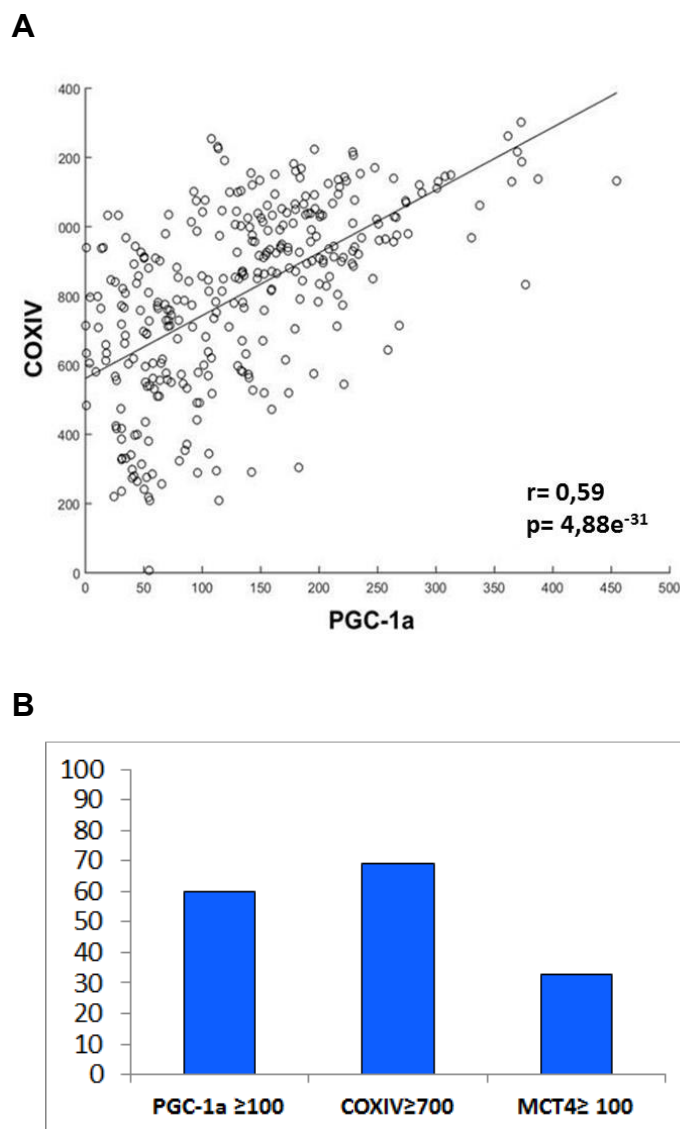


Figura 26 - Expressão dos marcadores metabólicos na linhagem de CTC BRX142. A: Correlação entre os valores correspondentes ao sinal fluorescente de PGC1-a e COXIV na linhagem BRX142. B: Porcentagem de células de BRX142 categorizadas usando o *cut off* do sinal fluorescente de PGC-1a ≥ 100 , COXIV ≥ 700 e MCT4 ≥ 100

4.1.4 Análise das amostras de tecido de câncer de mama

Após a análise de CTCs a partir das amostras de sangue periférico das pacientes do grupo M0 e M+, obtivemos amostras de tecidos das mesmas pacientes a partir blocos de parafina disponíveis no Banco de Tumores do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer

Center. Desta forma, obtivemos um total de 48 amostras sendo: 21 amostras de tecido primário das pacientes com doença não metastática, 13 amostras de tecido primário e 14 amostras de sítios metastáticos das pacientes com doença metastática.

A justificativa pela não obtenção da totalidade das amostras deve-se à ausência dos blocos de parafina nas dependências do departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center.

A técnica de múltiplo-imunofluorescência empregando MSI e TSA (4 e 5 cores) foi utilizada para análise dos marcadores da TEM e metabólicos nas amostras de tecido.

Primeiramente, realizamos a análise dos marcadores da TEM (FOXC1 e CKs) usando o mesmo protocolo aplicado às linhagens de CTCs. Com o diferencial de que obtivemos um valor de HScore para cada caso e procedemos as análises comparando as medianas dos HScores para cada marcador entre os diferentes grupos de amostras: tumor primário do grupo M0, tumor primário do grupo M+ e metástases. A **Figura 27** reúne imagens representativas da expressão dos marcadores da TEM em tumores primários de diferentes subtipos de câncer de mama (luminal, superexpressor de HER-2 e triplo negativo) e em amostra de metástases.

Não houve diferença estatística significativa para a expressão dos marcadores tumorais entre os 3 grupos ($p=0,39$). Em contrapartida, observamos diferença estatística significativa para os marcadores relacionados ao processo de TEM, FOXC1 e CKs ($p = 1,15e^{-4}$ e $0,03$, respectivamente) entre os 3 grupos (**Figura 28**).

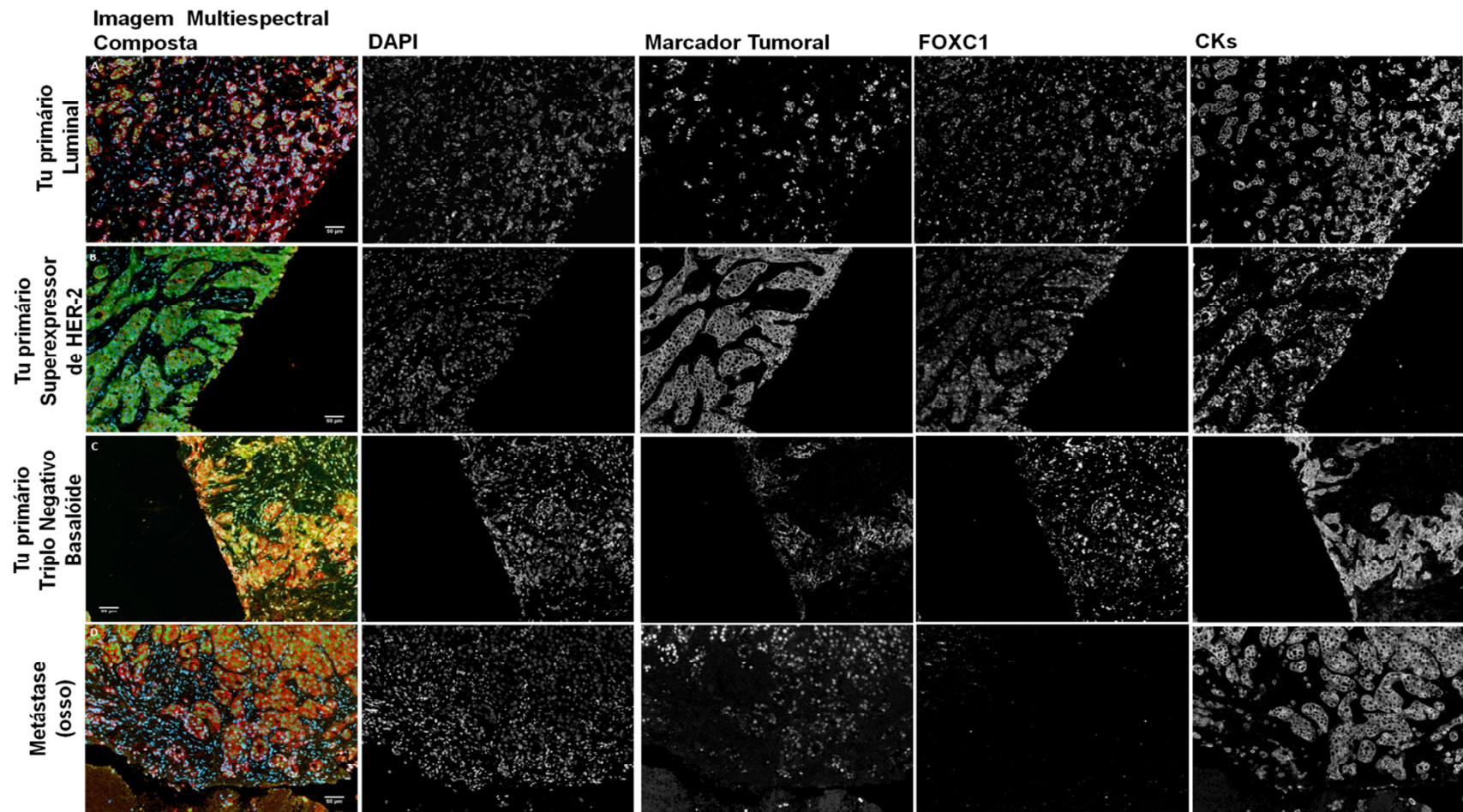
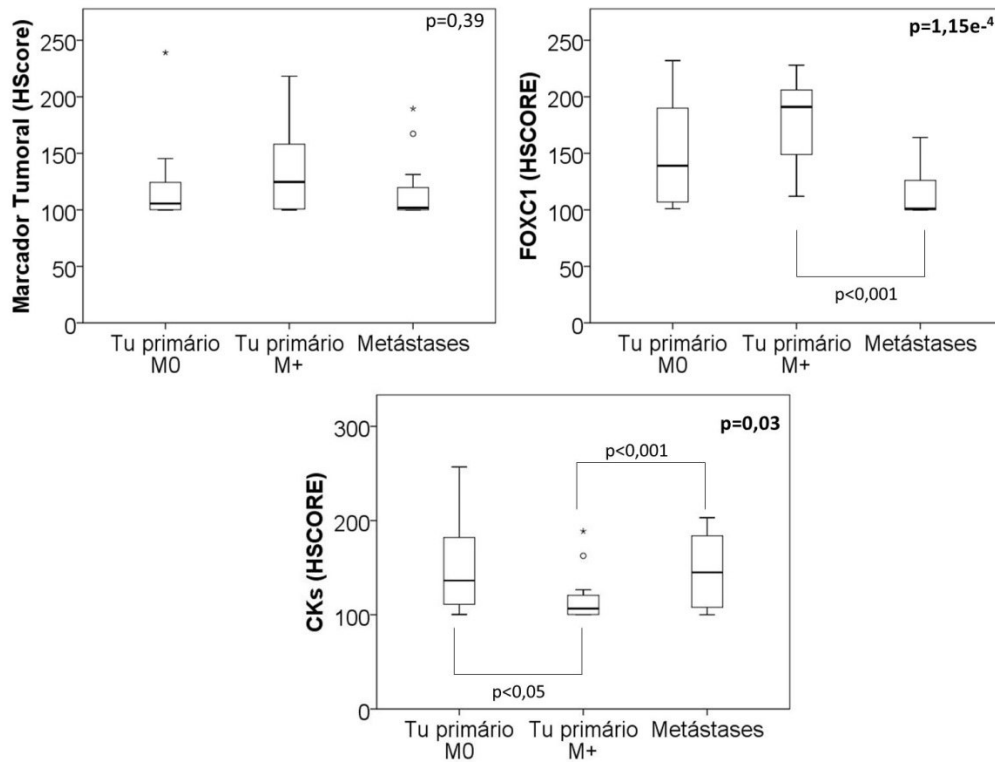


Figura 27 - Imagens representativas de amostras de tecido primário e metástases imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (4 cores). Marcador tumoral (RE, HER2 ou EGFR) (AF488), FOXC1 (Cy3), CKs(Cy5) e DAPI. As imagens foram obtidas utilizando objetiva de 20X e sistema de microscopia multiespectral. Barra de escala = 50 μ m.

A



B

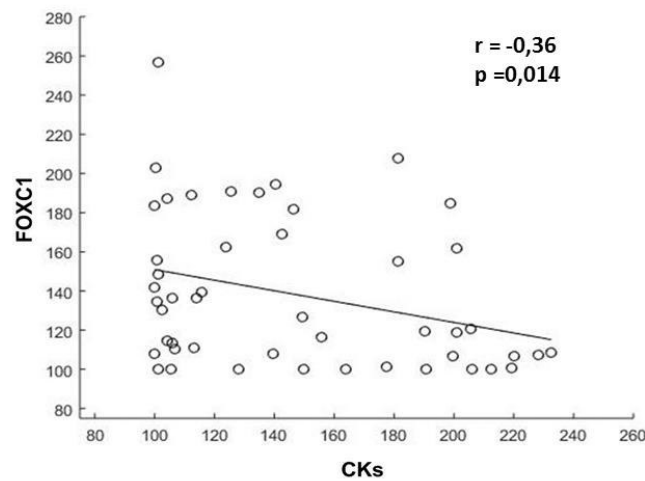


Figura 28 - Expressão de marcadores da TEM nas amostras de tecido primário dos diferentes grupos de pacientes (M0 e M+) e metástases. A: *Boxplots* mostrando os valores de HScore correspondentes ao sinal fluorescente dos marcadores tumorais (RE, HER2 e EGFR), FOXC1 e CKs B: Correlação entre os valores de HScore correspondentes ao sinal fluorescente de FOXC1 e CKs apenas nos tumores primários.

A mediana dos HScores obtidos para os marcadores FOXC1 e CKs foi considerado como um *cut off* para a categorização dos casos em alta e baixa expressão dos respectivos marcadores (\geq mediana e $<$ mediana, respectivamente). Para o grupo M0 encontramos associações estatísticas entre a expressão de FOXC1 e o grau histológico ($p=0,020$). Os dados mostraram que dentre aquelas pacientes que apresentaram alta expressão de FOXC1 no tecido primário 63,63% (7/11) foram diagnosticadas com grau histológico 3 (pouco diferenciado) (**Tabela 5**).

A partir dos dados obtidos com as amostras dos tecidos e CTCs, analisamos a concordância da expressão de FOXC1 e CKs entre tais amostras para os grupos M0 e M+ (**Tabelas 6 e 7**). Como a técnica para o isolamento e análise de CTCs utilizada neste estudo não nos permitia a quantificação da intensidade de marcação nas células, baseamos-nos na ausência ou presença do marcador nas CTCs *versus* a baixa ou alta expressão dos mesmos nos tecidos utilizando a mediana dos HScores como *cut off*. Para o grupo M0, obtivemos uma taxa global de concordância de 58% e 53% respectivamente para expressão de CKs e FOXC1. Para o grupo M+, a taxa global de concordância foi de 53% e 41%. A análise utilizando o coeficiente Kappa (κ) demonstrou para os dois grupos de pacientes uma concordância fraca da expressão de CKs ($\kappa =0,16$ para o grupo M0 e $\kappa =0,09$ para o grupo M+) e não concordância da expressão de FOXC1 ($\kappa <0$ para ambos os grupos) entre as amostras de tecidos e CTCs.

Tabela 5 - Expressão tecidual de CKs e FOXC1 em relação às características clínico-patológicas, CTCs e CTMs do grupo M0

Variável	CK		Total de pacientes	p	FOXC1		Total de pacientes	p
	Alta	Baixa			Alta	Baixa		
Idade (anos)*								
<45	8	5	13	0,673	9	4	13	0,080
≥ 45	4	4	8		2	6	8	
Total	8	9	21		11	10	21	
T								
T1,T2,T3	11	8	19	1,000	10	9	19	1,000
T4	1	1	2		1	1	2	
Total	12	9	21		11	10	21	
N								
N0	6	5	11	1,000	4	7	11	0,198
N+	2	4	10		7	3	10	
Total	12	9	21		11	10	21	
Estádio clínico								
I,II	7	7	14	0,642	6	8	14	0,361
III	5	2	7		5	2	7	
Total	12	9	21		11	10	21	
Grau histológico								
1	3	0	3	0,240	0	3	3	0,020[‡]
2	4	6	10		4	6	10	
3	5	3	8		7	1	8	
Total	12	9	21	11	10	21		
Índice Ki67								
≤10%	3	1	4	0,591	0	4	4	0,087
>10%	8	8	16		10	6	16	
Total	11	9	20		10	10	20	
Subtipo								
Molecular								
Luminal	7	5	12	1,000	4	8	12	0,077
Superexpressor de HER2	1	1	2		1	1	2	
Triplo Negativo	4	3	7		6	1	7	
Total	9	12	21	11	10	21		

Cont/Tabela 5

Status								
hormonal								
RH-	5	4	9	1,000	7	2	9	0,080
RH+	7	5	12		4	8	12	
Total	12	9	21		11	10	21	
Status HER2								
HER2-	11	7	18	0,553	9	9	18	1,000
HER2+	1	2	3		2	1	3	
Total	12	9	21		11	10	21	
CTC								
≤1,5	9	5	12	0,397	6	8	14	0,361
>1,5	3	4	9		5	2	7	
Total	12	9	21		11	10	21	
CTM								
Ausência	12	7	19	0,171	9	10	19	0,476
Presença	0	2	2		2	0	2	
Total	12	9	21		11	10	21	
Progressão								
Ausência	11	6	17	0,272	9	8	17	1,000
Presença	1	3	4		2	2	4	
Total	12	9	21		11	10	21	

O teste exato de Fisher (2-sided) foi realizado para identificação de diferenças estatísticas significativas

Tabela 6 - Concordância da expressão de CKs e FOXC1 entre amostras de tecido primário e CTCs de pacientes do grupo M0

Tumor Primário (M0)	CTC		Total	Kappa
	CKs ^{Neg}	CKs ^{Pos}		
CKs ^{Baixa}	6	4	10	
CKs ^{Alta}	4	5	9	0,16
Total	10	9	19	
	FOXC1			
	FOXC1 ^{Neg}	FOXC1 ^{Pos}		
FOXC1 ^{Baixa}	8	5	12	
FOXC1 ^{Alta}	4	2	7	<0
Total	12	7	19	

Tabela 7 - Concordância da expressão de CKs e FOXC1 entre amostras de tecido e CTCs de pacientes do grupo M+

Tumor Primário ou metástases (M+)	CTC		Total	Kappa
	CKs ^{Neg}	CKs ^{Pos}		
CKs ^{Baixa}	7	1	8	
CKs ^{Alta}	7	2	9	0,09
Total	14	3	17	
	FOXC1			
	FOXC1 ^{Neg}	FOXC1 ^{Pos}		
FOXC1 ^{Baixa}	6	1	7	
FOXC1 ^{Alta}	9	1	10	<0
Total	15	2	17	

A transição epitélio-mesênquima contribui para que as células tumorais invadam o tecido estromal adjacente, migrem por vias linfática e/ou hematogênica e gerem metástases (OLTEAN et al. 2006; HUGO et al. 2007). Especificamente no contexto da disseminação hematogênica, este processo não apenas contribui para habilidade das células tumorais em infiltrarem vasos sanguíneos, gerando CTCs, como também para a sobrevivência dessas células na corrente sanguínea (plaquetas protegem CTCs na circulação e estimulam à TEM via TGF β e NF- κ β) (LABELLE et al. 2011; YU et al. 2013) e extravasamento para órgãos distantes, com consequente ativação do processo reverso a TEM, denominado transição mesênquimo-epitelial (TME) que, por sua vez, contribui para a colonização das células tumorais em tais órgãos, manifestando-se assim como uma lesão metastática. Segundo alguns autores, a ocorrência de MET promove, às células tumorais circulantes metastáticas, a recuperação das características morfológicas e fenotípicas similares às do tumor primário, justificando assim porque metástases derivadas de carcinomas geralmente se assemelham ao tumor primário (BRABLETZ et al. 2001).

A maioria dos estudos relacionados à TEM/TME exploram marcadores bem estabelecidos desses processos como Slug, Snail, Twist (PEINADO et al. 2007). Nosso estudo tem o diferencial de abordar o fator de transcrição FOXC1 cuja expressão, diferentemente de tais marcadores, foi detectada por YU et al. (2013) em CTCs.

Nossos resultados vão de encontro à teoria dos eventos de TEM/TME já que a expressão de FOXC1, indutor da TEM, foi maior nos tumores

primários que nas metástases de pacientes com câncer de mama metastático ($p < 0,001$), enquanto que a expressão de CKs foi maior nas metástases em comparação aos tumores primários do grupo M+ ($p < 0,001$), o que poderia representar a recuperação do fenótipo do tumor primário promovido pelo processo de TME. Ressaltamos ainda que a expressão de CKs nos tumores primários de pacientes que apresentaram metástases foi menor que a expressão nos tumores primário de pacientes sem metástases ($p < 0,05$), sendo a diminuição da expressão de CKs uma característica também relacionada ao processo de TEM. Outro dado deste estudo que também nos remete à ocorrência da TEM foi a correlação inversa encontrada quanto às expressões de FOXC1 e CKs ($r = -0,36; p = 0,014$).

Do ponto de vista clínico, nossos resultados demonstraram, para os casos não metastáticos, a associação da expressão de FOXC1 no tecido primário com o grau histológico 3 (pouco diferenciado), considerado um fator de pior prognóstico no câncer de mama (CIANFROCCA e GOLDSTEIN 2004).

A não ou baixa concordância da expressão de FOXC1 e CKs entre as amostras de tecido e CTCs que o presente estudo evidenciou pode estar relacionada à plasticidade característica do processo de TEM. Ou seja, devido à dinâmica de tal processo, CTCs com características parciais ou completas desse processo podem estar presentes na corrente sanguínea. Além disso, não se sabe ainda o momento exato em que o processo de TME se inicia, se ainda na corrente sanguínea ou após o extravasamento para órgãos distantes.

Para análise dos marcadores metabólicos nas amostras de tecidos (PGC-1a, COXIV, MCT4) empregamos o protocolo de múltiplo-imunofluorescência de 5 cores. Como tais marcadores não são câncer-específicos, decidimos utilizar CKs como marcador tumoral, pois na reação de 4 cores observamos uma marcação com boa qualidade e distinção satisfatória das células tumorais nas amostras de tecidos. Imagens representativas da imunomarcção para os marcadores mencionados estão reunidas na **Figura 29**.

Observamos diferença estatística significativa para expressão de PGC-1a ($p=0,031$), COXIV ($p=1,9e^{-6}$) e MCT4 ($p=4,13e^{-6}$) entre os 3 grupos. O teste *post hoc* de Dunn demonstrou que há uma maior expressão de PGC-1a nas metástases em comparação com o tecido primário do grupo M+ ($p<0,05$), enquanto que a expressão de COXIV e MCT4 foi maior nas amostras de tumor primário do grupo M+ comparadas às metástases ($p\leq 0,001$). Além disso, observamos uma correlação entre a expressão de PGC-1a e COXIV nos tumores primários ($r= 0,60$; $p = 2,34e^{-4}$) (**Figura 30 A-B**).

