

**COMPARAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE RECEPTORES
HORMONAIS E DE HER-2 ENTRE CÉLULAS TUMORAIS
CIRCULANTES E METÁSTASES DE CÂNCER DE MAMA**

SOLANGE MORAES SANCHES

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Ludmilla Thome Domingos Chinen

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

S684c Sanches, Solange Moraes
Comparação entre expressão de receptores hormonais e de HER-2 entre células tumorais circulantes e metástases de câncer de mama. Solange Moraes Sanches – São Paulo, 2021.
52p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Ludmillá Thome Domingos Chinen

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2. Metástase Neoplásica/ Neoplasm Metastasis. 3. Células Neoplásicas Circulantes/ Circulating Neoplastic Cells.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho recebeu apoio financeiro através de doação advinda do Ministério Público
(TAC-MP-PAJ- no. 000968.2012.10.000/0)

DEDICATÓRIA

À minha família, meus pais pelos ensinamentos, pelo exemplo e pela presença firme e amorosa em minha vida; ao meu marido por construirmos juntos uma história de vida; e aos meus filhos por me mostrarem a vida por ângulos diversos e me fazerem crescer dia a dia. Meu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ludmilla T D Chinen, por todo o apoio e direcionamento na condução deste estudo. Pelos compartilhamentos de experiência de vida, por nossa amizade ter se estendido além das discussões científicas.

Às pacientes que participaram deste estudo, e a todas as pacientes que permitem que sejamos parte de suas vidas.

Aos amigos de Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center, equipe coesa e da qual muito me orgulho de fazer parte. Por toda a convivência respeitosa e amizade sincera.

Ao Departamento de Radiologia do A.C.Camargo Cancer Center, especialmente a Dra. Paula Nicole Barbosa e Dr. Chiang Jeng Tyng (in memoriam) que abraçaram o projeto desde seu início.

À Alexcia Camila Braun e Vinícius Calsavara, pela colaboração imprescindível neste projeto.

À Suely Francisco, pelas repetidas orientações, ajustes e todo o suporte.

À toda equipe da Pós Graduação e Apoio ao Aluno.

RESUMO

Sanches SM. **Comparação entre expressão de receptores hormonais e de HER-2 entre células tumorais circulantes e metástases de câncer de mama.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

Introdução: O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres. A maioria deles é diagnosticada em estágios iniciais, quando o tratamento visa a cura. Mas apesar dos avanços no tratamento, metástases à distância podem ocorrer. A biópsia das lesões metastáticas é recomendada para confirmar o status do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), por ocorrerem discrepâncias nesses padrões entre tumores primários e metástases em até 40% dos casos. As células tumorais circulantes (CTCs) estão relacionadas às evoluções clínicas do câncer de mama e podem potencialmente desempenhar um papel substituto aos procedimentos invasivos de rebiópsia de metástase. A tecnologia ISET® (Isolation by Size of Tumor Cells, Rarecells-Diagnostics, Paris, França) não é usualmente empregada para detectar CTCs em pacientes com câncer de mama, embora seja reconhecida como uma ferramenta útil em alguns outros tumores. Existem dados emergentes de que a caracterização da expressão proteica das CTC pode refinar seu valor prognóstico. Sabe-se que o fator de transformação de crescimento (TGF- β) desempenha um papel na progressão e invasividade do câncer de mama. **Objetivos:** Comparar a expressão de RE, RP e HER2 em tumores primários, CTCs, metástases e avaliar a expressão do receptor TGF- β tipo 1 (TGF- β RI) em CTCs como fator prognóstico para sobrevida global. **Metodologia:** Estudo realizado no A.C.Camargo Cancer Center, Brasil. As amostras de sangue foram coletadas antes da biópsia guiada por tomografia computadorizada de lesões metastáticas suspeitas e processadas pela metodologia ISET®. Os níveis de expressão proteica das CTCs foram comparados aos de tumores primários e metástases e correlacionados aos resultados clínicos. Todos os dados clinicopatológicos foram obtidos dos prontuários médicos. **Resultados:** Dos 39 pacientes inicialmente incluídos, 27 tiveram tanto a biópsia de metástases quanto a coleta de sangue e foram considerados para análise. As taxas de concordância para a expressão de RE, RP e HER2 entre tumores primários e metástases foram altas. Não foi observada nenhuma perda de expressão de HER2 nas metástases e os tumores triplo negativos mantiveram o mesmo padrão em todas as metástases (p <0,0001).