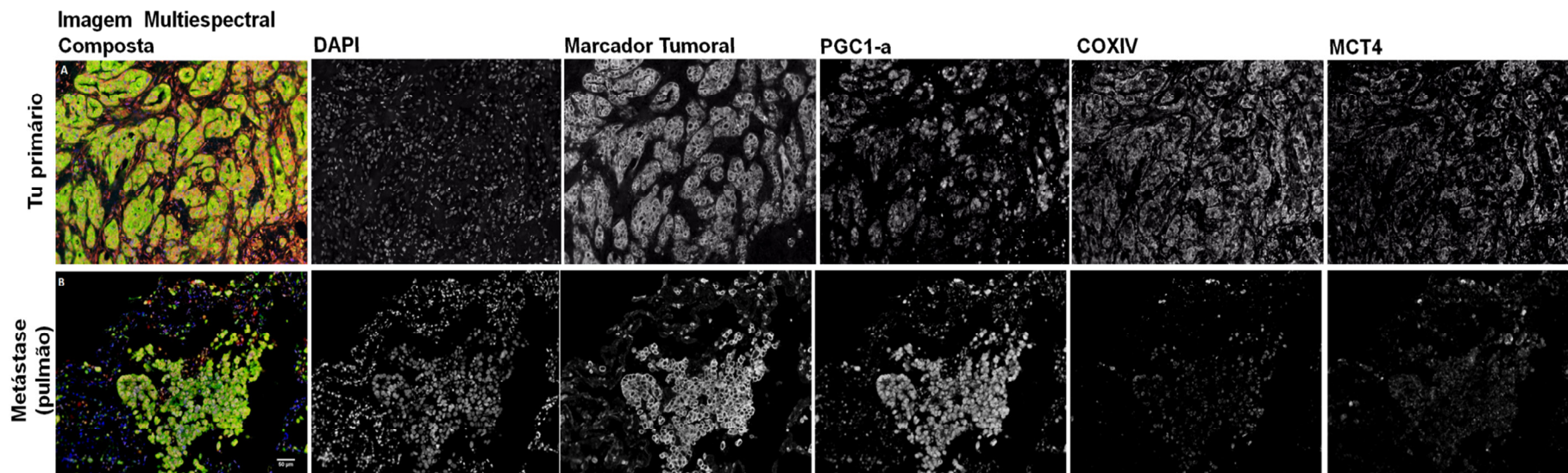
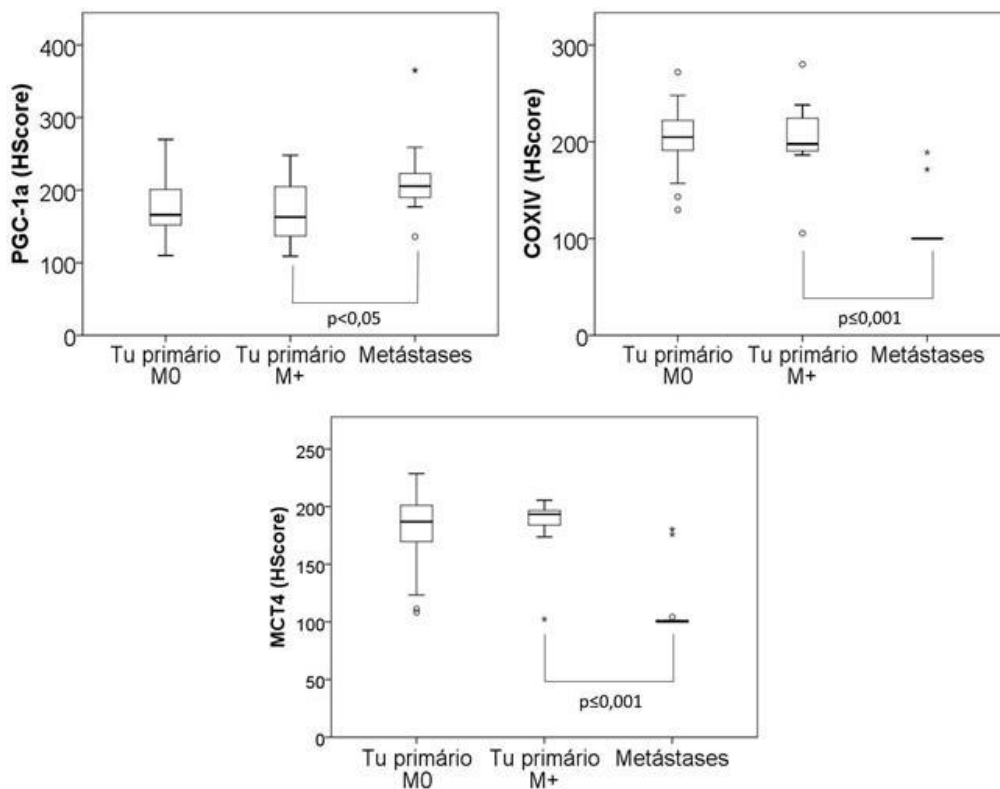


Figura 29 - Imagens representativas de amostras de tecido primário e metástases imunomarcadas utilizando o protocolo de múltiplo-imunofluorescência (5 cores). Marcador tumoral/CKs (AF488), PGC-1a (Cy3), COXIV(AF594), MCT4 (Cy5) e DAPI. As imagens foram obtidas utilizando objetiva de 20X e sistema de microscopia multiespectral. Barra de escala = 50 μ m

A



B

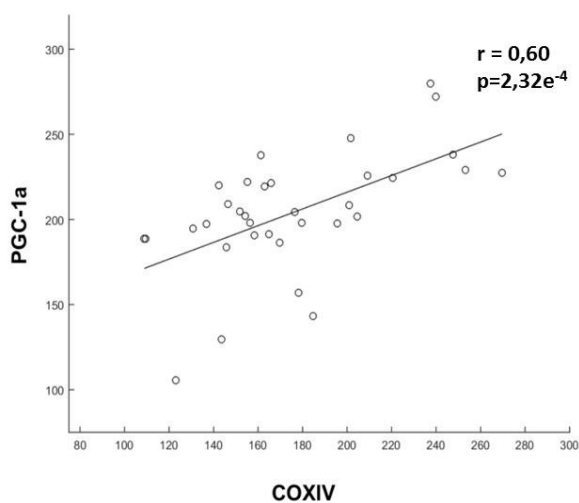


Figura 30 - Expressão quantitativa de marcadores metabólicos nas amostras de tecido primário dos diferentes grupos de pacientes (M0 e M+) e metástases. A: *Boxplots* mostrando os valores de HScore correspondentes ao sinal fluorescente de PGC-1a, COXIV e MCT4. B: Correlação entre os valores de HScore correspondentes ao sinal fluorescente de PGC-1a e COXIV nos tumores primários.

Nenhuma associação com significância estatística foi encontrada entre a expressão dos marcadores metabólicos e os dados clínico-patológicos das pacientes do grupo M0 e M+ (**Anexo 8**). Especificamente para análise da expressão de PGC-1a, realizamos imunohistoquímica convencional em TMA contendo amostras de tumores de 161 pacientes com câncer de mama ductal invasivo. Houve associação significativamente estatística entre a alta expressão de PGC-1a em células invasivas (células isoladas ou pequenos grupos isolados de células, células na borda do tumor, e células que estavam invadindo o tecido adiposo e estroma) e metástases à distância ($p < 0,0001$), pior sobrevida livre de doença ($p < 0,0001$) e específica por câncer ($p < 0,0001$). Tais resultados foram integrados ao *paper* publicado por LEBLEU et al. (2014) (**Anexo 9 – Figura 8B-F**).

A análise da concordância da expressão de marcadores metabólicos entre as amostras de tecidos e CTCs para os diferentes grupos de pacientes demonstrou uma taxa de global de concordância de 58%, 32% e 37% respectivamente para expressão de PGC-1a, COXIV e MCT4 para o grupo M0. Para o grupo M+, a taxa global de concordância foi de 59%, 71% e 35%, respectivamente. A análise utilizando o coeficiente Kappa (κ) demonstrou que não há concordância da expressão de MCT4 ($\kappa < 0$) entre as amostras de tecidos e CTCs para ambos os grupos de pacientes. Entretanto, há uma concordância fraca para a expressão de PGC-1a para ambos os grupos ($\kappa = 0,13$ para o grupo M+ e $\kappa = 0,12$ para o grupo M0), bem como concordância moderada da expressão de COXIV ($\kappa = 0,40$) para o grupo M+ e não concordância da expressão deste marcador para o grupo M0 ($\kappa < 0$) (**Tabelas 8 e 9**).

Tabela 8 - Concordância da expressão dos marcadores metabólicos entre amostras de tecido e CTCs do grupo M0.

Tumor Primário (M0)	CTC		Total	Kappa
	PGC-1a ^{Neg}	PGC-1a ^{Pos}		
PGC-1a ^{Baixa}	1	5	6	
PGC-1a ^{Alta}	0	13	13	0,12
Total	1	18	19	
	COXIV ^{Neg} COXIV ^{Pos}			
COXIV ^{Baixa}	1	3	4	
COXIV ^{Alta}	10	5	15	<0
Total	11	8	19	
	MCT4 ^{Neg} MCT4 ^{Pos}			
MCT4 ^{Baixa}	4	5	6	
MCT4 ^{Alta}	7	3	13	<0
Total	11	8	19	

Tabela 9 - Concordância da expressão dos marcadores metabólicos entre amostras de tecido e CTCs de pacientes do grupo M+.

Tumor Primário ou metástases (M+)	CTC		Total	Kappa
	PGC-1a ^{Neg}	PGC-1a ^{Pos}		
PGC-1a ^{Baixa}	1	7	8	
PGC-1a ^{Alta}	0	9	9	0,13
Total	1	16	17	
	COXIV ^{Neg} COXIV ^{Pos}			
COXIV ^{Baixa}	4	4	8	
COXIV ^{Alta}	1	8	9	0,40
Total	5	12	17	
	MCT4 ^{Neg} MCT4 ^{Pos}			
MCT4 ^{Baixa}	3	1	4	
MCT4 ^{Alta}	10	3	13	<0
Total	13	4	17	

As primeiras evidências de alteração no metabolismo das células cancerígenas foram descritas por Warburg: uma dependência da glicólise aeróbica para a geração de ATP, mesmo na presença de oxigênio devido a defeitos mitocondriais (WARBURG 1956). Entretanto, poderia apenas a glicólise aeróbica atender a todas as demandas metabólicas que conduzem ao crescimento do tumor e disseminação metastática, como sobrevivência na corrente sanguínea e adaptação a novos microambientes com diferentes taxas de oxigenação e exigências metabólicas?

Estudos recentes demonstram que muitos tumores não apresentam defeitos mitocondriais ou na habilidade em realizar fosforilação oxidativa, portanto, WARD e THOMPSON (2012) questionam a possibilidade da reprogramação metabólica não ter sido considerada por Warburg, argumentando, por exemplo, que tanto células quiescentes quanto proliferativas dependem do metabolismo mitocondrial, entretanto, com propósitos diferenciados.

Embora não haja um consenso na literatura, é geralmente aceito que a maioria das células tumorais circulantes de pacientes com câncer de mama são não proliferativas (MÜLLER et al. 2005). E segundo WARD e THOMPSON (2012) tais células garantem eficiência na produção de ATP pela fosforilação oxidativa, mantendo assim sua integridade.

LEBLEU et al. (2014) demonstraram um aumento na fosforilação oxidativa em CTCs se comparado às células do tumor primário e de metástases e que tal característica estava associada com aumento da expressão de PGC-1 α .

TAN et al. (2015) demonstraram que apenas células tumorais p^0 (com depleção do DNA mitocondrial/mtDNA) capazes de recuperar o mtDNA a partir do tecido hospedeiro geram células com potencial metastático *in vivo*, demonstrando, assim como LEBLEU et al. (2014), que a fosforilação oxidativa é um requisito essencial à progressão tumoral.

DUPUY et al. (2015) revelaram que os tumores primários de mama exibem uma grande heterogeneidade metabólica, mas que as células tumorais podem apresentar um perfil glicolítico ou oxidativo dependendo do local de metástase. Os autores citam que metástases hepáticas são caracterizadas pela ocorrência de glicólise enquanto que no pulmão e ossos há predomínio da fosforilação oxidativa.

Os trabalhos de LEBLEU et al. (2014), DUPUY et al. (2015) e TAN et al. (2015) foram realizados majoritariamente a partir de modelos animais de mama. Nosso estudo, por outro lado, baseou-se em amostras de pacientes com câncer de mama em diferentes estágios da progressão tumoral: tumor primário, CTCs e metástases. E, além de incluirmos marcadores como PGC-1 α e COXIV, avaliamos a expressão MCT4, marcador do efeito Warburg que tem sido muito questionado por mencionar a dependência das células tumorais pela glicólise aeróbica.

Como os demais estudos, evidenciamos, no contexto das CTCs, a importância da fosforilação oxidativa devido à predominância de CTC^{PGC-1 α +} e CTC^{COXIV+} em comparação à população CTC^{MCT4+} para ambos os grupos de pacientes (M0 e M+). A baixa ou não concordância da expressão dos marcadores entre amostras de tecidos e CTCs pode ser consequência da

reprogramação metabólica ocorrida durante a disseminação hematogênica, justificando também as diferenças encontradas para as expressões de PGC-1a, COXIV e MCT4 entre metástases e tecido primário (aumento da expressão de PGC-1a e perda da expressão de COXIV e MCT4).

Com relação ao desfecho clínico, nossos resultados demonstraram que a positividade para MCT4 em CTCs está relacionada a um maior tempo de sobrevida livre de progressão de doença ($p=0,026$). KERSHAW et al. (2015) otimizaram um método de imunofluorescência para detecção de MCT1 e MCT4 em CTCs visando inclusão do mesmo em um estudo clínico de fase 1 para a droga AZD3965 (inibidor de MCT1, mas MCT4 representa um possível mecanismo de resistência por continuar o transporte de lactato apesar da inibição de MCT1). O grupo reportou, a partir de amostras de 2 pacientes com câncer de pulmão de pequenas células (SCLC), uma clara divisão entre os níveis de expressão em diferentes CTCs da mesma amostra de sangue. Embora a maioria das células expressassem MCT4, uma subpopulação apresentou níveis mínimos de expressão deste marcador.

Analizamos também se haveria correlação entre a expressão dos marcadores metabólicos e da TEM alvos deste estudo. Os dados mostram uma forte correlação entre as expressões de MCT4 e CKs ($r= 0,758$; $p=0,003$) para o grupo M+ (**Figura 31**). Isto poderia explicar a baixa porcentagem de pacientes com a população CTC^{MCT4+} em circulação, uma vez que células do tumor primário com alta expressão de MCT4 poderiam representar uma população com baixa ocorrência da TEM pela maior expressão de CKs.

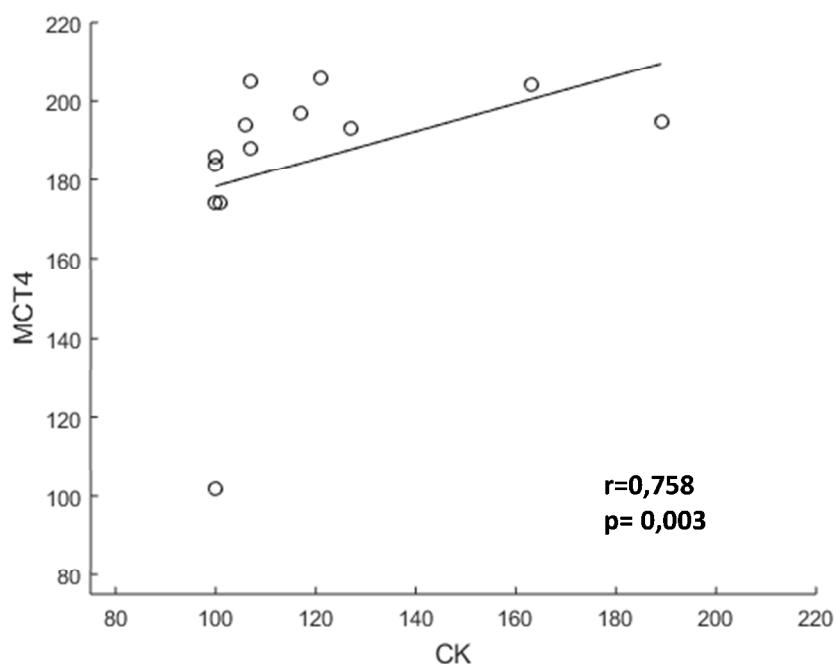


Figura 31 - Correlação entre os valores de HScore correspondentes ao sinal fluorescente de MCT4 e CK nos tumores primários do grupo M+.

4.1.5 Análise de CTCs, de marcadores metabólicos e da TEM em pacientes submetidas à terapia neoadjuvante

Como nosso estudo contou com a participação de pacientes em tratamento e sem tratamento, e mediante os resultados obtidos, decidimos realizar as mesmas análises ao final do tratamento de pacientes já incluídas no grupo M0 (n=5), mas que obtiveram indicação para a terapia neoadjuvante.

As características clínico-patológicas das pacientes, os dados do esquema terapêutico neoadjuvante recebido e resposta patológica encontram-se no **Anexo 10 (Tabela S10)**.

Amostras de sangue das pacientes selecionadas foram obtidas antes (*baseline*) e após o término do tratamento neoadjuvante e anteriormente à realização de cirurgia para remoção do tumor. Procedemos, então, a enumeração de CTCs, detecção de CTMs bem como imunocitoquímica por dupla marcação visando a análise de todos os marcadores alvos deste estudo. Realizamos ainda, utilizando a múltiplo-imunofluorescência, a análise de amostras de tumor primário pré e pós terapia de 1 paciente. Os dados de seguimento desta paciente constam no **Anexo 10 (Figura S4)**

Para as pacientes 1, 4 e 5 foi observado diminuição no número de CTCs após terapia neoadjuvante enquanto que as pacientes 2 e 3 apresentaram aumento no número de CTC (Figura 32). Comparativamente, as pacientes 1 e 2 receberam o mesmo esquema de quimioterapia, entretanto, a paciente 1 foi diagnosticada como Luminal B, HER2+ e a paciente 2 como Luminal B, HER2-; logo a paciente 1 foi beneficiada pela inclusão de trastuzumabe em seu esquema terapêutico o que poderia ter contribuído para a redução no número de CTCs, uma vez que CTCs^{HER2+} podem ter sido afetadas pela ação deste fármaco.

Além disso, é interessante ressaltar que a paciente 2 apresentou CTM antes e após o tratamento neoadjuvante, sendo detectado um aumento no número de CTMs : 1 CTM na amostra de sangue correspondente à *baseline* e 3 CTMs ao final do tratamento.

A paciente 3 foi diagnosticada por *core biopsy* como CDIS (carcinoma ductal *in situ*), entretanto a mesma apresentou acometimento linfonodal (N3) e a análise da peça cirúrgica após tratamento neoadjuvante apontou CDIS

residual tipo sólido e cribriforme, multifocal. Exemplificando, assim, a identificação de CTCs em um caso diagnosticado como CDIS.

Interessantemente, a população CTC^{PGC-1a+} foi a única detectada nas amostras de sangue de todas as pacientes antes e após tratamento neoadjuvante (**Quadro 11**) e PGC-1a foi o único marcador cuja expressão aumentou no tumor pós terapia (**Figura 33**).

Assim, especulamos se a expressão de PGC-1a poderia contribuir para a resistência à terapia no câncer de mama, pois dados já publicados na literatura mencionam que PGC-1a induz a expressão da enzima FASN (ácido graxo sintase) (BHALLA et al. 2011) e que a mesma está relacionada à aquisição de resistência a docetaxel, trastuzumabe e adriamicina em câncer de mama ou resistência intrínseca a gencitabina e radiação em câncer de pâncreas (THUPARI et al. 2001; MENENDEZ et al. 2004; VAZQUEZ-MARTIN et al. 2007; YANG et al. 2011).

Para o melanoma foi recentemente descrito uma resposta adaptativa à inibição de RAF envolvendo uma reprogramação metabólica do perfil glicolítico para fosforilação oxidativa em células com mutação em BRAF. A inibição da via ERK1/2 culminou com o aumento dos níveis de RNAm de PGC-1a e conseqüentemente indução da fosforilação oxidativa e sobrevivência das células (HAQ et al. 2013)

Mediante o exposto, questionamos: a expressão acentuada de PGC-1a em células tumorais do câncer de mama, culminaria com uma reprogramação metabólica, levando ao aumento da expressão de FASN e resistência à terapia?

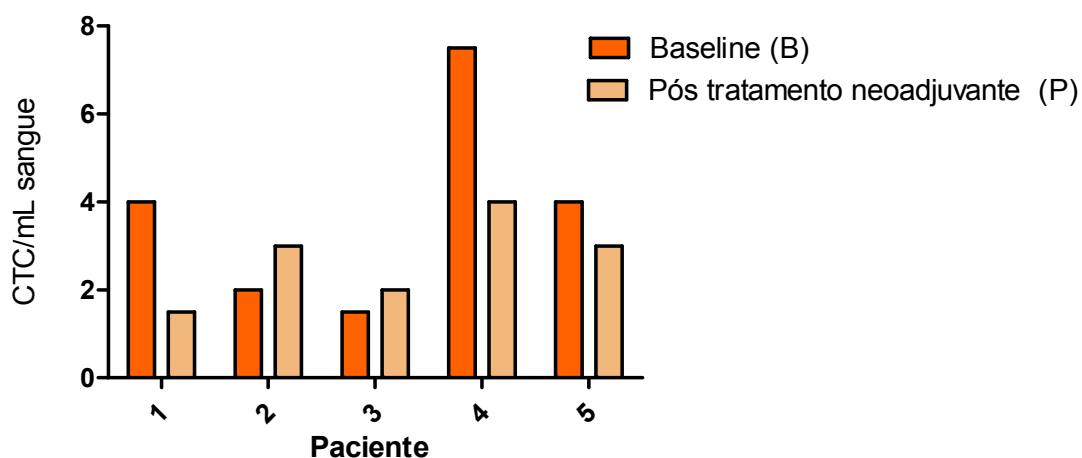


Figura 32 - Número de CTCs isoladas de amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama antes e após terapia neoadjuvante.

Quadro 11 - Número de CTCs, *status* de CTM e dos marcadores da TEM e do metabolismo em CTCs antes e após terapia neoadjuvante.

Número de CTCs, <i>status</i> de CTM e da expressão dos marcadores nas CTCs detectadas	CTC/mL de sangue		<i>Status</i> CTM/ amostra total de sangue		CK		FOXCl		PGC-1a		COXIV		MCT4	
	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P	B	P
	Pacientes													
1	4	1,5	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
2	2	3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	1,5	2	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4	7,5	4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
5	4	3	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+

B= *Baseline*; P = após terapia neoadjuvante

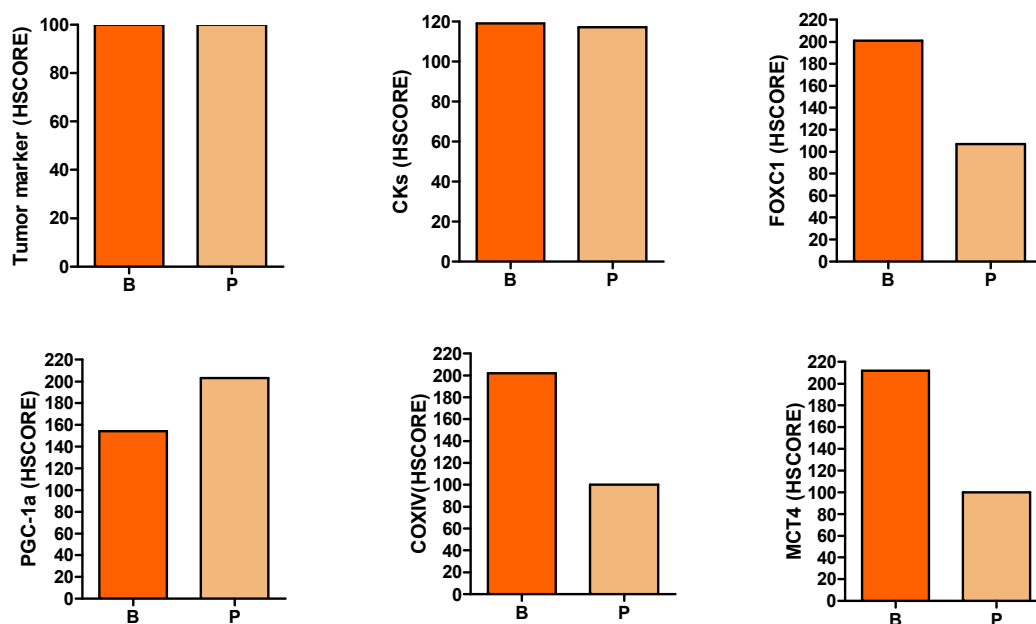


Figura 33 - Gráficos com os valores de HScore para os marcadores analisados antes e após terapia neoadjuvante.

4.2 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DINÂMICAS NA SINALIZAÇÃO CELULAR EM CTCs COMO RESPOSTA À TERAPIA EM MELANOMA COM MUTAÇÃO EM BRAF

4.2.1 Ensaios *in vitro*

A linhagem celular de melanoma com alto potencial metastático, denominada 113/6-4L, foi selecionada para realização deste estudo. A mesma foi obtida a partir de metástases espontâneas e difusas nos pulmões provenientes da linhagem WM239. A geração de metástases visíveis no pulmão por células 113/6-4L ocorre em cerca de 6 semanas enquanto que a parental requer de 4 a 6 meses (CRUZ-MUNOZ et al. 2008). Estudos com diferentes linhagens celulares de melanoma com mutação em BRAF mostram que a linhagem WM239, parental da linhagem 113/6-4L, possui a

mutação BRAF V600D (MILLS et al. 2009) responsável por aumentar em 700 vezes a atividade quinase de BRAF e por aumentar a ativação de ERK em cerca de 4 vezes (WAN et al. 2004).

Para o desenvolvimento da técnica de múltiplo-imunofluorescência específica para melanoma, selecionamos um painel de anticorpos a serem testados contra epítomos sabidamente expressos neste tipo de câncer: Melan-A, S100, anti-melanossomo (HMB45 clone), NG2 e tirosinase (BURG et al. 1998; BOYLE et al. 2002; PLAZA et al. 2007). Selecionamos então, baseado na especificidade da imunomarcação um coquetel com três anticorpos: anti-melanossoma/HMB45 clone, NG2/clone LHM-2 e tirosinase/clone T311. Para tal utilizamos a linhagem 113/6-4L como controle positivo da reação e a linhagem celular de câncer de pulmão (PC9) como controle negativo (**Figura 34**).

Os melanossomos são organelas responsáveis pela síntese, armazenamento e transporte de melanina (WASMEIER et al. 2008) e HMB45 refere-se ao clone que reage contra glicoconjugados presentes em melanossomos imaturos indicando uma formação ativa destas organelas e diferenciação melanocítica. O anti-melanossomo (clone HMB45) e NG2 foram eficazes no estudo de CORCORAN et al. (2013) para identificação de células tumorais em modelo animal. Além disso, CRUZ-MUNOZ et al. (2008) identificaram metástases pulmonares geradas por 113-6/4L pela imunomarcação com o anti-melanossomo (clone HMB45). E este marcador mostrou-se útil no diagnóstico diferencial do melanoma (SKELTON et al. 1991).

NG2 é um proteoglicano de membrana capaz de modular a adesão, proliferação e potencial metastático de células de melanoma (BURG et al. 1998). A tirosinase é uma enzima reguladora da biossíntese da melanina, sendo considerada como um potencial alvo da imunoterapia (YUAN et al. 2013) e o clone T311 foi eficaz no diagnóstico de melanoma em amostras de tecido (JUNGBLUTH et al. 2000).

Para explorar as mudanças dinâmicas na expressão de marcadores relacionados à resistência adquirida a inibidores da via MAPK, avaliamos primeiramente a sensibilidade da linhagem 113-6 /4L aos inibidores da RAF (vemurafenibe/PLX4032 e dabrafenibe/GSK2118436) e inibidores de MEK (trametinibe/ GSK2118436). Os valores de IC50 demonstraram que tal linhagem é mais sensível ao dabrafenibe (IC50: 0,042 μ M) e trametinibe (IC50:0,0097 μ M) do que ao vemurafenibe (IC50: 3,756 μ M) (**Figura 35**)

Embora dabrafenibe e vemurafenibe pertençam à mesma classe de drogas (inibidores da RAF), a potência *in vitro* de dabrafenibe é pelo menos 40 vezes maior do que a de vemurafenibe para o melanoma com a mutação BRAFV600E (IC50 para o dabrafenibe: 0,8 nM e IC50 para o vemurafenibe: 31 nM). Além disso, dabrafenibe também apresenta uma maior penetração no cérebro do que vemurafenibe e tem sido considerada como uma potencial droga para o tratamento de metástases cerebrais de melanoma (LAQUERRE et al. 2009; BOLLAG et al. 2010; MITTAPALLI et al. 2013).

Com base nos dados obtidos por viabilidade celular e na resposta clínica apresentada por pacientes com melanoma, selecionamos dabrafenibe e trametinibe para o nosso estudo.

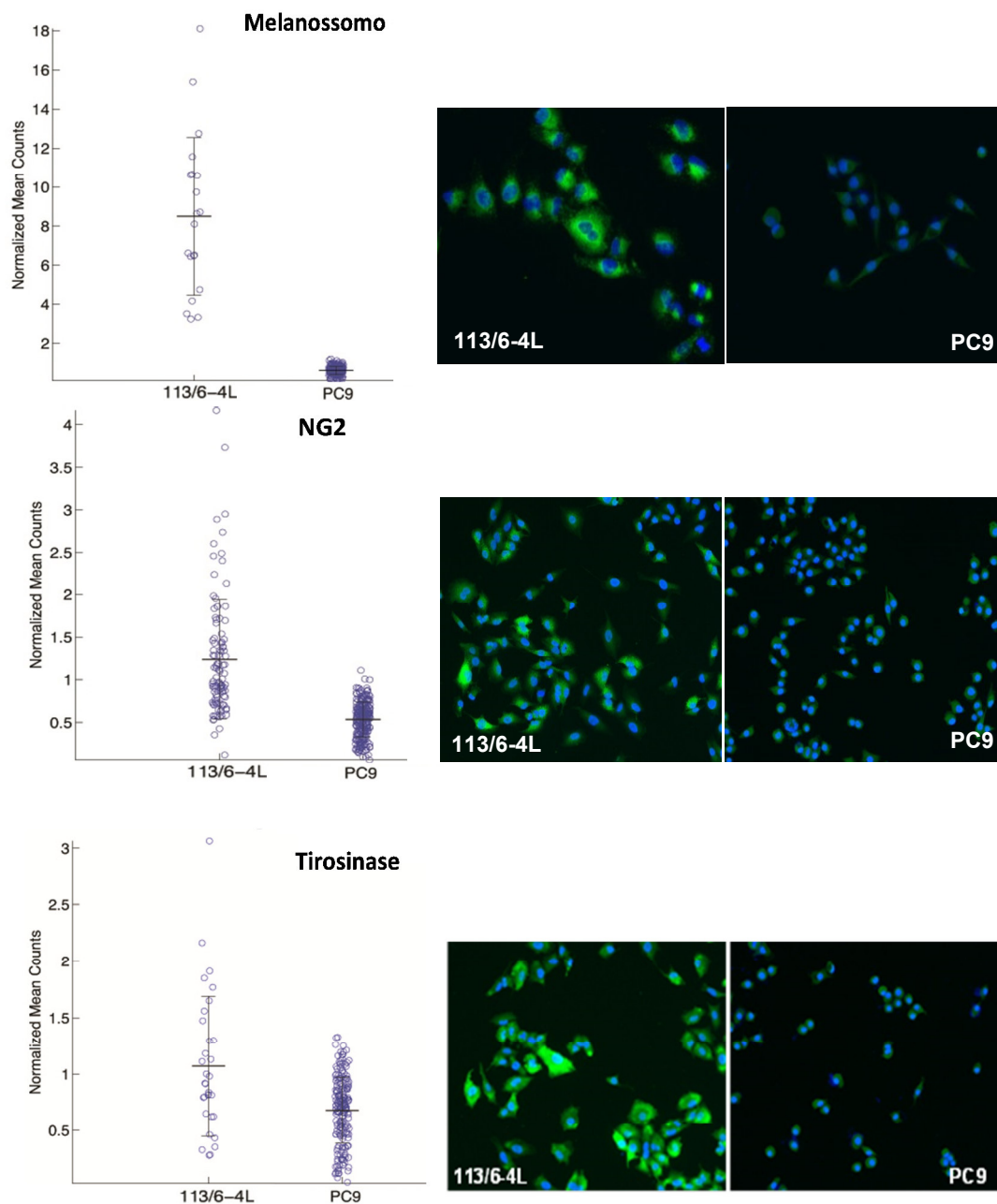


Figura 34 - Validação dos anticorpos para imunomarcção específica em melanoma. Os gráficos mostram o sinal fluorescente (TSA AF488) para cada um dos marcadores em células 113/6-4L (controle positivo) e PC9 (controle negativo). Imagens representativas das imunomarcções nas diferentes linhagens foram obtidas utilizando o sistema de microscopia multiespectral.

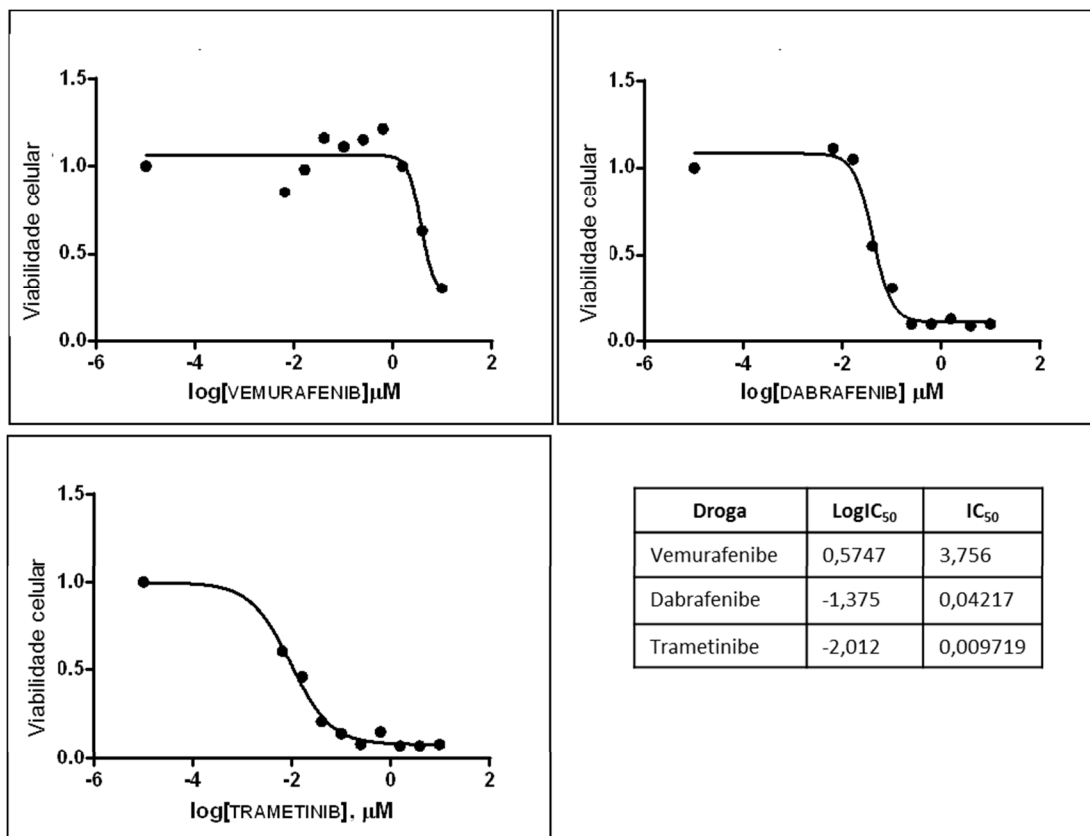


Figura 35 - Curva dose-resposta para a linhagem celular 113-6/4L para os inibidores da via MAPK.

Já que um dos objetivos do estudo era detectar alterações na expressão de componentes da via MAPK e de vias paralelas como PI3K-AKT em resposta à terapia, avaliamos o efeito de drogas dabrafenibe (inibidor de BRAF V600) e trametinibe (inibidor de MEK), isoladamente e em combinação, sobre a expressão de marcadores destas vias como pAKT, pERK, pS6, SPRY2 e DUSP6 utilizando as técnicas de *Western Blot* (**Figura 36**) e imunofluorescência (**Figura 37-39**).

Nossos resultados demonstraram um efeito rebote na sinalização de ERK após 24 horas de tratamento com dabrafenibe. Esse efeito é mais proeminente após 48 horas (**Figura 36 e 37**). Por outro lado, o mesmo não

foi observado ao se combinar dabrafenibe e trametinibe, mas sim uma forte inibição da expressão de pERK (**Figura 36**).

Um efeito rebote na expressão de pS6 não foi tão evidenciado para o ensaio *in vitro* com a linhagem 113-6/4L quanto para pERK (**Figura 36**).

Observamos também a ativação da sinalização AKT já que um aumento na fosforilação de AKT foi observada proeminentemente em 48 horas para todos os tratamentos (**Figura 36**). A inibição de RAF aumenta a sinalização de RTKs como PDGFR β e ERBB3, desencadeando a ativação paralela de vias de sinalização como PI3K-AKT, promovendo assim, a resistência à inibição da via ERK1/2 (**Figura 7**) (KUGEL e APLIN 2014).

Após o tratamento com inibidores de RAF, a duração da ação de DUSPs e SPRY é dependente do tempo de meia-vida de cada proteína, permitindo então que o mecanismo de *feedback* negativo perdure por algum tempo, mesmo depois de uma inibição inicial. Entretanto, a exposição prolongada a esse tipo de droga leva à degradação dessas proteínas, resultando na ativação de RTKs e uma consequente sinalização intracelular que induz a expressão de RAS-GTP e vias de sinalização paralelas como a via PI3K-AKT (LITO et al. 2013). Dessa forma, uma abordagem de terapia combinada faz-se necessária para superar este tipo de mecanismo de resistência contribuindo para a máxima atividade antitumoral. LITO et al. (2012) demonstraram que a combinação de inibidores seletivos de RAF e MEK resulta em uma inibição aumentada da sinalização de ERK e do crescimento tumoral em modelo animal.

Nossos resultados, utilizando a linhagem celular de melanoma com a mutação BRAF^{V600D}, estão de acordo com os dados previamente descritos para melanoma com a mutação BRAF^{V600E}. Especificamente, demonstramos que o tratamento inicial com dabrafenibe (6h) resultou na diminuição da expressão de pERK e em pequenas alterações na expressão de DUSP6 e SPRY2. Entretanto, a exposição prolongada da linhagem 113-6/4L a dabrafenibe desencadeou os seguintes eventos: reativação da sinalização de ERK, proeminente diminuição de DUSP6 e SPRY2 e aumento da expressão de pAKT (**Figuras 36-39**). Por outro lado, a combinação de dabrafenibe e trametinibe parece eliminar a resposta adaptativa que ocorre imediatamente após a exposição apenas à dabrafenibe (**Figura 36**).

O tratamento com trametinibe ou dabrafenibe isoladamente resultou em efeitos distintos sobre a sinalização de ERK. A ação de trametinibe foi semelhante àquela obtida com a combinação de dabrafenibe e trametinibe (**Figuras 36-39**). LITO et al. (2012) demonstraram que o efeito rebote da atividade de ERK é resistente ao inibidor de RAF, mas mostra-se sensível ao inibidor de MEK, e que a combinação de ambos leva à uma maior inibição de ERK e à atividade antitumoral.

Os dados que obtivemos não nos permite estabelecer uma associação entre o uso das combinações das drogas e a taxa de apoptose com base apenas na expressão de caspase 3-clivada (CC3) (**Figura 36**).

Uma vez que a técnica de imunofluorescência utilizando os marcadores individualmente nos permitiu detectar mudanças dinâmicas nos marcadores relacionados com a aquisição de resistência ao inibidor de RAF, o nosso

próximo passo foi desenvolver a metodologia de múltiplo-imunofluorescência aplicando MSI e TSA. Geramos uma biblioteca espectral composta pelo espectro individual de cada fluoróforo utilizado que permitiu, com êxito, a separação dos diferentes canais para a quantificação da intensidade de sinal fluorescente. Para tal, foi realizada a imunofluorescência para cada marcador alvo de estudo utilizando células da linhagem 113/6-4L que foram isoladas pelo CTC-ichip a partir de amostras de sangue de indivíduos saudáveis (**Figura 40**).

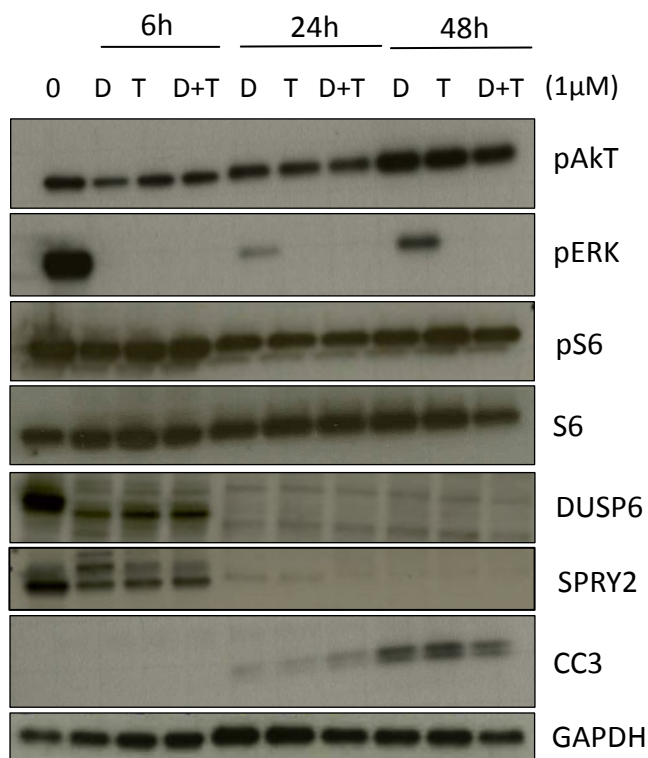


Figura 36 - Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de componentes das vias MAPK e PI3K-AKT. *Immunoblotting* mostrando alterações na expressão dos marcadores alvos do estudo de acordo com os diferentes tratamentos. A linhagem celular 113-6/4L foi tratada com dabrafenibe (1 μM), trametinibe (1 μM) ou com a combinação de ambas as drogas (1 μM de cada) por 6, 24 e 48h. t = total

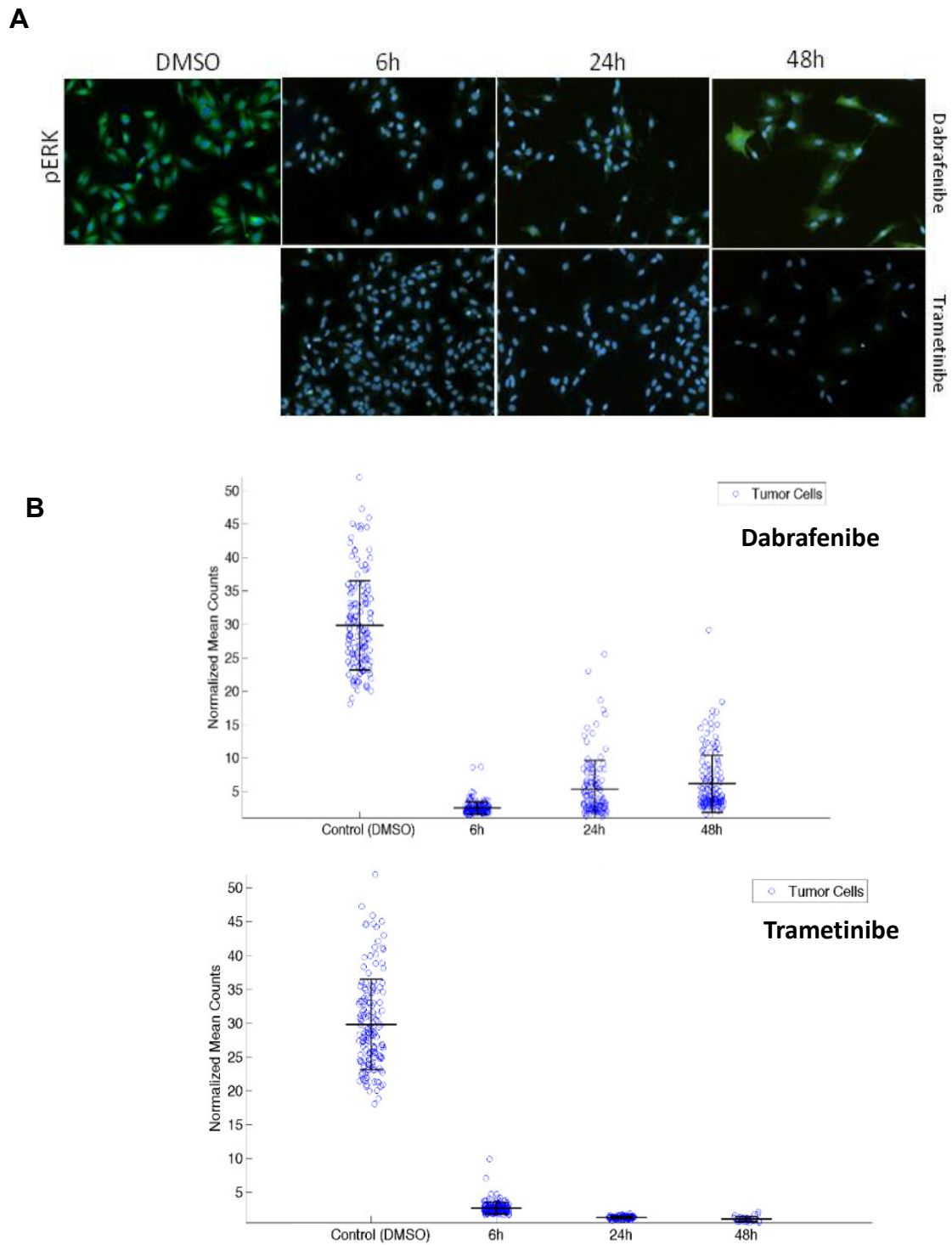


Figura 37 - Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de pERK. A: Imagens representativas da imunomarcação para pERK. B: Representa o gráfica do sinal fluorescente (TSA AF488) de pERK em células 113/6-4L de acordo com os diferentes tipos de tratamento.