Quando as metástases e CTCs foram classificadas como triplo negativo (TN) ou não – TN, as CTCs determinaram alta especificidade (93%), acurácia (84,2%) e valor preditivo negativo (88%). A sobrevida global mediana de pacientes sem expressão de TGF- β RI em CTCs foi de 42,6 x 20,8 meses para os positivos, clinicamente relevante, porém sem significância estatística ($p > 0,05$). **Conclusões:** No câncer de mama, o papel das CTCs detectadas pelo ISET® ainda não está estabelecido. Com este estudo, sugerimos que esta metodologia possa ser útil para avaliar metástases em casos de tumores não TN, assim como a expressão de TGF- β RI em CTCs, o que pode impactar a sobrevida. Devido à limitação da amostra, estudos futuros devem se concentrar em subtipos específicos de câncer de mama, ampliando a coorte.

Descritores: Neoplasias da Mama. Metástase Neoplásica. Células Neoplásicas Circulantes

ABSTRACT

Sanches SM. [Comparison of hormonal receptor expression and HER2 status in circulating tumor cells and breast cancer metastases]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

Introduction: Breast cancer (BC) is the most common neoplasm in women. Most of BC are diagnosed in early stages, when treatment aims cure. Despite advances in BC treatment, distant metastases may develop. Biopsy of metastatic lesions is recommended to confirm estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status, due to discrepancies in these patterns between primary tumors/metastasis in up to 40% of cases. Circulating Tumor Cells (CTCs) are related to breast cancer outcomes and could potentially play a role surrogating invasive procedures of metastasis rebiopsy. ISET® (Isolation by Size of Tumor Cells, Rarecells-Diagnostics, Paris, France) technology is not currently employed to detect CTCs in breast cancer patients, although recognized as a useful tool in some other tumors. There are emerging data that characterization of CTC protein expression can refine its prognostic value. Transforming growth factor (TGF)- β play a role in progression/invasiveness of BC. **Objectives:** To compare ER, PR and HER2 expression in primary tumors, CTCs, metastases and to evaluate TGF- β type 1 receptor (TGF- β RI) expression in CTCs as prognostic factor for overall survival. **Methods:** Study conducted at the A.C.Camargo Cancer Center, Brazil. Blood samples were processed in ISET® before computed tomography-guided biopsy of suspected metastatic lesions. Protein expression levels in CTCs were compared to those in primary tumors/metastases and correlated to clinical outcomes. All clinicopathological data were obtained from medical records. **Results:** From the 39 patients initially included, 27 had both biopsy of metastases and blood collection and were considered for analysis. Concordance rates for ER, PR and HER2 expression between primary tumors/metastases were high. No loss of HER2 expression at any metastasis site and retention of the same pattern in all triple-negative (TN) tumors ($p < 0.0001$) were observed. When metastases/CTCs were classified as TN/non-TN, CTCs showed high specificity (93%), accuracy (84.2%) and negative predictive value (88%). The median overall survival of patients with no TGF- β RI expression in CTCs was 42.6 x 20.8 months for positive ones, clinically relevant but not statistically significant

($p > 0.05$). **Conclusions:** In BC, the role of CTCs detected by ISET® is not yet established. Here, we could suggest that this methodology may be useful to evaluate metastasis in non-TN cases as also TGF- β RI expression in CTCs, which may impact survival. Due to sample limitation, future studies must focus on specific subtypes of BC, expanding the cohort.