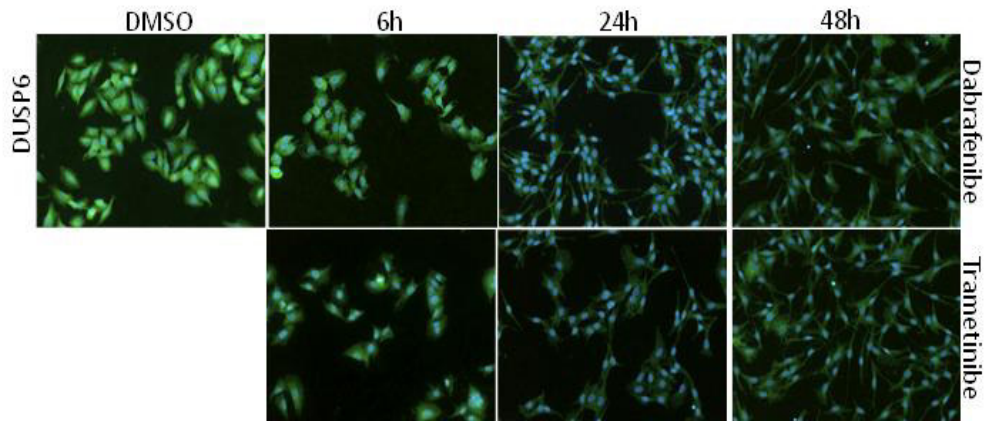
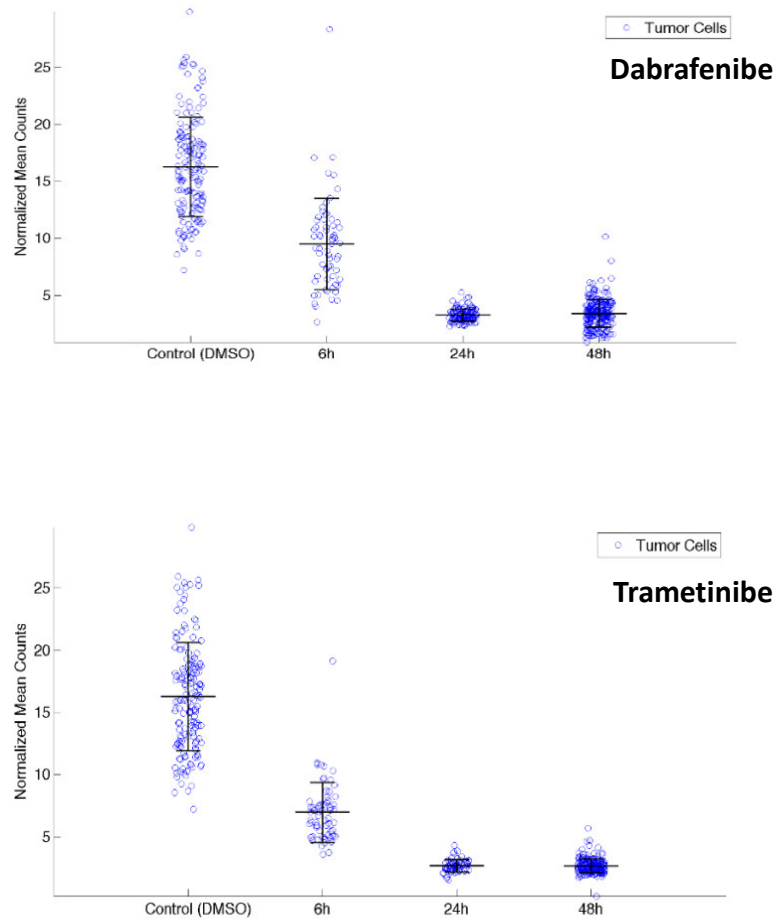
A**B**

Figura 38 - Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de DUSP6. A: Imagens representativas da imunomarcagem para DUSP6. B: Representação gráfica do sinal fluorescente (TSA 488) de DUSP6 em células 113/6-4L de acordo com os diferentes tipos de tratamento.

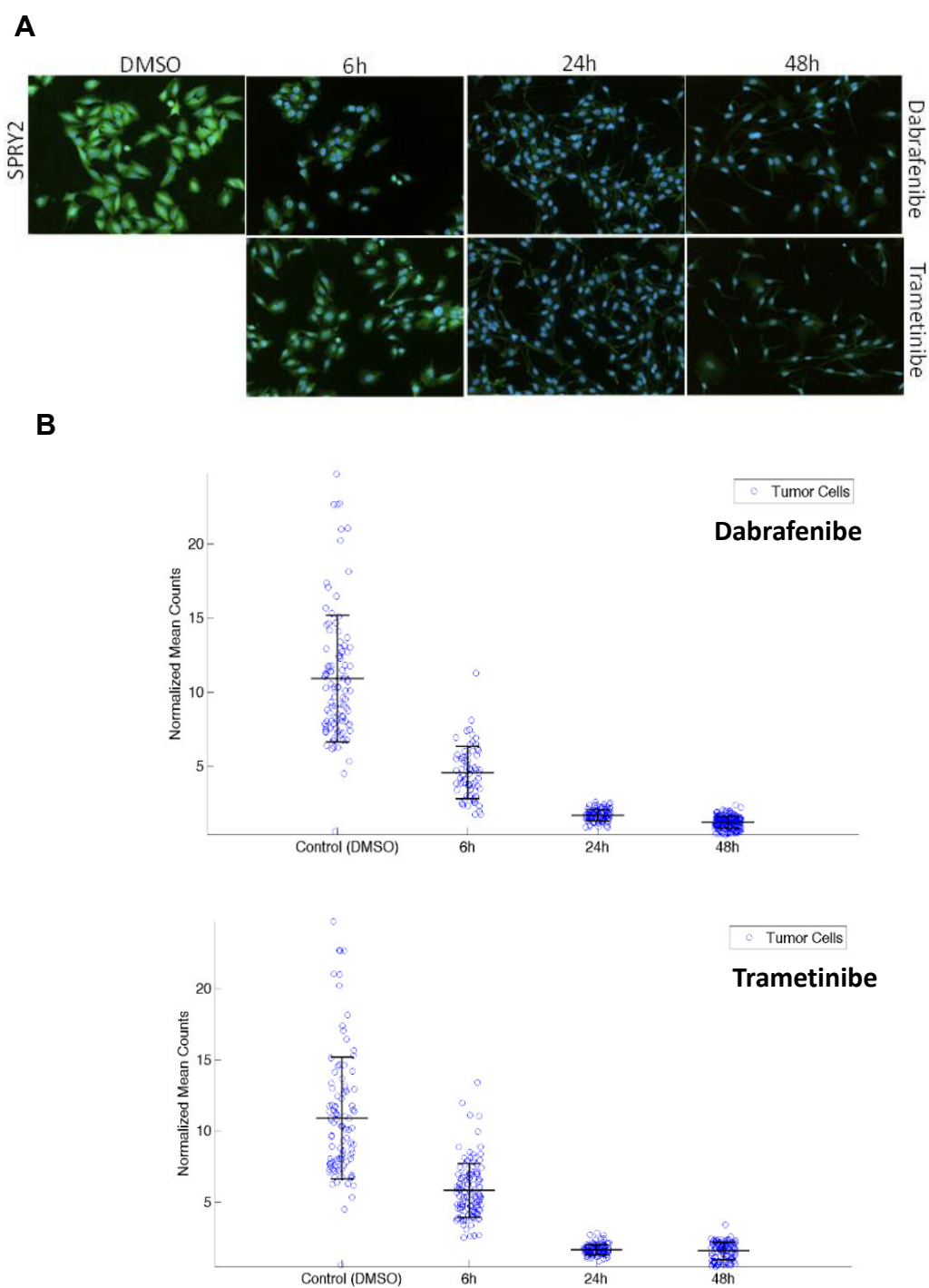


Figura 39 - Efeito dos inibidores de RAF e MEK sobre a expressão de SPRY2. A: Imagens representativas da imunomarcação para SPRY2. B: Representa o gráfica do sinal fluorescente (TSA 488) de SPRY2 em células 113/6-4L de acordo com os diferentes tipos de tratamento.

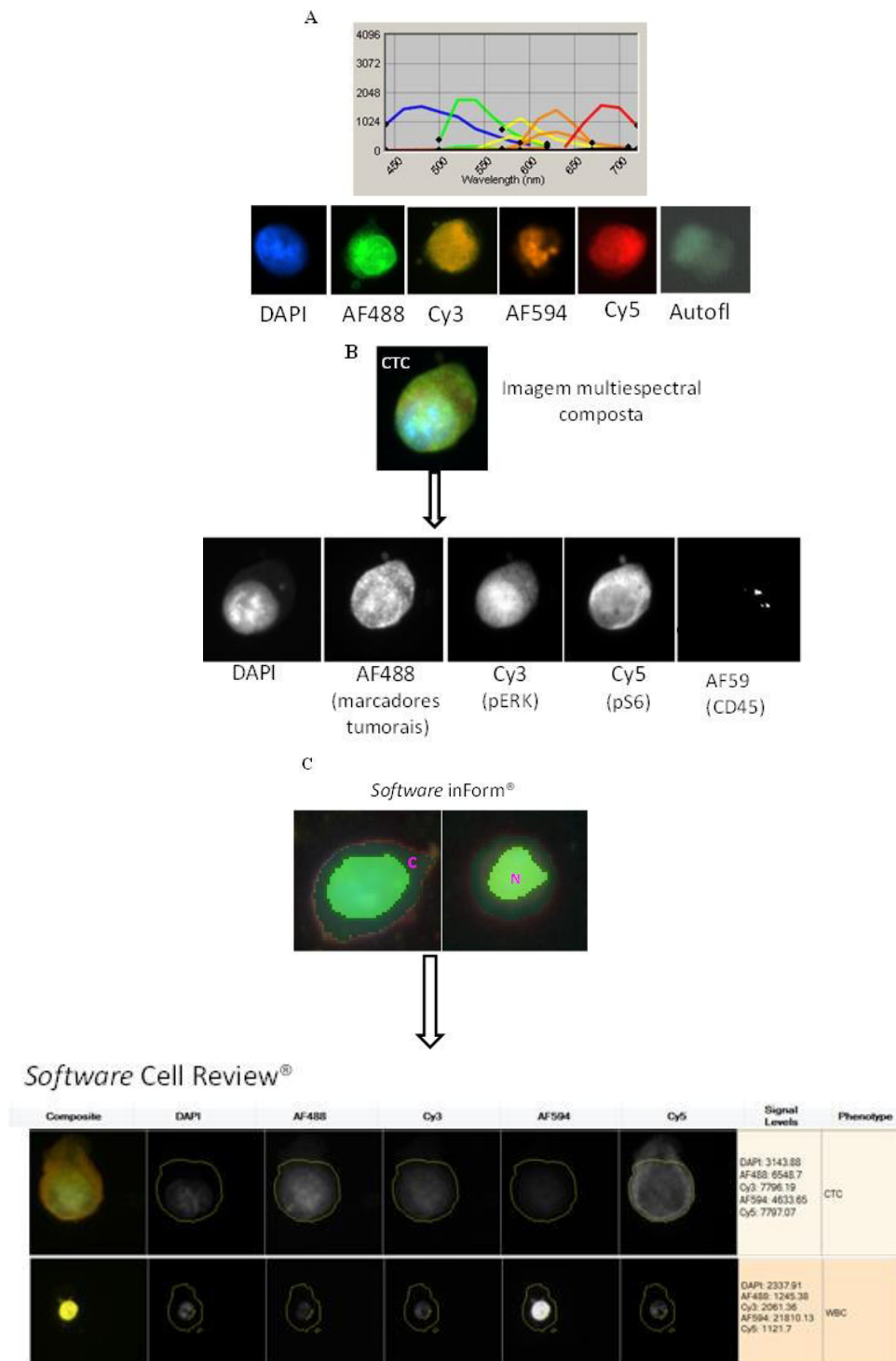


Figura 40 - Etapas do desenvolvimento de múltiplo-imunofluorescência para o melanoma. A: Biblioteca composta pelos espectros de cada fluoróforo incorporado ao ensaio. C: Separação dos espectros de cada fluoróforo incorporado ao ensaio. D: Segmentação celular e quantificação da intensidade do sinal fluorescente de cada marcador utilizando os softwares inForm® e Cell Review® (PerkinElmer). Autofl = autofluorescência. N = núcleo. C = citoplasma. WBC, do inglês *white blood cell*.

4.2.2 Ensaios *in vivo*

Devido à necessidade de padronização da metodologia desenvolvida, optamos por realizar ensaios *in vivo*. Para tal, a linhagem 113-6 / 4L GFP + estável foi gerada usando infecção por lentivírus. Uma população de células com alta expressão por GFP foi isolada pela técnica de sorteamento de células ativada por fluorescência (FACS) e tais células (5×10^6 células; 1:1 de células e Matrigel® *Basement Membrane Matrix High Concentration*/Corning) foram injetadas por via subcutânea no flanco de camundongos machos NOD/SCID/IL2 γ null (NSG). Após seis semanas, os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em diferentes braços de tratamento. Para esta coorte de animais (n=11), 6 deles não receberam nenhum tipo de tratamento, 2 receberam apenas uma dose de dabrafenibe (30 mg/kg) e foi sacrificado 4 horas após o tratamento, 3 receberam duas doses de dabrafenibe no intervalo de 16 horas. Os animais que receberam duas doses de dabrafenibe foram sacrificados 4 horas após a administração da segunda dose da droga.

A justificativa para o esquema de tratamento proposto neste estudo foi baseada no perfil farmacocinético de cada droga. Estudos farmacocinéticos clínicos realizados em camundongos, ratos, cães e macacos demonstraram um tempo de meia-vida curto de dabrafenibe para todas as espécies (0,3-3 horas). Já para o trametinibe, o tempo de meia-vida foi de cerca de 33 horas em camundongos (GILMARTIN et al. 2011).

Amostras de sangue dos camundongos (aproximadamente 1mL) foram coletadas por punção cardíaca em tubos *Streck vacutainer* e

processadas na plataforma CTC-ichip (módulo negativo) para posterior análise de CTCs utilizando a técnica de múltiplo-imunofluorescência (5 cores) que desenvolvemos.

A técnica de imunistoquímica para avaliar a expressão de GFP foi realizada em espécimes tumorais, tecidos dos pulmões e fígado dos camundongos. Os mesmos foram fixados em formalina e embebidos em parafina. A **Figura 41** mostra a presença de células GFP + no tumor primário e tecido dos pulmões dos camundongos, demonstrando que o modelo animal gerado a partir da linhagem celular de melanoma 113-6/4L foi desenvolvido com sucesso.

Para a aplicação da múltiplo-imunofluorescência às amostras de camundongos incluímos o anti-GFP (produzido em galinha) ao coquetel de anticorpos contra os epítomos específicos de melanoma, uma vez que as células 113-6/4L eram GFP+ e por consequência as CTCs geradas também o seriam. Nossos dados demonstram que a múltiplo-imunofluorescência empregando 5 cores nos permitiu distinguir com sucesso as população de CTCs dos leucócitos (média_{sinal marcador tumoral}: $0,64 \times 10^4$ *versus* média_{sinal marcador tumoral}: $0,12 \times 10^4$; média_{sinal CD45}: $0,24 \times 10^4$ *versus* média_{sinal CD45}: $2,6 \times 10^4$ para CTCs e leucócitos, respectivamente) (**Figura 42**).

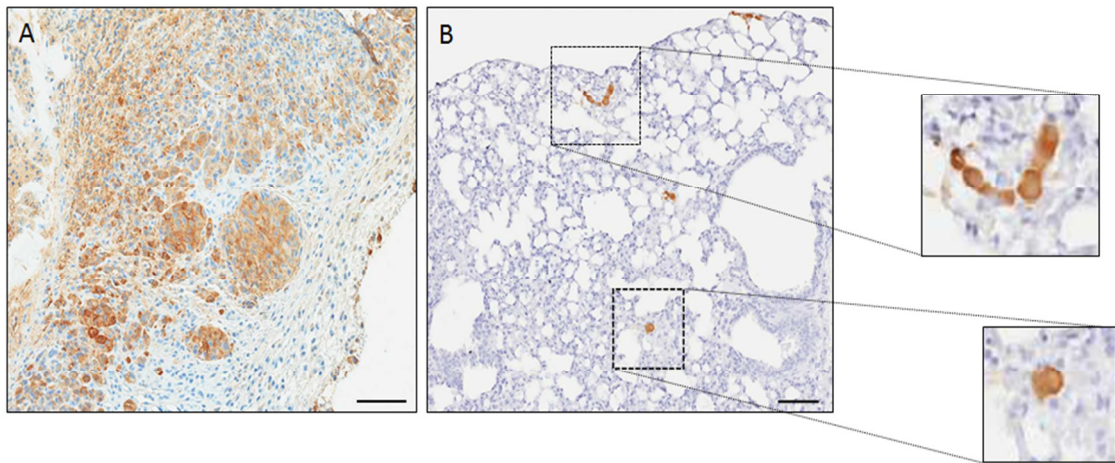


Figura 41 - Modelo animal de melanoma. Imunopositividade para GFP no tumor primário (A) e em algumas células no tecido do pulmão de camundongos (B) Barra de escala: 50 μ m