Keywords: Breast Neoplasms. Neoplasm Metastasis. Neoplastic Cells, Circulating.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BRCA	<i>Breast cancer gene</i>
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CD45	<i>Cluster of differentiation 45</i>
CDK4/6	<i>Cyclin-dependent kinase 4/6</i>
CEP	<i>Comitê de Ética em Pesquisa</i>
CTCs	<i>Células tumorais circulantes</i>
cTNM	<i>Clinical Tumor Node Metastasis Staging</i>
DAB	<i>3,3'diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialists'Cooperative Group</i>
EDTA	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptos</i>
FDG-PET/CT	<i>Fluorodeoxyglucose-positron Emission Tomography/Computed Tomography</i>
HER-2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
INCA	<i>Instituto Nacional do Câncer</i>
ISET	<i>Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells</i>
PAM 50	<i>Prediction Analysis of Microarray 50</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) Polymerase</i>
PBS	<i>Phospharte-buffered Saline</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 kinase</i>
pTNM	<i>Patohological Tumor Node Metastasis Staging</i>
RE	<i>Receptor de estrógeno</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
RP	<i>Receptor de Progersterona</i>
SWOG	<i>Southwest Oncology Group</i>
TCLE	<i>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</i>
TDM-1	<i>Trastuzumabe-emtansina</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Mama	1
1.2	Tratamento do Câncer de Mama	3
1.3	Perfil de expressão gênica da metástase do câncer de mama pode diferir do tumor primário	6
1.4	Células Tumorais Circulantes (CTCs)	7
1.5	CTCs e Câncer de Mama	7
1.6	Divergências de perfil molecular entre tumor primário, metástases e CTCs	9
2	OBJETIVOS	11
3	METODOLOGIA	12
3.1	Pacientes e Desenho do Estudo	12
3.2	Isolamento de CTCs	13
3.3	Imunocitoquímica	13
3.4	Análise Estatística	14
4	RESULTADOS- LINK DO ARTIGO PUBLICADO	15
5	CONCLUSÕES	16
6	REFERÊNCIAS	17

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

APÊNDICE

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Apêndice 2 Tabela Suplementar 1 – Características clinicopatológicas e caracterização molecular das CTCs das pacientes

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença de grande importância em termos de saúde mundial e de impacto econômico, por ser uma das mais incidentes em mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 12,5% das mulheres desenvolverão câncer de mama durante sua vida (National Cancer Institute-NCI. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program-SEER 2016). Dados americanos estimam 279.100 novos casos de câncer de mama para 2020, e que 42.170 mulheres irão a óbito em decorrência desta doença (Siegel et al. 2020). No Brasil, para o triênio 2020-2022, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 66.280 casos novos de câncer de mama, correspondendo a 29,7% de todos os cânceres em mulheres (excetuando-se os casos de pele não melanoma) (Ministério da Saúde 2020). É o tumor mais frequente nas mulheres das regiões Sul, Sudeste, Centro Oeste e Nordeste e o segundo mais frequente na região Norte do Brasil.

Há diversos fatores de risco que aumentam a chance de desenvolvimento do câncer de mama, mas em cerca de 50% das mulheres não há fator de risco identificável (Morrow 1999).

O histórico familiar tem sido considerado um importante fator de risco para a doença, mas somente 5-10% das mulheres que desenvolvem câncer de mama têm uma verdadeira predisposição genética. O risco de desenvolver câncer de mama aumenta em 1,5 a 3 vezes se a mulher tem irmã ou mãe com câncer de mama. Mulheres portadoras de mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA 2 têm um risco de até 65% de desenvolver câncer de mama durante a vida, comparadas a cerca de 12,5% da população geral (de Vita et al. 2011).

O desenvolvimento do câncer de mama em muitas mulheres parece estar relacionado aos hormônios femininos reprodutivos. A menarca precoce, a nuliparidade, a idade avançada para gravidez e a idade de menopausa interferem no risco de câncer de mama (McPherson et al. 2000). Mulheres no período da pós-menopausa, obesas e fazendo o uso de terapia de reposição hormonal apresentam aumento do risco do câncer de mama (Hsieh et al. 1990; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 1997; De Pergola e Silvestris 2013).

Outros fatores de risco bem conhecidos para o desenvolvimento de câncer de mama são: o envelhecimento, o consumo excessivo de álcool, o sedentarismo, a exposição à

radiação ionizante e a alta densidade do tecido mamário (razão entre tecido glandular e tecido adiposo da mama) (McPherson et al. 2000).

O câncer de mama não é uma doença única, pois apresenta características biológicas, genéticas e moleculares que determinam uma complexa heterogeneidade na apresentação, evolução, resposta ao tratamento e prognóstico. A individualização do tratamento e o prognóstico do câncer de mama é uma resultante de diversos fatores, como a extensão do acometimento neoplásico, o tipo histológico, grau de diferenciação e taxa de proliferação celulares, expressão de receptores hormonais e amplificação do gene HER-2 (Fitzgibbons et al. 2000).