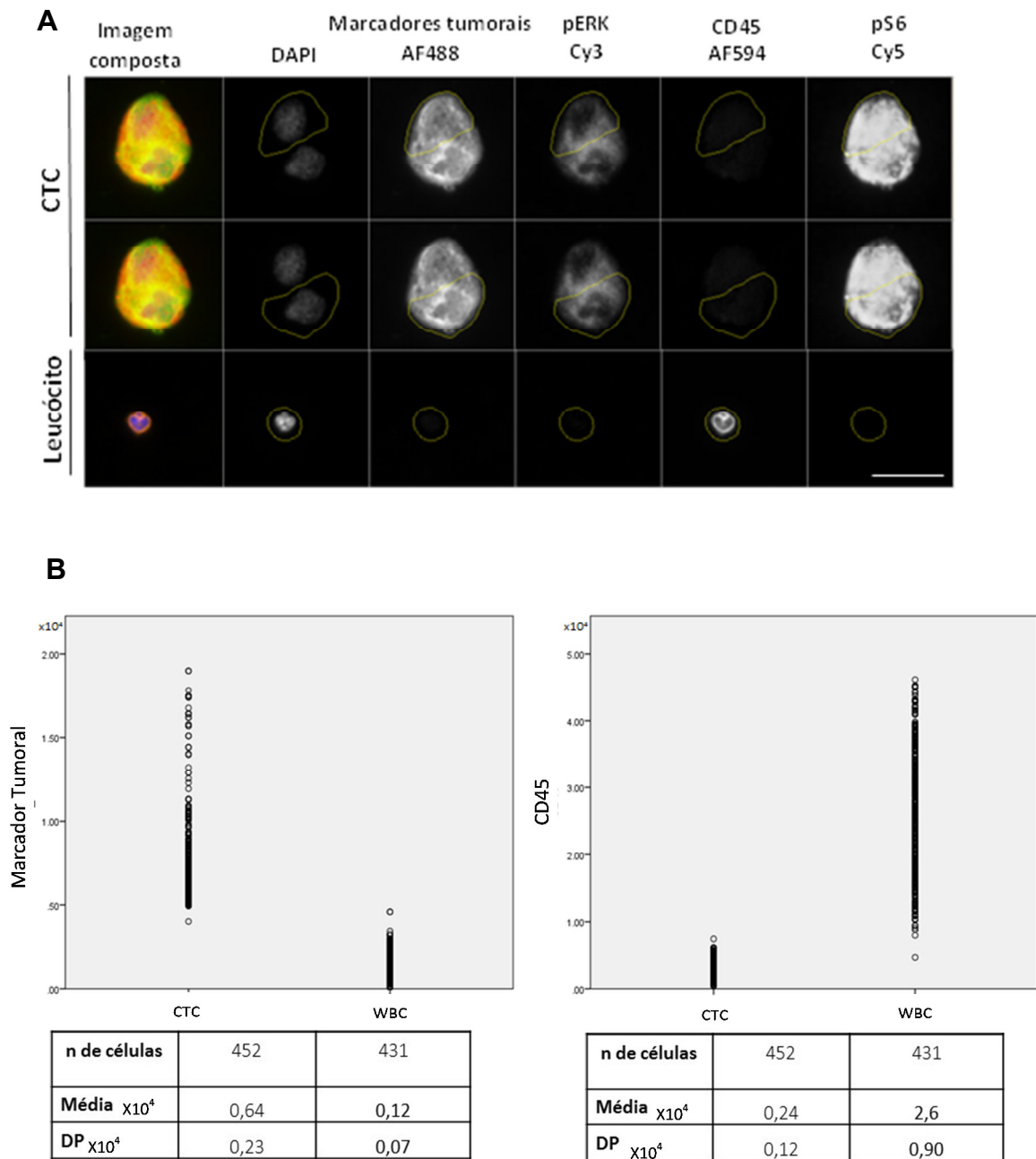
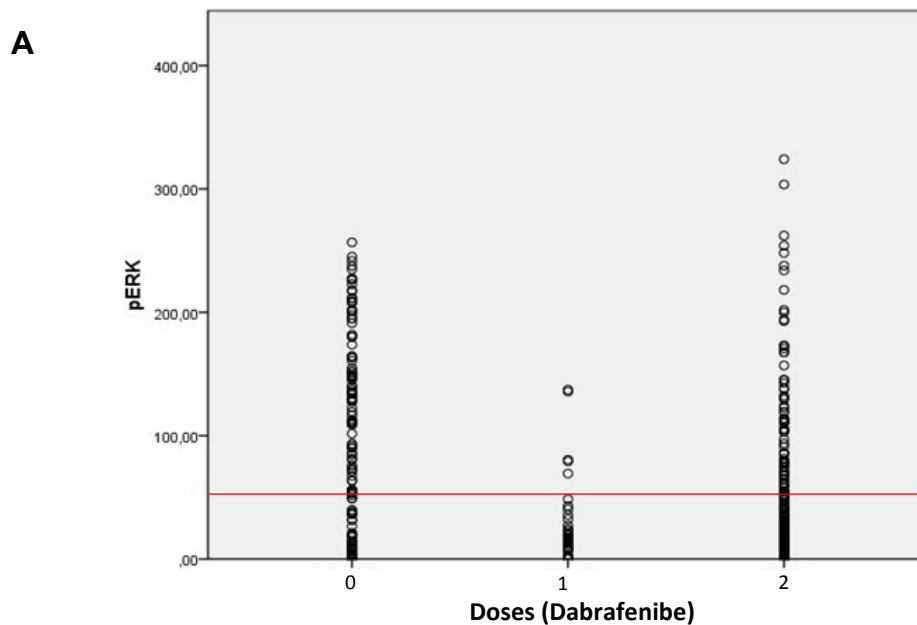


Figura 42 - Caracterização de células isoladas a partir de amostra de sangue de camundongos. A: Imagens representativas de CTCs e leucócitos (WBC) isolados a partir de amostras de sangue dos camundongos utilizando CTC-ichip. Barra de escala: 10 μ m B: Gráficos mostrando a separação das populações de CTC e leucócitos baseada no sinal fluorescente do marcador tumoral e de CD45 (média e DP). DP = desvio padrão.

As **Figuras 43A e 44A** mostram uma diminuição na média do sinal fluorescente para pERK e pS6 (respectivamente) em CTC isoladas após 4 horas de tratamento com uma dose única de dabrafenibe. Por outro lado, CTCs isoladas 20 horas após o tratamento com duas doses de dabrafenibe apresentaram uma média de sinal fluorescente para pERK e pS6 maior do que aqueles tratados com dose única de dabrafenibe.

Uma análise qualitativa e pareada das amostras de tumor primário dos camundongos mostrou, em relação à expressão de pERK e pS6, um padrão de resposta ao tratamento semelhante ao encontrado em CTCs: maior número de células positivas para pERK e pS6 em tumores provenientes do grupo de animais não tratados e daqueles que receberam 2 doses de dabrafenibe em comparação com os tumores dos camundongos que receberam uma dose única de dabrafenibe (**Figura 43B e 44B**, respectivamente).



n de camundongos	6	2	3
n de células	128	39	275
Média	102,19	26,75	43,20
DP	75,09	32,80	58,57

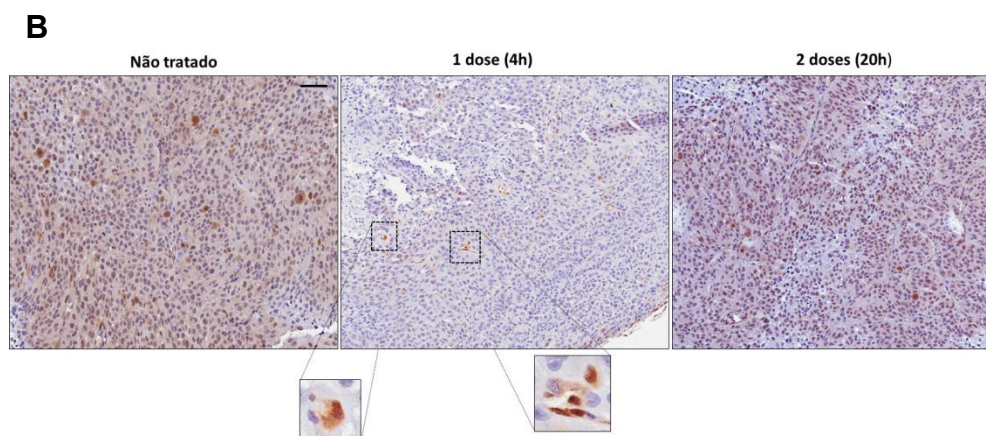
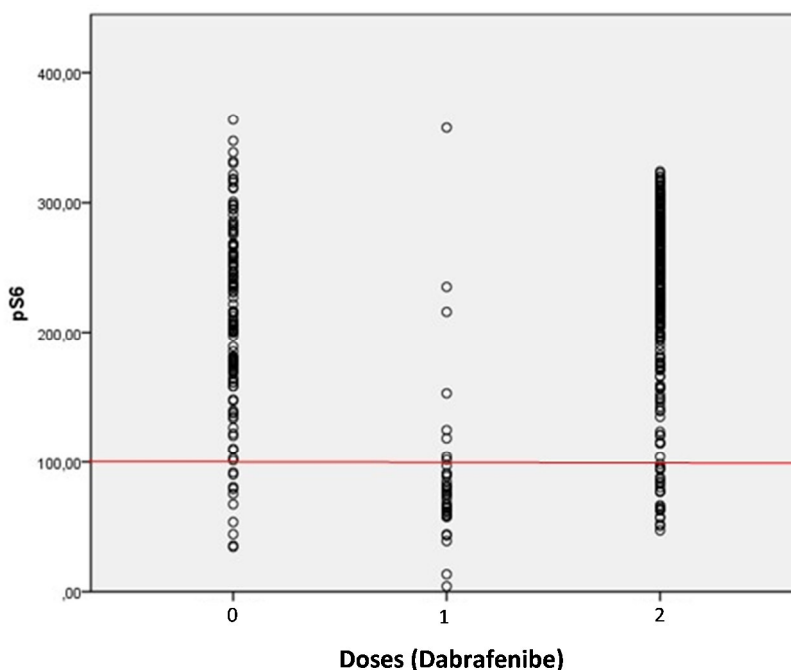


Figura 43 - Monitoramento da expressão de pERK após o tratamento com dabrafenibe. A: Gráficos mostrando o sinal fluorescente de pERK em CTCs isoladas de 3 grupos de camundongos: não tratado (0), tratado com 1 dose (1) ou 2 doses (2) de dabrafenibe. B: Imagens representativas da imunomarcação de pERK no tumor primário dos 3 grupos de camundongos. n = número total. DP = desvio padrão. A coleta de amostra de sangue dos animais foi realizada 4 horas após o tratamento com 1 dose de dabrafenibe e após 20 horas após a administração da primeira dose para o grupo que recebeu 2 doses da droga. Barra de escala = 50µm

A



n de camundongos	6	2	3
n de células	128	39	275
Média	211,20	88,54	231,99
DP	71,68	61,87	65,87

B

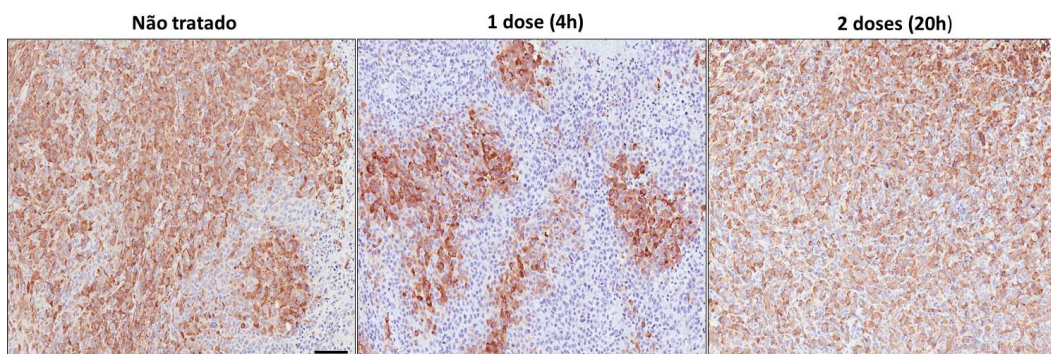


Figura 44 - Monitoramento da expressao de pS6 após o tratamento com dabrafenibe. A: Gráficos mostrando o sinal fluorescente de pS6 em CTCs isoladas de 3 grupos de camundongos: não tratado (0), tratado com 1 dose (1) ou 2 doses (2) de dabrafenibe. B: Imagens representativas da imunomarcaçao de pS6 no tumor primario dos 3 grupos de camundongos. n = número total. DP = desvio padrão. A coleta de amostra de sangue dos animais foi realizada 4 horas após o tratamento com 1 dose de dabrafenibe e após 20 horas após a administraçao da primeira dose para o grupo que recebeu 2 doses da droga. Barra de escala: 50 µm

Os resultados descritos para o tratamento usando dabrafenibe também foram observados quando se estabeleceu um *cut off* para o sinal fluorescente de pERK e pS6 (pERK ≥ 50 e pS6 ≥ 100): diminuição na porcentagem de CTCs pERK ≥ 50 e pS6 ≥ 100 isoladas 4 horas após o tratamento com dose única de dabrafenibe e um aumento na porcentagem dessas populações de CTCs isoladas 20 horas após o tratamento com duas doses de dabrafenibe (**Figura 45**).

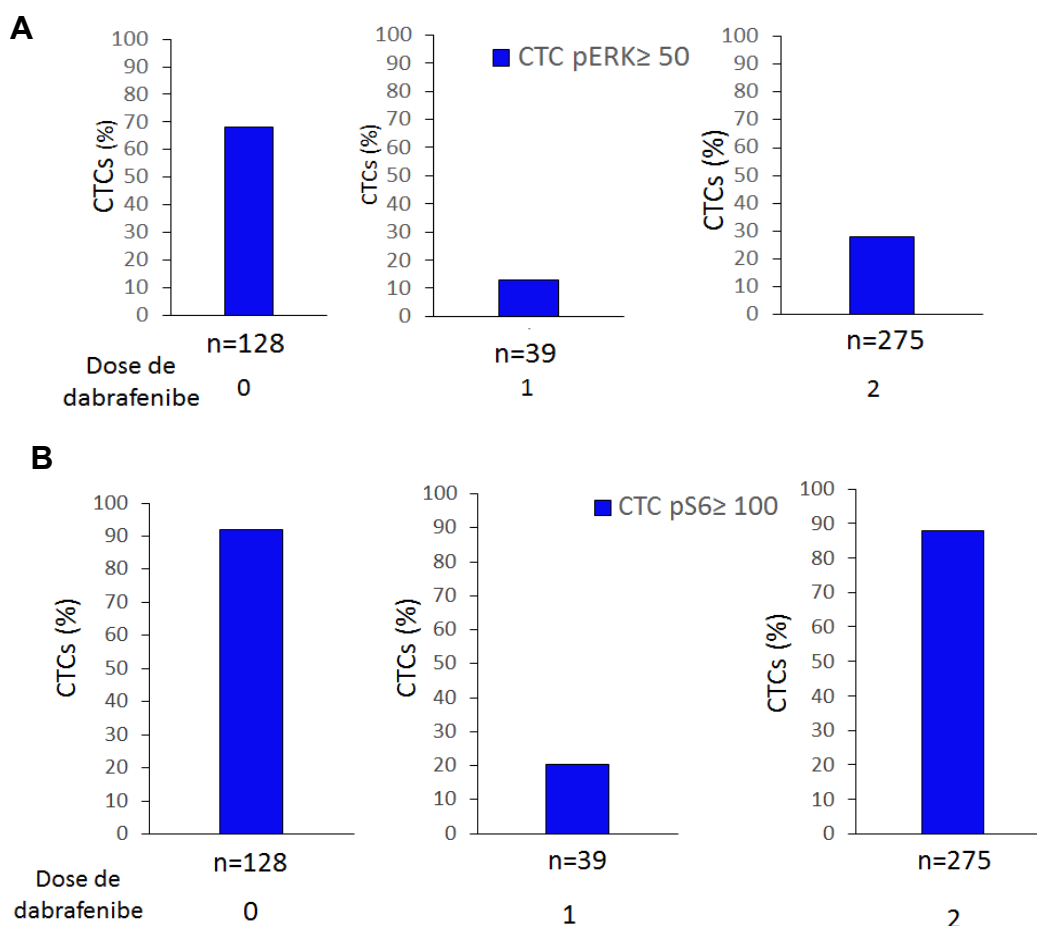


Figura 45 - Porcentagem de CTCs categorizadas de acordo com o *cutoff* estabelecido para os sinais fluorescentes de pERK (≥ 50) e pS6 (≥ 100). A: População de células pERK ≥ 50 de acordo com o tratamento com dabrafenibe. B: População de células pS6 ≥ 100 de acordo com o tratamento com dabrafenibe.

4.2.3 Análise de CTCs em pacientes com melanoma

Para avaliar a eficiência da metodologia de múltiplo-imunofluorescência (5 cores) desenvolvida utilizando amostras de pacientes com melanoma, um pequeno número ($n = 5$) de amostras de sangue periférico de pacientes em vários estágios do tratamento (**Quadro 12**) foram processadas utilizando o ^{neg}CTC iChip para isolamento e caracterização de CTCs (**Figura 46 e 47**). Como controle do método também processamos amostras de sangue de indivíduos saudáveis ($n = 4$).

A análise das CTCs isoladas foi realizada misturando os dados de paciente e indivíduos saudáveis (condição cega) e raros eventos falsos positivos foram detectados em amostras de indivíduos saudáveis (média: 0,135; DP = 0,023). Identificamos CTCs em todos os pacientes com melanoma com contagens variando de 1,38 a 27,3CTCs/mL (média: 7,76; DP = 10,99). É importante enfatizar que o paciente que apresentou o maior número de CTC/mL de sangue apresentou progressão da doença para o sistema nervoso central (SNC), enquanto que os demais apresentaram doença estável, quase estável ou não evidência de doença (**Figura 46, Quadro 12**).

Considerando que apenas uma amostra de cada paciente foi obtida durante o curso do tratamento, não foi possível fazer qualquer inferência direta sobre alterações na expressão de pERK e pS6 em CTCs como resposta ao tratamento. No entanto, as diferenças na expressão destes marcadores observadas entre os pacientes (**Figura 48**) poderiam ser um indicativo de relação com o tratamento com base nos ensaios *in vitro* e *in*

vivo previamente relatados, utilização da mesma metodologia e uso de inibidores da via MAPK no tratamento dos pacientes incluídos no estudo.

O presente estudo é inovador no contexto do melanoma, uma vez que na literatura a maioria dos estudos referentes à resistência à terapia são baseados em ensaio *in vitro* e *in vivo* com linhagens celulares de melanoma ou biópsias seriadas de pacientes com melanoma (LITO et al. 2012; CORCORAN et al. 2013). Além disto, o estudos que abordam CTCs e melanoma investigam em sua maioria a relação entre a enumeração de células e o desfecho clínico (FUSHI et al. 2009; HASHIMOTO et al. 2012; KHOJA et al. 2013).

Nossos dados apontam para um promissor uso da análise de CTCs como biomarcadores de resposta à terapia no melanoma pelo uso combinado da plataforma CTC-ichip e do protocolo de múltiplo-imunofluorescência desenvolvido que permite avaliar simultaneamente até 5 marcadores. Além disso, nossas evidências são reforçadas por um estudo recente que utilizou CTCs para avaliar a ativação de ERK e AKT pela ação do sorafenibe no tratamento do carcinoma hepatocelular. Os dados mostram uma alta taxa concordância entre amostras de tecido e CTCs quanto à expressão de pERK e pAKT (90%) e que a população de CTCs^{pERK+/pAkt-} são mais sensíveis ao sorafenibe e representa um fator preditivo independente de PFS em pacientes tratados com sorafenibe (HR= 9,389; p < 0,01) (LI et al. 2015).

A inclusão futura de amostras coletadas em diferentes momentos do tratamento de pacientes com melanoma permitirá estabelecer uma

associação entre as mudanças na expressão de pERK e pS6 e resposta ao tratamento, bem como eventos de resistência a drogas.

Quadro 12 - Dados clínicos dos pacientes com melanoma incluídos no estudo

Paciente	Dados Clínicos
Mel72	Tratamento com ipilimumabe, nivolumabe, dabrafenibe e trametinibe devido progressão da doença para o SNC.
Mel82	Doença leptomeningeal. Doença estável com tratamento com dabrafenibe e trametinibe.
Mel84	Doença estável com trametinibe e palbociclibe (estudo clínico fase 1)
Mel96	Doença quase estável sob tratamento com nivolumabe
Mel102	SED. Progressão da doença sob tratamento com PDL-1 e MEK. Ressecção em abril/2015.