Para a definição do tratamento a ser oferecido para a paciente com câncer de mama, é necessário inicialmente estabelecer o estadiamento da doença, que leva em consideração o tamanho do tumor, o estado de linfonodos regionais e a presença ou não de metástases à distância. Atualmente, utilizamos a classificação TNM da AJCC 8ª edição (Brierley et al. 2017). Há a classificação clínica, designada como cTNM, obtida a partir do exame físico e análise de imagens e a classificação patológica, pTNM, que estadia os tumores a partir das características patológicas observadas após a cirurgia.

A análise do perfil de expressão dos genes expressos no tumor classifica o câncer de mama em subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, HER-2 positivo e basalóide. Os subtipos intrínsecos estão diretamente correlacionados com o prognóstico do câncer de mama (Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001; Sotiriou et al. 2003).

Os subtipos luminais caracterizam-se pela expressão de genes presentes em células epiteliais luminais normais da mama, com expressão de citoqueratinas 8 e 18, receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP). O subtipo luminal A possui alta expressão de receptores hormonais e baixa expressão de genes relacionados com proliferação celular e HER-2. Correspondem a 40% de todos os casos de câncer de mama e apresentam o melhor prognóstico. O subtipo luminal B é responsável por cerca de 20% dos casos, apresenta expressão de genes relacionados ao RE, porém em menor intensidade do que o subtipo luminal A, expressão variável de genes associados ao HER-2 e alta expressão de genes ligados à proliferação celular. Este subtipo tem pior prognóstico quando comparado ao luminal A. O subtipo HER-2 (10 a 15% dos casos de câncer de mama) é caracterizado pela alta expressão de HER-2 e de genes relacionados com proliferação celular e baixa expressão do grupo de genes luminal. Por esta razão, estes tumores tipicamente não apresentam RE e RP, mas são HER-2 positivos. A história natural deste subtipo, de prognóstico adverso, foi radicalmente modificada pela introdução de terapia alvo anti-HER-2. O subtipo basalóide (15

a 20% dos casos de câncer de mama) apresenta perfil de expressão gênica semelhante ao das células epiteliais basais e mioepiteliais, que inclui a expressão de citoqueratinas 5, 6, 14 e 17, além de EGFR, p63, P-caderina ou caveolina-1. Apresenta baixa expressão do grupo de genes luminais e HER-2 e, por este motivo, é tipicamente negativo para RE, RP e HER-2, o que levou ao uso disseminado da nomenclatura “triplo-negativo” para este tipo de neoplasia. Apesar da maioria dos tumores triplo-negativos serem basalóides e a maioria dos tumores basalóides serem triplo-negativos, existe uma discordância de aproximadamente 30% entre estas duas classificações e elas não podem ser vistas, portanto, como sinônimo uma da outra (Gluz et al. 2009).

Os estudos de expressão gênica não são utilizados de forma sistemática na prática clínica, principalmente por necessitarem de material congelado para sua execução. Um teste desenvolvido recentemente para classificação molecular do câncer de mama, chamado PAM50, pode ser usado em tecido fixado em parafina, porém ainda não está validado para permitir o uso clínico (Parker et al. 2009).

Na prática clínica, utilizamos informações advindas do perfil imunoistoquímico dos receptores hormonais, da taxa de proliferação celular medida pelo ki-67 e a presença de amplificação do gene HER-2, para classificar em subtipos intrínsecos. Esta forma de classificação não é completamente superponível ao da expressão gênica (Carey et al. 2006; Cheang et al. 2008), contudo, é a utilizada na prática clínica. Assim, classifica-se como Luminal A os tumores com expressão RE e RP, HER-2 negativos e com baixo índice de proliferação ($Ki67 < 15\%$) e como luminal B aqueles com expressão de RE e RP menor que 20% ou alto índice de proliferação ($Ki67 \geq 15\%$). Os tumores luminais B podem ou não apresentar superexpressão de HER-2, sendo denominados respectivamente de luminal B HER-2 positivo e luminal B HER-2 negativo.

Os tumores com superexpressão de HER-2 e com RE e RP negativos são chamados de HER-2 enriquecido ou HER-2 puro e aqueles em que não há a expressão de RE, RP e HER-2, de tumores triplo negativos (Park et al. 2012).

1.2 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

O tratamento do câncer de mama vem evoluindo ao longo dos anos em função de um maior entendimento desta doença e de um melhor arsenal de tratamento. Tumores restritos à mama e linfonodos regionais, sem metástases à distância são potencialmente curáveis, utilizando-se de cirurgia, radioterapia e tratamento sistêmico (quimioterapia, hormonioterapia

e terapias alvo, a depender do subtipo intrínseco). O tratamento cirúrgico exclusivo não apresentava altas taxas de cura, a associação de radioterapia melhorou a taxa de controle local e o tratamento sistêmico contribuiu com aumento na sobrevida das pacientes com câncer de mama não metastático (Toonkel et al. 1986; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group-EBCTCG 2005).

O tratamento cirúrgico está indicado para todas as pacientes sem metástases à distância. A extensão da cirurgia depende de vários fatores, tais como o tamanho do tumor, a localização na mama, a relação entre tamanho tumoral e o tamanho da mama, entre outros. Inclui também a definição do estado de comprometimento linfonodal axilar pelo tumor, indo desde a pesquisa e exérese de linfonodo(s) sentinela(s) até a linfadenectomia axilar de vários níveis, a depender da extensão do caso. A quimioterapia neoadjuvante pode ser oferecida como tratamento inicial em tumores de mama localmente avançados e casos selecionados de estádios mais precoces.

O tratamento sistêmico é definido a partir do risco de recorrência do tumor e para isso, são utilizados parâmetros clínicos (estadiamento), anatomopatológicos (tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico, número de linfonodos acometidos) e imunoistoquímicos (RE, RP, Ki 67 e HER-2). Estas informações embasam a estimativa prognóstica e a definição da terapêutica sistêmica a ser proposta para a paciente. Os consensos de tratamento, como o consenso de Saint Gallen, em que expoentes no tratamento do câncer de mama discutem e deliberam sobre vários aspectos do câncer de mama, são muito valorizados pelos oncologistas clínicos para a decisão de tratamento sistêmico, bem como as diretrizes determinadas por sociedades oncológicas americanas, europeias, adequadas ao contexto brasileiro.

Assim, o tratamento do câncer de mama não metastático envolve a cirurgia e tratamentos adjuvantes, como a quimioterapia, a hormonioterapia, e em alguns casos a radioterapia (cirurgias conservadoras, linfonodo comprometido, entre outros). Esses tratamentos adjuvantes são realizados dependendo do risco de recorrência da doença e determinaram um menor risco de recidiva e de morte para estas pacientes. Porém, mesmo com os avanços em termos de tratamento, nem todas as pacientes podem ser consideradas curadas e uma porcentagem significativa das mulheres acometidas por câncer de mama desenvolverá uma doença metastática, a despeito do tratamento adjuvante.

Mesmo em pacientes consideradas como de excelente prognóstico por portarem um tumor de até 2 cm, sem linfonodos comprometidos (pT1N0- estágio clínico I) e com expressão de receptores hormonais, as taxas de recidiva após tratamento consideradas ideais não são desprezíveis (Pan et al. 2017). Há uma metanálise publicada em 2017 mostrando que

mesmo após 5 anos de hormonioterapia adjuvante, 14% das pacientes com tumores T1N0 apresentaram metástases à distância em 5 a 14 anos após o tratamento, elevando a 41% se houvesse comprometimento linfonodal (Pan et al. 2017). Tumores com mais de 2cm (T2) evoluem com 21% de recidiva à distância, chegando a 49% se houver mais de 4 linfonodos comprometidos. O risco de recidiva em tumores com expressão de receptores hormonais (luminais) permanece estável mesmo após 20 anos de tratamento, com recidivas bem tardias. Tumores luminais metastáticos são tratados com hormonioterapia (exceto em situações com um quadro de comprometimento grave das funções orgânicas, denominado crise visceral). A associação de agentes hormonais a inibidores de CDK4/6, comparado a hormonioterapia isolada, elevou as taxas de resposta, sobrevida livre de progressão e sobrevida global (Schettini et al. 2020). O sequenciamento do tratamento da doença luminal metastática dependerá do padrão e intervalo para progressão, presença de mutações específicas (como a de PI3K no tumor e BRCA germinativo), postergando ao máximo o início da quimioterapia (André et al. 2019; Robson et al. 2019).