SED = Sem Evidência da Doença

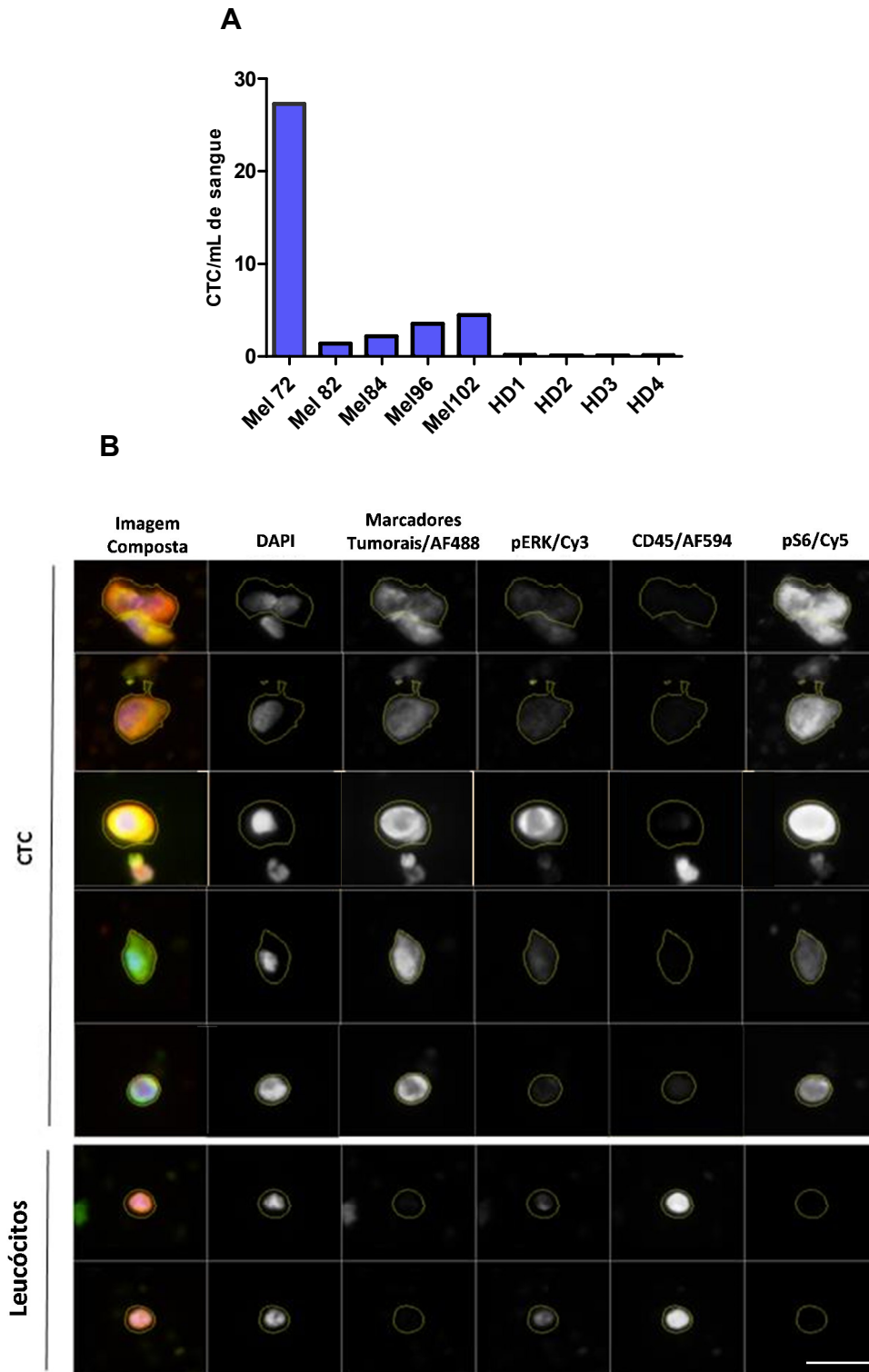


Figura 46 - Validação da múltiplo-imunofluorescência utilizando amostras de pacientes com melanoma e de indivíduos saudáveis. A: Gráfico mostrando o número de células capturadas a partir da amostra de sangue de pacientes com melanoma e indivíduos saudáveis. B: Imagens representativas de CTCs e leucócitos isolados a partir de amostras de sangue de pacientes com melanoma utilizando o ^{neg}CTC-iChip e imunomarcção pelo protocolo de 5 cores. Barra de escala = 10 μ m

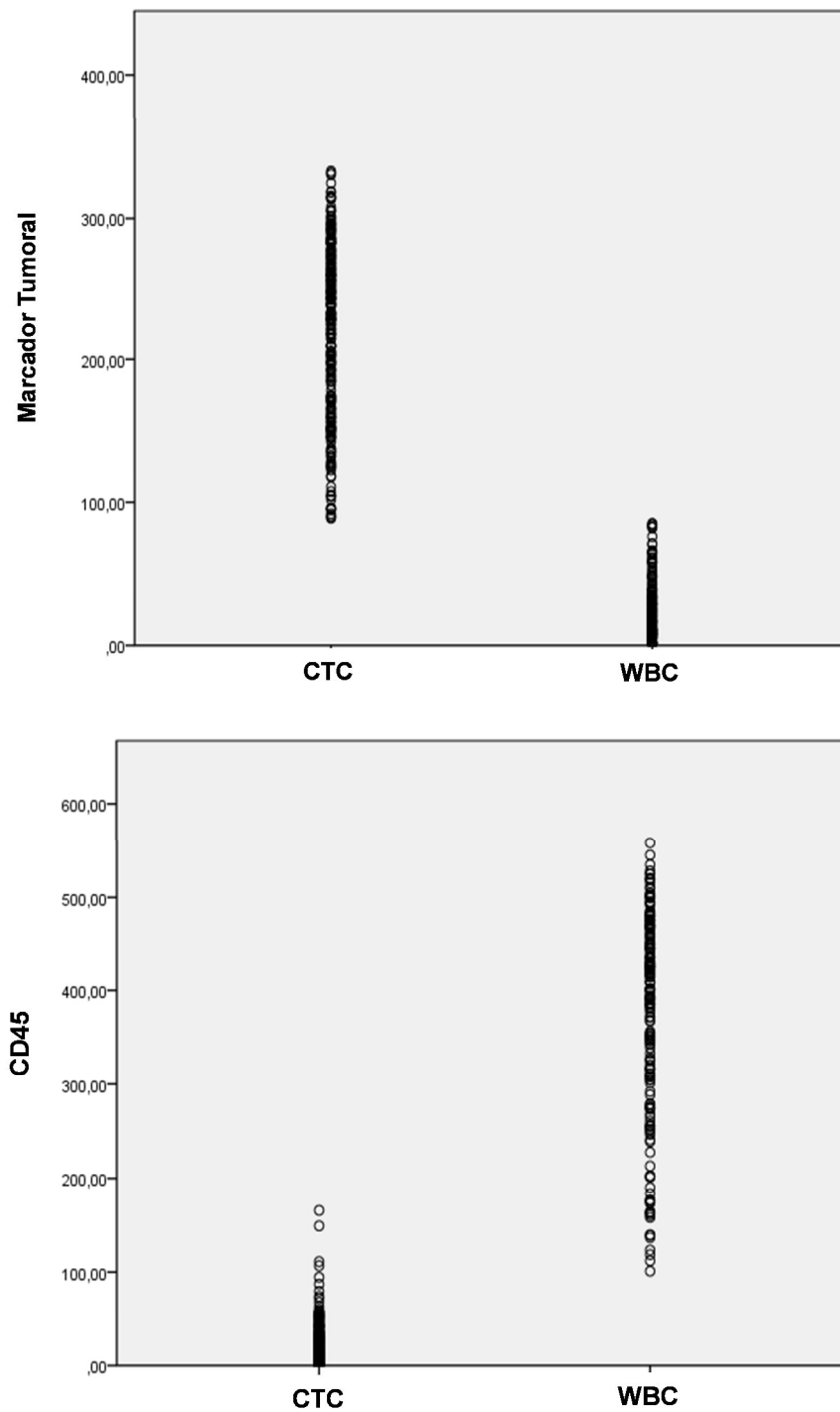


Figura 47 - Separação entre a população de CTCs e leucócitos baseado no sinal fluorescente dos marcadores tumorais e CD45. Células isoladas a partir de amostras de pacientes com melanoma.

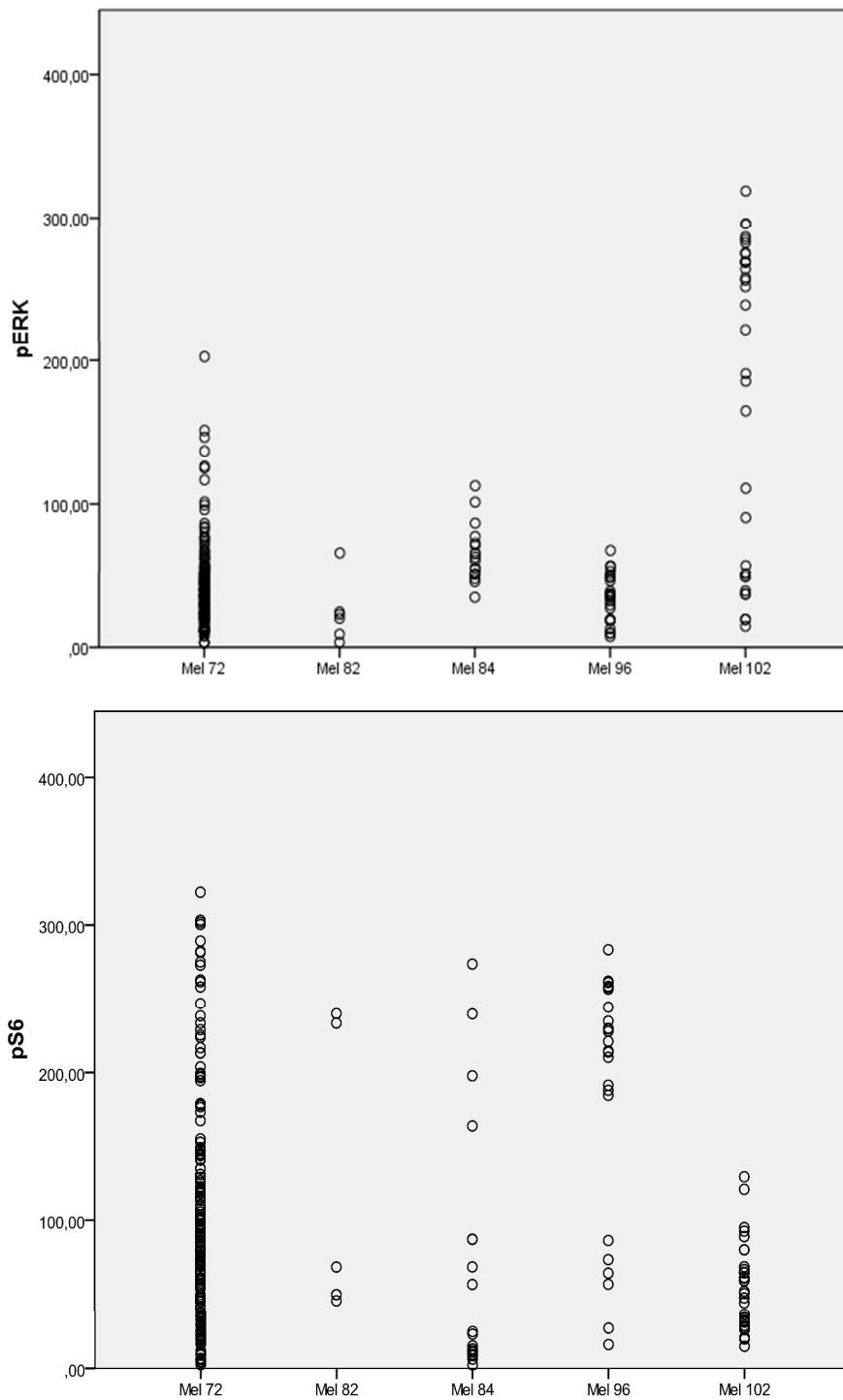


Figura 48 - Sinal fluorescente para pERK e pS6 em CTCs isoladas a partir de pacientes com melanoma.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Para o estudo do câncer de mama, utilizando a plataforma ISET, foi possível isolar CTCs a partir de amostras de sangue dos 2 grupos de pacientes (M0 e M+) e não houve diferença significativa para os valores de CTC encontrados.

Evidenciamos alterações nas expressões de marcadores metabólicos (PGC-1a, COXIV e MCT4) e do processo de transição epitélio-mesênquima (CKs e FOXC1) ao longo da progressão tumoral por incluirmos amostras de tumor primário, CTCs e metástases. Os resultados demonstraram características da ocorrência dos processos da TEM e TME bem como a plasticidade dos mesmos pela não ou baixa concordância da expressão de FOXC1 e CKs entre as amostras de tecido e CTCs.

Os dados obtidos para CTCs de pacientes e reforçados pela inclusão de linhagens de CTCs apontam para um possível mecanismo entre FOXC1 e HER-2; sendo assim uma perspectiva futura deste trabalho que contribuirá para o melhor entendimento e modulação do processo da TEM no contexto de CTCs.

A análise dos marcadores metabólicos em amostras de pacientes reforça os dados já publicados em modelos animais sobre a importância da fosforilação oxidativa no contexto da progressão tumoral (LEBLEU et al. 2014; TAN et al. 2015) e contribui para os questionamentos sobre a dependência das células tumorais pela glicólise aeróbica, principalmente

durante a disseminação hematogênica, uma vez que, a positividade para PGC-1a e COXIV foi maior em CTCs se comparada à do marcador da glicólise aeróbica, MCT4. Além disso, a expressão de PGC-1a foi maior nas metástases e em amostra de tecido primário após terapia neoadjuvante, enquanto que a presença da expressão de MCT4 nas CTCs associou-se com melhor sobrevida livre de progressão da doença.

Os dados obtidos para o estudo do câncer de mama foram reunidos na **Figura 49** e apresentados como manuscrito a ser submetido (CARVALHO et al., em preparação) (**Anexo 10**).

Com relação ao desenvolvimento de um método de biópsia líquida menos invasiva para monitorização de terapias alvo em melanoma, geramos e isolamos com êxito CTCs a partir de um modelo animal de melanoma e de amostras de pacientes usando o CTC-iChip. Para melhor caracterizar as alterações dinâmicas na expressão de marcadores nestas células raras como resposta ao tratamento, foi desenvolvido uma metodologia de múltiplo-imunofluorescência, altamente específica, sensível e robusta que nos permitiu avaliar a expressão de pERK e pS6 durante o curso do tratamento de melanoma. Os nossos dados, com base em uma pequena coorte de animais, sugerem que as alterações nestes marcadores podem ser facilmente monitoradas em tempo real, por meio da análise de CTCs para guiar o tratamento de melanoma e para eventos relacionados à resistência a drogas. Para confirmar estes resultados, uma coorte maior de camundongos está sendo investigada. Perspectivas surgiram a partir deste estudo, tais como emprego da metodologia desenvolvida em um estudo colaborativo que

aborda CTCs e imunoterapia em melanoma, além da adaptação do protocolo de múltiplo-imunofluorescência para outros tipos de cânceres, bem como para as amostras de tecido.

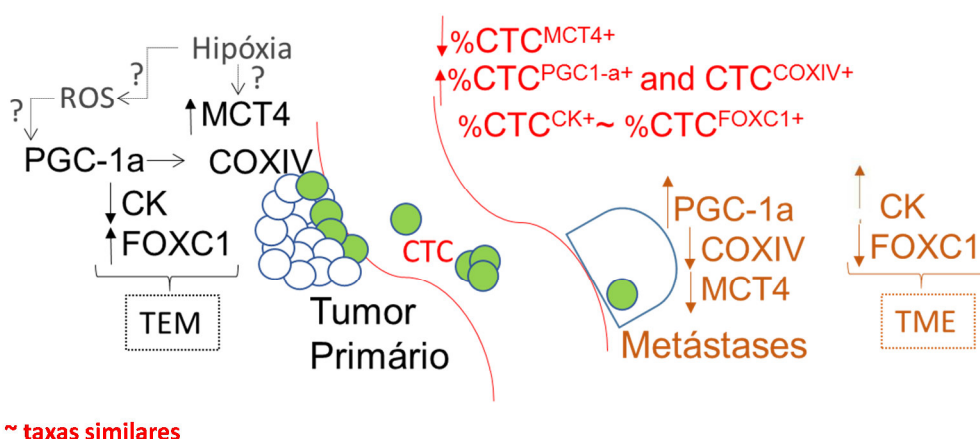


Figura 49 - Representação esquemática dos principais resultados obtidos para o estudo do câncer de mama. A sequência de eventos a serem descritas é baseada nos dados gerados por este estudo, mas hipoteticamente (setas tracejadas) seria iniciada pelo ambiente de hipóxia presente no tumor primário, culminando com o aumento dos níveis de lactato e conseqüentemente aumento da expressão de MCT4. A população de células MCT4+ por ser mais adaptada ao ambiente tumoral e por apresentar um perfil mais epitelial (forte correlação entre a expressão de MCT4 e CKs no tumor primário do grupo M+; **Figura 31**) invadiriam menos, justificando a baixa porcentagem de pacientes com CTC^{MCT4+} em comparação com as populações CTC^{PGC-1a+} e CTC^{COXIV+} (**Figura 19**). A expressão de PGC-1a no tumor primário seria estimulada indiretamente pelo ambiente de hipóxia pela geração de ROS (LIU e LIN 2011; ST-PIERRE et al. 2006) e por sua vez induziria a expressão de COXIV (**Figura 30B**). A população de células PGC1a+/COXIV+ por apresentarem maior capacidade de invasão (LEBLEU et al. 2014) refletiria na maior porcentagem de pacientes com CTC^{PGC1a+} e CTC^{COXIV+} e ainda na expressão aumentada de PGC-1a nas metástases.

A perda da expressão de FOXC1 e possível recuperação do fenótipo epitelial pelas células meticas em comparação com tumor primário podem indicar a ocorrência dos eventos de TEM/TME.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. **Cell** 2014; 158:1110-22

Adams JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. **J Histochem Cytochem** 1992; 40:1457-63.

Ahn CS, Metallo CM. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. **Cancer Metabol** 2015; 3:1.

Aktas B, Müller V, Tewes M, et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor status of circulating tumor cells and the primary tumor in metastatic breast cancer patients. **Gynecol Oncol** 2011; 122:356-60.

Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6897-904.

Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. **Lab Chip** 2014; 14:57-62.

Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. **Mol Cancer Res** 2011; 9:997-1007.

Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. **Aus Med J** 1869; 14:146-9.

Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. **Nat Biotechnol** 2013; 31:539-44.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol** 2009; 27:6199-206.

Bhalla K, Hwang BJ, Dewi RE, et al. PGC1 α promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis. **Cancer Res** 2011; 71:6888-98.

Bhargava R, Beriwal S, McManus K, Dabbs DJ. CK5 Is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2008;130:724-30.

Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. **Lancet Oncol** 2014; 15:406-14.

Bobrow MN, Litt GJ, Shaughnessy KJ, Mayer PC, Conlon J. The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. **J Immunol Methods** 1992; 150:145-9.

Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. **Nature** 2010; 467: 596-9.

Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, et al. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2010; 15:261-73.

Boyle JL, Haupt HM, Stern JB, Multhaupt HA. Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma and peripheral nerve tumors. **Pathol Lab Med** 2002; 126:816-22.

Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10356-61.

Brownbridge GG, Gold J, Edward M, McKie RM. Evaluation of the use of tyrosinase-specific and MelanA/MART-1-specific reverse transcriptase coupled-polymerase chain reaction to detect melanoma cells in peripheral blood samples from 299 patients with malignant melanoma. **Br J Dermatol** 2001; 144:279-87.

Burg MA, Grako KA, Stallcup WB. Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells. **J Cell Physiol** 1998; 177:299-312.

Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. **Cancer Res** 2011; 71:245-54.

Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. **Cancer** 2003; 97:545-53.

Chang JS, Huypens P, Zhang Y, Black C, Kralli A, Gettys TW. Regulation of NT-PGC-1 alpha subcellular localization and function by protein kinase A-dependent modulation of nuclear export by CRM1. **J Biol Chem** 2010; 285:18039-50.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N Engl J Med** 2011; 364:2507-16.

Chen EI, Hewel J, Krueger JS, et al. Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. **Cancer Res** 2007; 67:1472-86.

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, et al. Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:736-50.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist** 2004; 6: 606-16.

Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. **Postepy Dermatol Alergol** 2013; 30:30-41.

Corcoran RB, Rothenberg SM, Hata AN, et al. TORC1 suppression predicts responsiveness to RAF and MEK inhibition in BRAF-mutant melanoma. **Sci Transl Med** 2013; 5:196ra9.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:781-91.

Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V, et al. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. **Clin Breast Cancer** 2007; 7:34-42.

Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS. Development of a preclinical model of spontaneous human melanoma central nervous system metastasis. **Cancer Res** 2008; 68:4500-5.

Davies H, Bignell G, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 7:949-954.

Dolfus C, Piton N, Toure E, Sabourin JC. Circulating tumor cell isolation: the assets of filtration methods with polycarbonate track-etched filters. **Chin J Cancer Res** 2015; 27:479-87.

Doyen J, Trastour C, Ettore F, et al. Expression of the hypoxia-inducible monocarboxylate transporter MCT4 is increased in triple negative breast cancer and correlates independently with clinical outcome. **Biochem Biophys Res Commun** 2014; 451:54-61.

Dupuy F, Tabariès S, Andrzejewski S et al. PDK1 dependent metabolic reprogramming dictates metastatic potential in breast cancer. **Cell Metab** 2015; 22:577-89.

Eichner R, Bonitz P, Sun T-T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. **J Cell Biol** 1984; 98:1388-96.

Ellsworth RE, Decewicz DJ, Shriver CD, Ellsworth DL. Breast cancer in the personal genomics Era. **Curr Genomics** 2010; 11:146-61.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology** 1991; 19:403-10.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. **Lancet** 2005; 365:1687-717.

Farace F, Massard C, Vimond N, et al. A direct comparison of cell search and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. **Br J Cancer** 2011; 5:847-53.

Fehm T, Hoffmann O, Aktas B, et al. Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. **Breast Cancer Res** 2009; 11:R59.

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. **N Engl J Med** 2012a; 367:107-14.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. **N Engl J Med** 2012b; 67:1694-703.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136:E359-86.

Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. **J Natl Cancer Inst** 1970; 45:773-82.

Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell** 2011; 147:992-1009.

Franken B, de Groot MR, Mastboom WJ, et al. Circulating tumor cells, disease recurrence and survival in newly diagnosed breast cancer. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R133.

Gadalla S-E, Alexandraki A, Lindström MS, Nistér M, Ericsson C. Uncoupling of the ER α regulated morphological phenotype from the cancer stem cell phenotype in human breast cancer cell lines. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 405:581-7.

Fusi A, Collette S, Busse A, et al. Circulating melanoma cells and distant metastasis-free survival in stage III melanoma patients with or without adjuvant interferon treatment (EORTC 18991 side study). **Eur J Cancer** 2009; 45:3189-97.

Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. **Cancer Res** 2007; 67:4182-9.

Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov** 2013; 12:829-46.

Gerdes MJ, Sevinsky CJ, Sood A, et al. Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2013; 10:11982-7.

Gilmartin AG, Bleam MR, Groy A, et al. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. **Clin Cancer Res** 2011; 17:989-1000.

Giordano SH. Update on locally advanced breast cancer. **Oncologist** 2003; 8:521-30.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol** 2013; 24:2206-23.

Gopal YN, Deng W, Woodman SE, et al. Basal and treatment-induced activation of AKT mediates resistance to cell death by AZD6244 (ARRY-142886) in Braf-mutant human cutaneous melanoma cells. **Cancer Res** 2010; 70: 8736-8747.

Gupta P, Srivastava SK. HER-2 mediated de novo production of TGF β leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. **Mol Oncol** 2014; 8:1532-47.

Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology. College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:2784-95.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Han B, Qu Y, Jin Y, et al. FOXC1 activates smoothed-independent hedgehog signaling in basal-like breast cancer. **Cell Rep** 2015 13:1046-58.

Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. **Cancer Cell** 2013; 23:302-15.

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. **Lancet** 2012; 380:358-65.

Hashimoto S, Faries M, Morton DL, et al. Assessment of prognostic circulating tumor cells in a phase III trial of adjuvant immunotherapy after complete resection of stage IV melanoma. **Ann Surg** 2012; 255:357-62.

Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, et al. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. **Clin Cancer Res** 2006; 12:4218-24.

Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. **Cell** 2010; 140:209-21.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol** 2007; 8:R76.

Hill AD, Doyle JM, McDermott EW, O'Higgins NJ. Hereditary breast cancer. **Br J Surg** 1997; 84:1334-9.

Hofman V, Ilie MI, Long E, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch AssayTM and the isolation by size of epithelial tumor cell method. **Int J Cancer** 2011; 129:1651-60.

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Res** 2011; 13:215.

Hoshimoto S, Shingai T, Morton DL, et al. Association between circulating tumor cells and prognosis in patients with stage III melanoma with sentinel lymph node metastasis in a phase III international multicenter trial. **J Clin Oncol** 2012; 30:3819-26.