O prognóstico dos tumores de mama triplo-negativos é altamente desfavorável, com probabilidade de óbito significativamente maior em relação aos outros subtipos (42,2% versus 28%, respectivamente; $p < 0,0001$), com sobrevida mediana de 4,2 anos para pacientes com câncer de mama triplo-negativo e 6 anos para as pacientes com outros subtipos de tumor ($p < 0,0001$) (Banerjee et al. 2006). Todas as mortes por câncer de mama no subgrupo triplo-negativo ocorreram dentro de 10 anos do diagnóstico, concentrando-se nos primeiros anos após término do tratamento, distinto do comportamento dos tumores luminais. A recorrência à distância é mais frequente nas mulheres com tumores subtipo triplo negativo do que nos demais subtipos (33,9% versus 20,4%; $p < 0,0001$) ocorrendo mais precocemente (2,6 versus 5,0 anos, respectivamente; $p < 0,0001$). Isto denota o caráter mais agressivo dos tumores triplo-negativos e uma tendência ao desenvolvimento de recidivas sistêmicas e morte por câncer mais precoce neste subtipo em relação aos tumores não triplo-negativos (Dent et al. 2007). Estratégias atuais de tratamento envolvendo a imunoterapia na doença metastática vem sendo empregadas, proporcionando ganho de sobrevida (Schmid et al. 2018; Cortes et al. 2020).

Os tumores de mama com superexpressão de HER-2 também apresentam uma maior agressividade que os luminais, porém sua evolução natural foi significativamente alterada com a associação do bloqueio de HER-2 com trastuzumabe à quimioterapia adjuvante. A redução no risco de recidiva com a associação trastuzumabe-quimioterapia comparada à quimioterapia exclusiva foi de 52%, com redução de 1/3 das mortes (Romond et al. 2005). A

quimioterapia neoadjuvante associada ao bloqueio duplo de HER-2 (trastuzumabe e pertuzumabe) tem indicação padrão para os tumores de mama HER-2 positivos maiores de 2 cm ou com comprometimento linfonodal, tendo um papel prognóstico e indicativo de decisão de tratamento adjuvante (Gianni et al. 2016; van Ramshorst et al. 2018; von Minckwitz et al. 2019). Tumores menores de 2 cm podem ter um descalonamento de tratamento, com associação de trastuzumabe e paclitaxel (Tolaney et al. 2015).

O tratamento da doença metastática HER-2 positiva também sofreu evolução nos últimos anos, principalmente pela introdução dos anticorpos monoclonais bloqueadores de HER-2 (trastuzumabe e pertuzumabe). Para a doença metastática, já havia sido demonstrada a superioridade da associação trastuzumabe- quimioterapia, com ganho de cerca de 6 meses na sobrevida livre de progressão. O bloqueio duplo com trastuzumabe e pertuzumabe associado à quimioterapia permitiu taxas de sobrevida nunca antes esperadas, de mais de 56 meses, para uma doença metastática de caráter muito agressivo (Baselga et al. 2012). Em novas progressões, o uso de um anticorpo conjugado a droga, o TDM-1 (trastuzumabe -emtansine), acrescentou ganhos em sobrevidas livre de progressão e global (Verma et al. 2013) e novas drogas como o trastuzumabe-deruxtecan e tucatinibe emergem como opções subsequentes de tratamento (Modi et al. 2020; Murthy et al. 2020).

Pacientes com tumores luminais ou triplo negativos e com mutação germinativa de BRCA também contam com o olaparibe, um inibidor de PARP, como opção de tratamento para doença metastática, com resultados superiores à quimioterapia e como parte da adjuvância em doença de alto risco de recidiva (Robson et al. 2019; Tutt et al. 2021).

1.3 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA METÁSTASE DO CÂNCER DE MAMA PODE DIFERIR DO TUMOR PRIMÁRIO

O padrão de expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e de HER-2 pode apresentar discordância quando analisado no tumor primário e na metástase. Estudos retrospectivos (Curtit et al. 2013; Yang et al. 2014; Shachar et al. 2017) e prospectivo (Amir et al. 2012) mostram resultados discordantes em relação ao tumor primário, com mudança na expressão de receptores de estrógeno (geralmente tornando-se negativos) variando entre 16 e 20%, para receptores de progesterona entre 29 e 40% e para HER-2 de 4 a 10% (tanto perda de expressão, como superexpressão de HER-2 na metástase). O estudo prospectivo (Amir et al. 2012) mostrou que 14% das pacientes desenvolveram metástases com perfil discordante do

tumor primário, com possibilidade de adequação do tratamento ao perfil atual. Há o questionamento do real valor das re-biópsias rotineiras (Chia 2012), embora forneçam informações que podem modificar a estratégia de tratamento e sejam recomendadas na primeira recidiva por algumas diretrizes (National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2021; Cardoso et al. 2020). Alguns estudos mostram um pior prognóstico para os casos com mudança do perfil de receptores hormonais e HER-2 (Yang et al. 2014).