Hou JM, Krebs M, Ward T, et al. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. **Am J Pathol** 2011; 178:989-96.

Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:525-32.

Huang LR, Cox EC, Austin RH, Sturm JC. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. **Science** 2004; 304:987-990.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, et al. Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. **J Cell Physiol** 2007; 213:374-83.

Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. **Cancer Cell** 2008; 13:58-68.

Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer** 2008; 44:2799-805.

Jackisch C, Harbeck N, Huober J, et al. 14th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2015: Evidence, Controversies, Consensus - Primary Therapy of Early Breast Cancer: Opinions Expressed by German Experts. **Breast Care** 2015; 10:211-9.

Jeninga EH, Schoonjans K, Auwerx J. Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. **Oncogene** 2010; 29:4617-24.

Jensen TW, Ray T, Wang J, et al. Diagnosis of basal-like breast cancer using a FOXC1-based assay. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107:djv148.

Jin Y, Han B, Chen J, et al. FOXC1 is a critical mediator of EGFR function in human basal-like breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2014; 4:S758-66.

Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. **N Engl J Med** 2006; 354:809-20.

Josse SA, Hannemann J, Spötter J, et al. Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. **Clin Cancer Res** 2012; 18:993-1003.

Jung SY, Rosenzweig M, Sereika SM, Linkov F, Brufsky A, Weissfeld JL. Factors associated with mortality after breast cancer metastasis. **Cancer Causes Control** 2012; 23:103-12.

Jungbluth AA, Iversen K, Coplan K, et al. T311--an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. **Pathol Res Pract** 2000; 196:235-42.

Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2011;13:R59.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119:1420-8.

Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. **Cancer Cell** 2013; 23:573-81.

Karabacak NM, Spuhler PS, Fachin F, et al. Microfluidic, marker-free isolation of circulating tumor cells from blood samples. **Nat Protoc** 2014; 9:694-710.

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.

Kershaw S, Cummings J, Morris K, Tugwood J, Dive C. Optimisation of immunofluorescence methods to determine MCT1 and MCT4 expression in circulating tumour cells. **BMC Cancer** 2015; 15:387.

Khoja L, Backen a, Sloane R, et al. A pilot study to explore circulating tumour cells in pancreatic cancer as a novel biomarker. **Br J Cancer** 2012; 106:508-16.

Khoja L, Lorigan P, Zhou C, et al. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol** 2013; 133:1582-90.

Khoja L, Lorigan P, Dive C, Keilholz U, Fusi A. Circulating tumor cells as tumour biomarkers in melanoma: detection methods and clinical relevance. **Ann Oncol** 2015; 26:33-9.

Kim HJ, Bar-Sagi D. Modulation of signalling by Sprouty: a developing story. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2004; 5:441-450.

Klimcakova E, Chénard V, McGuirk S, et al. PGC-1 α promotes the growth of ErbB2/Neu-induced mammary tumors by regulating nutrient supply. **Cancer Res** 2012; 72:1538-46.

Kugel CH 3rd, Aplin AE. Adaptive resistance to RAF inhibitors in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 2014; 27:1032-8.

Kraus JA, Dabbs DJ, Beriwal S, Bhargava R. Semi quantitative immunohistochemical assay versus oncotype DX[®] qRT-PCR assay for estrogen and progesterone receptors: an independent quality assurance study. **Mod Pathol** 2012; 25:869-76.

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.

Krebs MG, Metcalf RL, Carter L, Brady G, Blackhall FH, Dive C. Molecular analysis of circulating tumour cells-biology and biomarkers. **Nat Rev Clin Oncol** 2014; 11:129-44.

Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. **Cancer Cell** 2011; 20:576-90.

Lang JE, Mosalpuria K, Cristofanilli M, et al. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 113:501-7.

Laquerre S, Arnone M, Moss K, et al. selective Raf kinase inhibitor induces cell death and tumor regression of human cancer cell lines encoding B-RafV600E mutation. **Mol Cancer Ther** 2009; 8:B88.

Lebleu VS, O'Connell JT, Herrera KNG, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. **Nat Cell Biol** 2014; 16:992-100.

Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, Planchard D, Soria JC, Farace F. Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/ mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. **Br J Cancer** 2011; 105:1338-41.

Lee J, Choi J, Kim Y. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **Br J Dermatol** 2011; 164:776-84.

Lee ML, Tomsu K, von Eschen KB. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. **Melanoma Res** 2000; 10:81-92.

Li J, Shi L, Zhang X, et al. pERK/pAkt phenotyping in circulating tumor cells as a biomarker for sorafenib efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. **Oncotarget** 2015 Oct 26; [Epub ahead of print].

Lianidou ES, Markou A. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer. **Clin Chem Lab Med** 2011; 49:1579-90.

Liotta LA, Saidel MG, Kleinerman J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. **Cancer Res** 1976; 36:889-94.

Lito P, Pratilas CA, Joseph EW, et al. Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. **Cancer Cell** 2012; 22:668-82.

Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. **Nat Med** 2013; 19:1401-9.

Little AS, Smith PD, Cook SJ. Mechanisms of acquired resistance to ERK1/2 pathway inhibitors. **Oncogene** 2013; 32:1207-15.

Liu C, Lin JD. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. **Acta Biochim Biophys Sin** 2011; 43:248-57.

Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. **N Engl J Med** 2014; 371:1877-88.

Lopez-Garcia MA, Geyer FC, Lacroix-Triki M, Marchió C, Reis-Filho JS. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology** 2010; 57:171-92.

Lucci A, Hall CS, Lodhi AK, et al. Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. **Lancet Oncol** 2012; 13:688-95.

Luo X, Mitra D, Sullivan RJ, et al. Isolation and molecular characterization of circulating melanoma cells. **Cell Rep** 2014 7:645-53.

Maheswaran S, Haber DA. Ex vivo culture of ctcs: an emerging resource to guide cancer therapy. **Cancer Res** 2015; 75:2411-5.

Makino T, Yamasaki M, Takeno A, et al. Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus. **Br J Cancer** 2009; 101:1298-306.

McGuirk S, Gravel S-P, Deblois G, et al. PGC-1 α supports glutamine metabolism in breast cancer. **Cancer Metab** 2013; 1:22.

McArthur GA, Chapman PB, Robert C, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. **Lancet Oncol** 2014; 15:323-32.

Mego M, De Giorgi U, Dawood S, et al. Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. **Int J Cancer** 2011; 129:417-23.

Menendez JA, Lupu R, Colomer R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase hyperactivity induces synergistic chemosensitization of HER -2/ neu -overexpressing human breast cancer cells to docetaxel (taxotere). **Breast Cancer Res Treat** 2004; 84:183-95.

Mills CN, Joshi SS, Niles RM. Expression and function of hypoxia inducible factor-1 alpha in human melanoma under non-hypoxic conditions. **Mol Cancer** 2009; 8:104.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2015 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2015.

Mittapalli RK, Vaidhyanathan S, Dudek AZ, Elmquist WF. Mechanisms limiting distribution of the threonine-protein kinase B-RaF(V600E) inhibitor dabrafenib to the brain: implications for the treatment of melanoma brain metastases. **J Pharmacol Exp Ther** 2013; 344:655-64.

Mitchell RT, E Camacho-Moll M, Macdonald J, et al. Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. **Mod Pathol** 2014; 27:1255-66.

Meyer LJ, Zone JJ. Genetics of cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol** 1994; 103:112S-6S.

Miyamoto DT, Lee RJ, Stott SL, et al. Androgen receptor signaling in circulating tumor cells as a marker of hormonally responsive prostate cancer. **Cancer Discov** 2012; 2:995-1003.

Miyamoto DT, Zheng Y, Wittner BS, et al. RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. **Science** 2015; 349:1351-6.

Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2010; 15:117-34.

Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. **Clin Cancer Res** 2005; 11:3678-85.

Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box(FOX) proteins in cancer. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:847-59.

Morais-Santos F, Granja S, Miranda-Gonçalves V, et al. Targeting lactate transport suppresses in vivo breast tumour growth. **Oncotarget** 2015; 6:19177-89.

Nadal R, Fernandez A, Sanchez-Rovira P, et al. Biomarkers characterization of circulating tumour cells in breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R71.

Niikura N, Masuda S, Kumaki N, et al. Prognostic significance of the Ki67 scoring categories in breast cancer subgroups. **Clin Breast Cancer** 2013; 14:323-329.e3.

Oltean S, Sorg BS, Albrecht T, et al. Alternative inclusion of fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIc in dunning prostate tumors reveals unexpected epithelial mesenchymal plasticity. **Proc Natl Acad Sci** 2006; 103:14116-21.

Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. **Oncogene** 2007; 26: 3203-13.

Ozkumur E, Shah AM, Ciciliano JC, et al. Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells. **Sci Transl Med** 2013; 5:179ra47.

Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt F. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. **Virchows Arch** 2007; 450:73-80.

Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. **Oncogene** 2015 Jun 8; [Epub ahead of print].

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer** 2007; 7:415-28.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:1659-672.

Pierga J-Y, Hajage D, Bachelot T, et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. **Ann Oncol** 2012; 23:618-24.

Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Cancer: circulating tumor cells. **Science** 2013, 341:1186-8.

Plaza JA, Suster D, Perez-Montiel D. Expression of immunohistochemical markers in primary and metastatic malignant melanoma: a comparative study in 70 patients using a tissue microarray technique. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2007; 5:421-5.

Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. **J Clin Invest** 2011; 121:3786-3788.

Powell AA, Talasz AH, Zhang H, et al. Single cell profiling of circulating tumor cells: transcriptional heterogeneity and diversity from breast cancer cell lines. **PLoS One** 2012; 7:e33788.

Proebstle TM, Jiang W, Hogel J, et al. Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. **Br J Cancer** 2000; 82:118-23.

Quaglino P, Osella-Abatea S, Cappello N, et al. Prognostic relevance of baseline and sequential peripheral blood tyrosinase expression in 200 consecutive advanced metastatic melanoma patients. **Melanoma Res** 2007; 17:75-82.

Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, et al. Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 2014; 10:1-11.

Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 130:449-55.

Ray PS, Wang J, Qu Y, et al. FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer. **Cancer Res** 2010; 70:3870-6.

Reincke M, Sbiera S, Hayakawa A, et al. Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease. **Nat Genet** 2015; 47:31-8.

Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. **Int J Cancer** 2008; 123:1991-2006.

Rigel D. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. **J Am Acad Dermatol** 2008; 58:S129-S32.

Robson EJ, Khaled WT, Abell K, Watson CJ. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines. **Differentiation** 2006; 74:254-64.

Roesch A, Vultur A, Bogeski I. et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B high cells. **Cancer Cell** 2013; 23, 811-25.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:1673-84.

Sänger N, Effenberger KE, Riethdorf S, et al. Disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with ductal carcinoma *in situ*. **Int J Cancer** 2011; 129:2522-6.

Scoggins CT, McMasters KM, Stromberg AJ, et al. What is the role of sequential reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of melanoma-specific mRNA in the peripheral blood of melanoma patients? **J Clin Oncol** 2007; 25:1141-2.

Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, et al. Prospective multiinstitutional study of reverse transcriptase polymerase chain reaction for molecular staging of melanoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:2849-57.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science** 1987; 235:177–82.

Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC T) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC TH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 94:S5a.

Shindler KS, Roth KA. Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. **J Histochem Cytochem** 1996; 44:1331-5.

Sinn HP, Kreipe HA. Brief overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care Basel** 2013; 8:149-54.

Sizemore ST, Keri RA. The forkhead box transcription factor FOXC1 promotes breast cancer invasion by inducing matrix metalloprotease 7 (MMP7) expression. **J Biol Chem** 2012; 287:2463 1-40.

Skelton HG, Smith KJ, Barrett TL, Lupton GP, Graham JH. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions a reflection of cellular activation. **Am J Dermatopathol** 1991; 13:543-50.

Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al. Circulating Tumor Cells and Response to Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer: SWOG S0500. **J Clin Oncol** 2014; 32:3483-9.

Smith SC, Theodorescu D. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:253-64.

Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. [tradução de A L M Eisenberg]. 7ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012. Tumores de mama; p.187-99.

Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, et al. Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the “reverse Warburg effect” in positive lymph node tissue. **Cell Cycle** 2012; 11:1445-54.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10869-74.

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell** 2006; 127:309-498.

Stack EC, Wang C, Roman KA, Hoyt CC. Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: a review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. **Methods** 2014; 70:46-58.

Stott SL, Hsu CH, Tsukrov DI, et al. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010a; 107:18392-7.

Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, et al. Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. **Sci Transl Med** 2010b; 2:25ra23.

Sun TT, Eichner R, Schermer A, Cooper D, Nelson WG, Weiss RA. Classification, expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: a unifying model. **Cancer Cell** 1984 1:169-76.

Tan AS, Baty JW, Dong LF, et al. Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. **Cell Metab** 2015; 21:81-94.

Tao JJ, Castel P, Radosevic-Robin N, et al. Antagonism of EGFR and HER3 enhances the response to inhibitors of the PI3K-Akt pathway in triple - negative breast cancer. **Sci Signal** 2014; 7:ra29.

Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. **Mod Pathol** 2010; 23:123-33.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:442-54.

Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 285: 217-23.

Tóth ZE, Mezey E. Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. **J Histochem Cytochem** 2007; 55:545-54.

Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. **J Cell Physiol** 2010; 222:38-41.

Untch M, Gerber B, Harbeck N, et al. 13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (Zurich 2013). **Breast Care** 2013; 8:221-9.

Van Heusden J, de Jong P, Ramaekers F, Bruwiere H, Borgers M, Smets G. Fluorescein-labeled tyramide strongly enhances the detection of low bromodeoxyuridine incorporation levels. **J Histochem Cytochem** 1997; 45:315-9.

Vazquez F, Lim J-H, Chim H, et al. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. **Cancer Cell** 2013 23:287-301.

Vazquez-Martin A, Ropero S, Brunet J, Colomer R, Menendez JA. Inhibition of fatty acid synthase (FASN) synergistically enhances the efficacy of 5-fluorouracil in breast carcinoma cells. **Oncol Rep** 2007;18:973–80.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. **Oncology** 2001; 61:37-42.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20:719-26.

von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:747-56.

Voit C, Kron M, Rademaker J, et al. Molecular staging in stage II and III melanoma patients and its effect on long-term survival. **J Clin Oncol** 2005; 23:1218-27.

Vona G, Sabile A, Louha M, et al. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. **Am J Pathol** 2000; 156:57-63.

Wasmeier C, Hume AN, Bolasco G, Seabra MC. Melanosomes at a glance. **J Cell Sci** 2008; 121:3995-9.

Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, et al. The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 137:503-10.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell** 2004; 116:855-67.

Wang J, Ray PS, Sim MS, et al. FOXC1 regulates the functions of human basal like breast cancer cells by activating NF- κ B signaling. **Oncogene** 2012; 31:4798-802.

Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. **Chin J Cancer** 2011; 30:603-11.

Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. **Cancer Cell** 2012; 21:297-308.

Warburg O. On the origin of cancer cells. **Science** 1956; 123:309-14.

Witkiewicz AK, Whitaker-Menezes D, Dasgupta A, et al. Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. **Cell Cycle** 2012; 11:1108-17.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology. College of American pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:118-45.

Wu Y, Ginther C, Kim J, et al. Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumabe-resistant HER-2-overexpressing breast cancer cells. **Mol Cancer Res** 2012; 10:1597-606.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. **Cell** 1999; 98:115-24.

Yang Y, Liu H, Li Z, et al. Role of fatty acid synthase in gemcitabine and radiation resistance of pancreatic cancers. **Int J Biochem Mol Biol** 2011; 2:89-98.

Yuan J, Ku GY, Adamow M, et al. Immunologic responses to xenogeneic tyrosinase DNA vaccine administered by electroporation in patients with malignant melanoma. **J Immunother Cancer** 2013; 1:20.

Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. **J Cell Biol** 2011; 192:373-82.

Yu M, Ting DT, Stott SL, et al. RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. **Nature** 2012; 487: 510-3.

Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. **Science** 2013; 339:580-4.

Yu M, Bardia A, Aceto N, et al. Cancer therapy ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. **Science** 2014; 345:216-20.

Zhang L, Ridgway LD, Wetzel MD, et al. The identification and characterization of breast cancer CTCs competent for brain metastasis. **Sci Transl Med** 2013; 5:180ra148.

Zbytek B, Carlson JA, Granese J, Ross J, Mihm MC Jr, Slominski A. Current concepts of metastasis in melanoma. **Expert Rev Dermatol** 2008; 3:569-85.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do AC Camargo Cancer Center



Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 23 de Julho de 2012.

Ao
Dr. Rafael Malagoli Rocha

Aluna: Fernanda Machado de Carvalho (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1655/12

“Avaliação da transição epitélio-mesênquima e do papel do coativador transcricional PGC-1 α em carcinoma mamário: um estudo envolvendo células tumorais circulantes (CTCs)”.

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 29/05/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 13/03/2012, **aprovaram** a realização do estudo em referência (datado de 2011), os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (para Pacientes *em Tratamento* no Hospital AC Camargo e para Pacientes *em Acompanhamento Clínico* no Hospital AC Camargo, ambos datados de 14 de maio de 2012) 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 Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

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



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: AVALIAÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E DO PAPEL DO COATIVADOR TRANSCRICIONAL PGC-1 α EM CARCINOMA MAMÁRIO: UM ESTUDO ENVOLVENDO CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTCs)

Investigadores Responsáveis: **Dr. Rafael Malagoli Rocha/ Dra. Ludmilla T. D. Chinen**

Nome do (a) Voluntário (a) : _____

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. Além disto, pretendemos também analisar nestas células marcadores de processos que contribuem para que elas se instalem em outros locais do organismo e correlacionar essas análises com a evolução clínica, tempo de vida após o tratamento e tipos de câncer de mama.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao concordar em participar deste estudo, você será submetido (a) a três coletas de sangue (aproximadamente 10 mL), em três momentos: antes do início do tratamento sistêmico, 3 ou 4 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

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 às quais você já esteja sendo submetido.

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 sobre os resultados relevantes de pesquisa e isto ocorrerá através do contato dos responsáveis pelo estudo: Dr. Rafael Malagoli Rocha: (2189-5000, ramal 1160) e Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000, ramal 2776).

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.

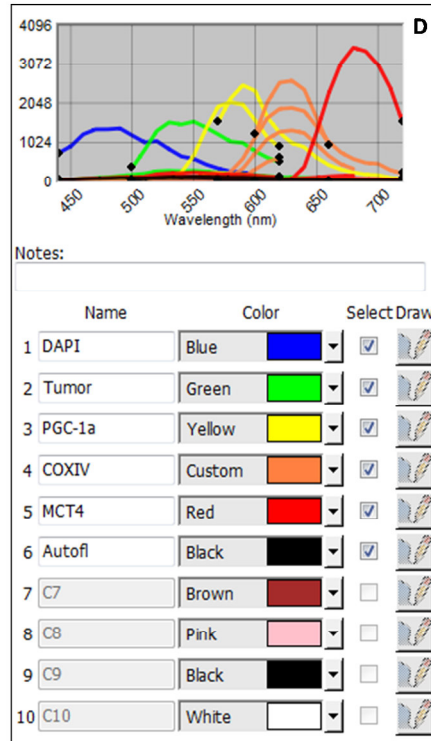
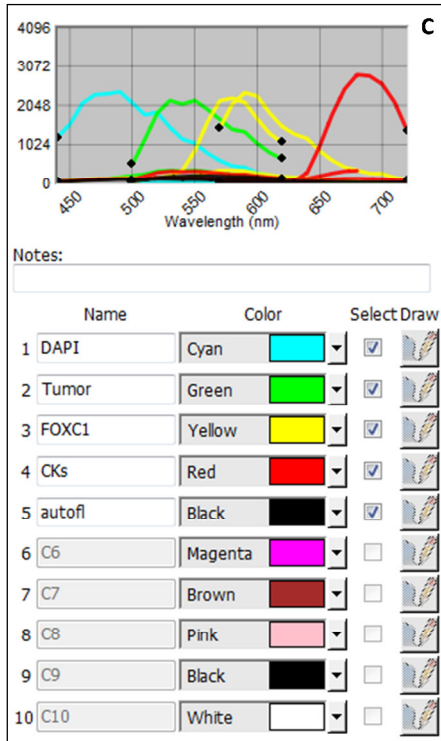
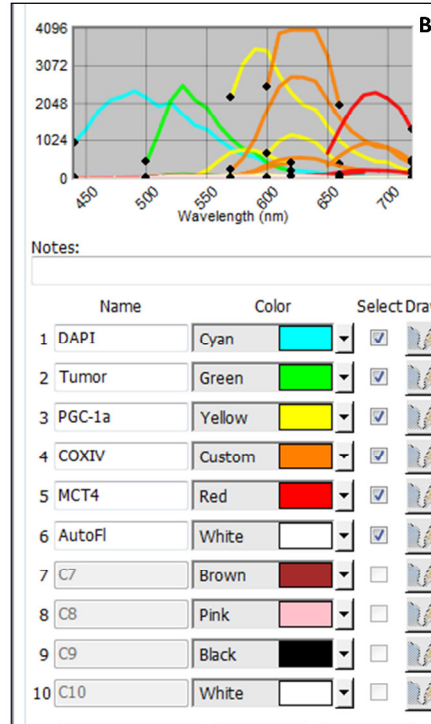
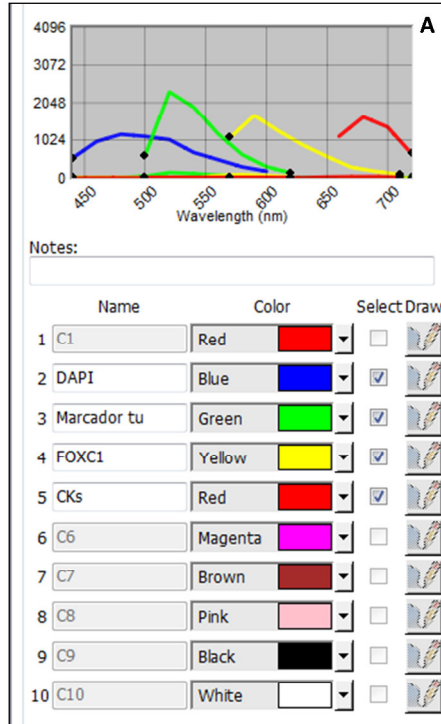
INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS

Esclarecimentos para questões sobre os direitos dos participantes na pesquisa e/ou danos relacionados à pesquisa, contatar os pesquisadores Dr. Rafael Malagoli Rocha: (2189-5000, ramal 1160) e Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000, ramal 2776).

Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o 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: 2189-5000 ramais 5020/2069 - Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211-Liberdade- São Paulo, SP).

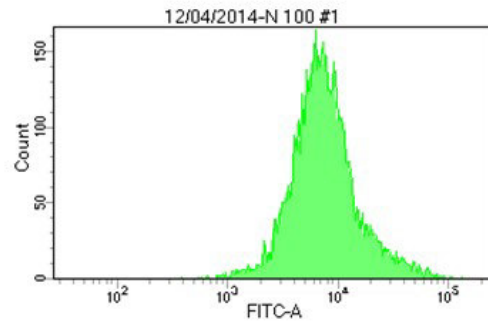
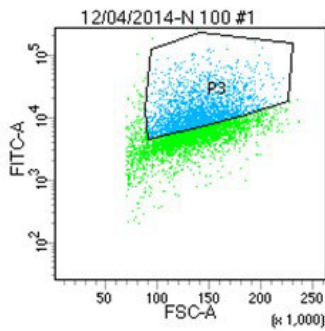
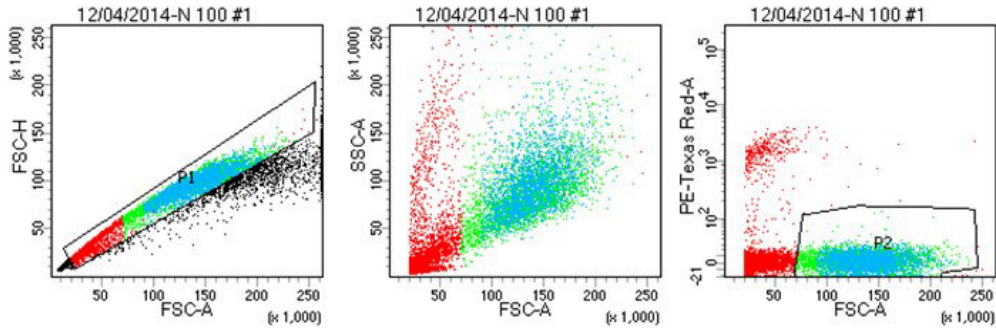
Você receberá via deste documento e o original será arquivado no prontuário do médico. Somente assine este documento se consentir integralmente com seus termos.

Anexo 3 - Bibliotecas Espectrais geradas para a análise da múltiplo-imunofluorescência de 4 e 5 cores em células e tecidos



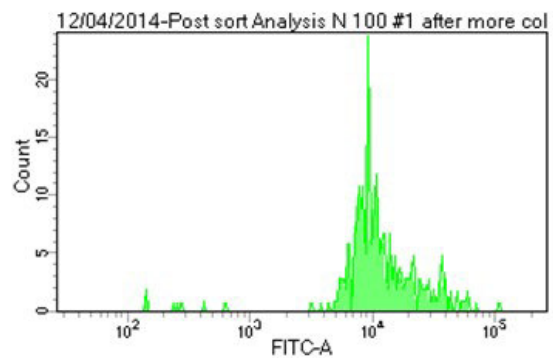
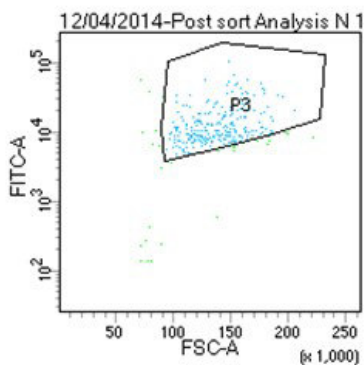
Legenda: A e B correspondem respectivamente a bibliotecas de 4 cores e 5 cores usadas para análises em células; C e D respectivamente a bibliotecas de 4 cores e 5 cores usadas para análise em tecidos.

Anexo 4 - População de células 113-6/4L com alta expressão de GFP isolada pela técnica de sorteamento de células ativada por fluorescência (FACS)



Tube: N 100 #1

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	9,798	49.0	49.0
P2	5,889	60.1	29.4
P3	2,662	45.2	13.3



Anexo 5 – Número de CTC/spot da membrana do ISET

Paciente/Doença Metastática	spot 1	spot 2	spot 3	spot 4	CTC/1mL	CTC/7,5mL	CTC/10mL
1	1	4	1	0	1,5	11,25	15
2	0	0	0	0	0	0	0
3	6	2	6	2	4	30	40
4	8	8	8	8	8	60	80
5	0	3	1	2	1,5	11,25	15
6	2	0	2	2	1,5	11,25	15
7	8	1	2	1	3	22,5	30
8	5	0	3	0	2	15	20
9	2	0	0	2	1	7,5	10
10	0	1	0	1	0,5	3,75	5
11	4	0	0	0	1	7,5	10
12	3	3	0	0	1,5	11,25	15
13	0	0	0	0	0	0	0
14	2	3	2	1	2	15	20
15	1	3	1	1	1,5	11,25	15
16	8	8	8	8	8	60	80
17	2	2	2	2	2	15	20
18	0	1	3	0	1	7,5	10
19	3	1	1	1	1,5	11,25	15
20	2	0	2	2	1,5	11,25	15
21	0	2	3	3	2	15	20
22	2	2	6	2	3	22,5	30
23	1	1	1	1	1	7,5	10
24	10	4	4	6	6	45	60
25	0	0	0	0	0	0	0
Paciente/Doença Não Metastática	spot 1	spot 2	spot 3	spot 4	CTC/1mL	CTC/7,5mL	CTC/10mL
1	0	1	1	2	1	7,5	10
2	2	3	0	3	2	15	20
3 (baseline)	5	5	4	2	4	30	40
3 (após terapia neoadjuvante)	1	2	1	2	1,5	11,25	15
4 (baseline)	2	4	0	2	2	15	20
4 (após terapia neoadjuvante)	3	0	5	4	3	22,5	30
5	2	1	4	1	2	15	20
6 (baseline)	2	3	1	0	1,5	11,25	15
6 (após terapia neoadjuvante)	2	4	1	1	2	15	20
7	0	0	1	3	1	7,5	10
8	3	1	2	0	1,5	11,25	15
9	5	0	0	1	1,5	11,25	15
10	1	1	1	1	1	7,5	10
11	0	0	0	0	0	0	0
12	4	1	1	2	2	15	20
13 (baseline)	6	4	3	3	4	30	40
13 (após terapia neoadjuvante)	3	3	3	3	3	22,5	30
14	1	1	1	1	1	7,5	10
15	1	2	0	1	1	7,5	10
16 (baseline)	7	8	8	7	7,5	56,25	75
16 (após terapia neoadjuvante)	3	5	5	3	4	30	40
17	0	3	0	1	1	7,5	10
18	4	2	6	4	4	30	40
19	0	0	0	0	0	0	0
20	2	4	0	0	1,5	11,25	15
21	4	4	4	2	3,5	26,25	35
22	0	2	1	1	1	7,5	10
23	1	0	2	3	1,5	11,25	15
24	2	4	3	3	3	22,5	30

Anexo 6 - *Status* de CTC em relação às características clínico-patológicas dos grupos M+ e M0

Tabela A6.1 - *Status* de CTC em relação às características clínico-patológicas do grupo M+

Variável	CTC		Total de pacientes	p
	Presença	Ausência		
Idade (anos)				
<48	14	0	14	0,072
≥ 48	8	3	11	
Total	22	3	25	
Tamanho do Tumor (T)				
T1,T2,T3	14	2	16	1,000
T4	6	1	7	
Total	20	3	23	
Acometimento				
N0	9	1	10	1,000
N+	9	2	11	
Total	18	3	21	
Estadio clínico				
I,II,III	4	6	10	0,222
IV	9	4	13	
Total	13	10	23	
Grau Histológico				
1	1	0	1	1,000
2	16	1	17	
3	3	0	3	
Total	20	1	21	
Ki67				
≤10	1	1	2	0,195
>10	17	1	18	
Total	18	2	20	
Subtipo Molecular				
Luminal	14	2	16	1,000
Superexpressor HER2	4	1	5	
Triplo Negativo	4	0	2	
Total	22	3	25	
Status hormonal				
RH-	7	1	8	1,000
RH+	15	1	16	
Total	22	2	24	
Status HER2				
HER2-	13	0	13	0,199
HER2+	9	2	11	
Total	21	2	24	

Cont/ Tabela A6.1

Número de sítios de metástase				
1	4	2	6	0,133
>1	18	1	19	
Total	22	3	25	
Terapia				
Primeira Linha	10	2	12	1,000
Segunda linha ou subsequentes	8	1	9	
Total	18	3	21	
Tipo de tratamento				
Hormônio-, imunoterapia ou ambos	6	1	7	1,000
Quimioterapia apenas ou associada a outros tipos	16	2	18	
Total	22	3	25	

Tabela A6.2 – Status de CTC em relação às características clínico-patológicas do grupo M0

Variável	CTC		Total de pacientes	p
	Presença	Ausência		
Idade (anos)				
<45	14	0	14	0,163
≥ 45	8	2	10	
Total	22	2	24	
T				
T1,T2,T3	2	20	22	1,000
T4	0	2	2	
Total	2	22	24	
N				
N0	1	12	13	1,000
N+	1	10	11	
Total	2	22	24	
Estadio clínico				
I,II	2	14	16	0,536
III	0	8	8	
Total	2	22	24	
Grau Histológico				
1	0	4	4	1,000
2	1	9	10	
3	1	9	10	
Total	2	22	24	
Ki67				
≤10	1	4	5	0,395
>10	1	17	18	
Total	2	21	23	
Subtipo Molecular				
Luminal	12	1	13	1,000
Superexpressor HER2	2	0	2	
Triplo Negativo	8	1	9	
Total	22	2	24	
Status hormonal				
RH-	10	1	11	1,000
RH+	12	1	13	
Total	22	2	24	
Status HER2				
HER2-	18	2	20	1,000
HER2+	4	0	4	
Total	22	2	24	

Anexo 7 - Expressão de CKs e FOXC1 em CTCs de acordo com as características clínico-patológicas do grupo M0.

Variável	CKs		Total de pacientes	p	FOXC1		Total de pacientes	p
	+	-			+	-		
Idade (anos)*								
<45	8	6	14	0,204	6	8	14	0,649
≥ 45	2	6	8		2	6	8	
Total	10	12	22		8	14	22	
Tamanho do tumor (T)								
T1,T2,T3	8	12	20	0,195	8	12	20	0,515
T4	2	0	2		0	2	2	
Total	10	12	22		8	14	22	
Acometimento linfonodal (N)								
N0	3	9	12	0,084	4	8	12	1,000
N+	7	3	10		4	6	10	
Total	12	10	22		8	14	22	
Estadio clínico								
I,II	4	10	14	0,074	5	9	14	1,000
III	6	2	8		3	5	8	
Total	10	12	22		8	14	22	
Grau histológico								
1	1	3	4	0,853	2	2	4	1,000
2	4	5	9		3	6	9	
3	5	4	9		3	6	9	
Total	10	12	22		8	14	22	
Índice Ki67								
≤10%	2	2	4	1,000	1	3	4	1,000
>10%	7	10	17		7	10	17	
Total	9	12	21		8	13	21	
Subtipo Molecular								
Luminal	6	6	12	0,829	6	6	12	0,345
Superexpressor de HER2	1	1	2		0	2	2	
Triplo Negativo	3	5	8		2	6	8	
Total	10	12	22		8	14	22	

Cont/Tabela A7

<i>Status</i>									
Hormonal									
RH-	4	6	10	0,691	2	8	10	0,204	
RH+	6	6	12		6	6	12		
Total	10	12	22		8	14	22		
<i>Status HER2</i>									
HER2-	7	11	18	0,293	6	12	18	0,600	
HER2+	3	1	4		2	2	4		
Total	10	12	22		8	14	22		

Anexo 8 - Expressão de marcadores metabólicos nas amostras de tecido em relação às características clínico-patológicas, CTCs e CTM das pacientes do grupo M0 e M+.

Tabela A8.1 – Grupo M0

Variável	PGC-1 α		Total de pacientes	p	COXIV		Total de pacientes	p	MCT4		Total de pacientes	p
	Alta	Baixa			Alta	Baixa			Alta	Baixa		
Idade (anos)*												
<45	8	5	13	1,000	7	6	13	1,000	6	7	13	0,659
≥45	5	3	8		5	3	8		5	3	8	
Total	13	8	21		12	9	21		11	10	21	
Tamanho do tumor (T)												
T1,T2,T3	12	7	19	1,000	11	8	19	1,000	10	9	19	1,000
T4	1	1	2		1	1	2		1	1	2	
Total	13	8	21		12	9	21		11	10	21	
Acometimento linfonodal (N)												
N0	4	7	11	1,000	6	5	11	1,000	5	6	11	0,670
N+	4	6	10		6	4	10		6	4	10	
Total	8	13	21		12	9	21		11	10	21	
Estádio clínico												
I,II	9	5	14	1,000	8	6	14	1,000	8	6	14	0,659
III	4	3	7		4	3	7		3	4	7	
Total	13	8	21		12	9	21		11	10	21	
Grau histológico												
1	1	2	3	0,827	1	2	3	0,500	1	2	3	0,725
2	3	7	10		5	5	10		5	5	10	
3	4	4	8		3	2	8		5	3	8	
Total	8	13	21		12	9	21		11	10	21	
Índice Ki67												
≤10%	2	2	4	1,000	2	2	4	1,000	1	3	4	0,285
>10%	6	10	16		9	7	16		10	6	16	
Total	8	12	20		11	9	20		11	9	20	
Subtipo Molecular												
Luminal	3	9	12	0,350	9	3	12	0,080	5	7	12	0,659
Superexpressor de HER2	1	1	2		0	2	2		1	1	2	
Triplo Negativo	4	3	7		3	4	7		5	2	7	
Total	8	13	21		12	9	21		11	10	21	

Cont/Tabela A8.1

Status												
hormonal												
RH-	5	4	9	0,203	3	6	9	0,087	6	3	9	0,387
RH+	3	9	12		9	3	12		5	7	12	
Total	8	13	21		12	9	21		11	10	21	
Status HER2												
HER2-	7	11	18	1,000	12	6	18	0,063	9	9	18	1,000
HER2+	1	2	3		0	3	3		2	1	3	
Total	8	13	21		12	9	21		11	10	21	
CTC												
≤1,5	8	6	14	0,656	9	5	14	0,397	6	8	14	0,361
>1,5	5	2	7		3	4	7		5	2	7	
Total	13	8	21		12	9	21		11	10	21	
CTM												
Ausência	12	7	19	1,000	11	8	19	1,000	9	10	19	0,476
Presença	1	1	2		1	1	2		2	0	2	
Total	13	8	21		12	9	21		11	10	21	
Progressão												
Ausência	10	7	17	1,000	10	7	17	1,000	9	8	17	1,000
Presença	3	1	4		2	2	4		2	2	4	
Total	13	8	21		12	9	21		11	10	21	

Tabela A8.2 – Grupo M+

Variável	PGC-1α		Total de pacientes	p	COXIV		Total de pacientes	p	MCT4		Total de pacientes	p
	Alta	Baixa			Alta	Baixa			Alta	Baixa		
Idade (anos)*												
<48	4	3	7	1,000	4	3	7	1,000	3	4	7	1,000
≥ 48	3	3	6		3	3	6		3	3	6	
Total	7	6	13		7	6	13		6	7	13	
Tamanho do tumor (T)												
T1,T2,T3	4	4	8	1,000	3	5	8	0,592	1	1	2	1,000
T4	2	3	5		3	2	5		5	6	11	
Total	6	7	13		6	7	13		6	7	13	
Acometimento linfonodal (N)												
N0	3	2	5	1,000	2	3	5	1,000	3	2	5	1,000
N+	3	4	7		4	3	7		3	4	7	
Total	6	6	12		6	6	12		6	6	12	
Estádio clínico												
I,II,III	3	1	4	0,559	2	2	4	1,000	2	2	4	1,000
IV	4	5	9		5	5	9		4	5	9	
Total	7	6	13		6	7	13		6	7	13	
Grau histológico												
1	0	1	1	0,444	0	1	1	0,133	0	1	1	1,000
2	5	3	8		6	2	8		4	4	8	
3	0	1	1		0	1	1		1	0	2	
Total	5	5	10		6	4	10		5	5	10	
Índice Ki67												
≤10%	2	4	6	1,000	5	1	6	0,242	2	4	6	0,567
>10%	3	3	6		2	4	6		4	2	6	
Total	5	7	12		7	5	12		6	6	12	
Subtipo Molecular												
Luminal	5	4	9	1,000	5	4	9	1,000	4	5	9	0,706
Superexpressor de HER2	1	1	2		1	1	2		1	1	2	
Triplo Negativo	1	1	2		1	1	2		2	0	2	
Total	7	6	13		7	6	13		7	6	13	

Cont/Tabela A8.2

Status hormonal												
RH-	2	2	4	1,000	2	2	4	1,000	3	1	4	0,559
RH+	4	5	9		5	4	9		4	5	9	
Total	6	7	13		7	6	13		7	6	13	
Status HER2												
HER2-	6	2	8	0,103	6	2	4	0,103	6	2	4	0,103
HER2+	1	4	5		1	4	9		1	4	9	
Total	7	6	13		7	6	13		7	6	13	
Número de sítios de metástase												
1	2	1	3	1,000	2	1	3	1,000	2	1	3	1,000
>1	5	5	10		5	5	10		5	5	10	
Total	7	6	13		7	6	13		7	6	13	
CTC/mL de sangue												
≤1,5	5	4	9	0,559	5	4	9	1,000	5	4	9	1,000
>1,5	1	3	4		2	2	4		2	2	4	
Total	6	7	13		7	6	13		7	6	13	
CTM												
Ausência	3	3	6	1,000	3	3	6	1,000	3	3	6	1,000
Presença	4	3	7		4	3	7		3	4	7	
Total	7	6	13		7	6	13		6	7	13	
Progressão												
Ausência	1	1	2	1,000	1	1	2	1,000	2	0	2	0,192
Presença	6	5	11		5	6	11		4	7	11	
Total	7	6	13		6	7	13		6	7	13	

PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis

Valerie S. LeBleu^{1,2}, Joyce T. O'Connell², Karina N. Gonzalez Herrera³, Harriet Wikman⁴, Klaus Pantel⁴, Marcia C. Haigis³, Fernanda Machado de Carvalho⁵, Aline Damascena⁵, Ludmilla Thome Domingos Chinen⁵, Rafael M. Rocha⁵, John M. Asara^{6,7} and Raghu Kalluri^{1,2,8}

Cancer cells can divert metabolites into anabolic pathways to support their rapid proliferation and to accumulate the cellular building blocks required for tumour growth. However, the specific bioenergetic profile of invasive and metastatic cancer cells is unknown. Here we report that migratory/invasive cancer cells specifically favour mitochondrial respiration and increased ATP production. Invasive cancer cells use the transcription coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PPARGC1A, also known as PGC-1 α) to enhance oxidative phosphorylation, mitochondrial biogenesis and the oxygen consumption rate. Clinical analysis of human invasive breast cancers revealed a strong correlation between PGC-1 α expression in invasive cancer cells and the formation of distant metastases. Silencing of PGC-1 α in cancer cells suspended their invasive potential and attenuated metastasis without affecting proliferation, primary tumour growth or the epithelial-to-mesenchymal program. Inherent genetics of cancer cells can determine the transcriptome framework associated with invasion and metastasis, and mitochondrial biogenesis and respiration induced by PGC-1 α are also essential for functional motility of cancer cells and metastasis.

It is generally well established that dividing cells, including cancer cells, meet their metabolic demands through the process of aerobic glycolysis^{1,2}. The energy generated through aerobic glycolysis is thought to be sufficient to offset the energy demands associated with rapid cancer cell division, while simultaneously allowing accumulation of biosynthetic precursors needed for anabolic reactions^{1,2}. Despite enhanced glycolysis, cancer cells also operate mitochondrial respiration to derive a significant fraction of their ATP (ref. 3). In a growing tumour, adaptive metabolic reprogramming, precipitated in part by oncogenic transformation⁴, gives cancer cells a proliferative advantage^{5,6}. The autonomous metabolic reprogramming of rapidly proliferating cancer cells promotes self-sustaining signal transduction mechanisms to foster growth and survival⁵. However, the metabolic requirements of invasive and metastatic cancer cells that suspend their proliferative program to acquire a migratory phenotype are unknown. An improved understanding of the energetic demands of invading cancer cells may

inform therapeutic strategies to impair metastasis, the primary reason for death in cancer patients. We set out to conduct experiments to study the specific energy requirements of invasive and metastatic cancer cells, with a hope of unraveling additional mechanisms of metastasis.

RESULTS

Circulating cancer cells exhibit enhanced mitochondria biogenesis and respiration

GFP-labelled 4T1 mammary epithelial cancer cells were orthotopically implanted in the mammary fat pads of mice (Fig. 1a,b). Primary tumours emerge following implantation of cancer cells into the mammary fat pads of female mice and lung metastases develop with 100% penetrance⁷. Circulating cancer cells (CCCs, also referred to as circulating tumour cells or CTCs) and cancer cells from the primary tumours (PCCs) and metastatic lungs (MCCs) were purified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and their transcriptomes

¹Department of Cancer Biology, Metastasis Research Center, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77054, USA. ²Division of Matrix Biology, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts 02115, USA. ³Department of Cell Biology, Paul F. Glenn Laboratories for the Biological Mechanisms of Aging, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA. ⁴Department of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. ⁵International Research Center, A. C. Camargo Cancer Center, 01509-010, Sao Paulo, Brazil. ⁶Division of Signal Transduction, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts 02115, USA. ⁷Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA.

⁸Correspondence should be addressed to R.K. (e-mail: rkalluri@mdanderson.org)