1.4 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES (CTC)

O processo metastático é complexo, com muitos passos desde o desprendimento de células do tumor primário: a célula precisa migrar pelo tecido adjacente, invadir e circular através dos vasos sanguíneos, mantendo-se viável até a implantação e proliferação em órgãos distantes. Este processo pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento tumoral, precocemente ou em fases mais tardias (Sahai 2007).

A presença de células tumorais circulantes (CTCs) no sangue periférico foi relatada pela primeira vez por Thomas Ashworth (1869), um médico austríaco, após necrópsia de um paciente com tumores subcutâneos metastáticos, situados na parede anterior do tórax e do abdômen. Ele observou células na circulação idênticas às provenientes dos tumores e postulou que se estas células eram oriundas de uma estrutura tumoral existente, elas deviam ter atravessado grande parte do sistema circulatório para alcançar a parte interna da veia safena da perna direita, local onde foram detectadas.

As CTCs carregam alterações genéticas encontradas no tumor primário (Fehm et al. 2002; Aktas et al. 2016) e acredita-se que iniciem os depósitos celulares que se desenvolverão em metástases. Deste modo, a detecção e quantificação destas células no sangue periférico pode se constituir em um marcador facilmente acessível da situação atual do tumor, com potencial valor prognóstico e preditivo de resposta (Rahbari et al. 2010).

A quantificação de CTCs por um procedimento minimamente invasivo, uma simples coleta de sangue periférico, define o conceito de se utilizá-las como uma biópsia líquida.

1.5 CTCs E CÂNCER DE MAMA

Um estudo inicial comparou a presença de CTCs em pacientes com câncer de mama metastático e pacientes saudáveis, observando mais de 5 CTCs em 7,5ml de sangue em 26%

delas (Allard et al. 2004). Estudos posteriores estabeleceram a presença de CTC como um fator independente de pior sobrevida, resposta desfavorável ao tratamento e recorrência precoce em diversos tumores (Wiedswang et al. 2003; Smerage et al. 2014; Janni et al. 2016; Lv et al. 2016). Em pacientes não metastáticas, a presença de CTCs após 2 e 5 anos do término do tratamento (neo)adjuvante correlacionou-se com alto risco de recidiva (Sparano et al. 2018; Trapp et al. 2019).

Em 2004, Cristofanilli et al. realizaram contagem das CTCs antes e após o início do tratamento do câncer de mama metastático em 177 pacientes. Observou-se menor sobrevida livre de progressão (2,7 x 7,0 meses, $p < 0,001$) e menor sobrevida global (10,1 x 18,0 meses, $p < 0,001$) quando a contagem de CTCs era igual ou superior a 5 células a cada 7,5 mL de sangue. Pela análise multivariada, os níveis de CTCs antes e após o início do tratamento mostraram ser preditores significativos de sobrevidas livre de doença e global (Cristofanilli et al. 2004).

Em 195 pacientes com câncer de mama metastático, a contagem de CTCs foi relacionada aos sítios de metástases identificados por FDG-PET/CT (*2-fluorine-18-fluoro-2-deoxy-D-glicose-positron emission tomography /computed tomography*). Neste estudo, a presença de metástases ósseas correlacionou-se com números elevados de CTCs em relação às pacientes com metástases em outros sítios (média de CTCs de 65,7 x 3,3; $p=0,0122$) e com a extensão do acometimento ósseo, se múltiplas lesões ou até 2 lesões ósseas (média de CTCs de 77,7 x 2,6; $p < 0,001$). Na análise multivariada, o número de CTCs, mas não a presença de metástase óssea isolada foi preditor significativo de sobrevida global (De Giorgi et al. 2010).

O estudo clínico SWOG S0500 avaliou o benefício de uma alteração precoce na quimioterapia para pacientes com câncer de mama com aumento persistente de CTCs no primeiro follow-up após o início da quimioterapia de primeira linha. De 595 pacientes avaliáveis, não separados por subtipo de câncer de mama, 123 pacientes com CTCs persistentemente elevadas no dia 21 do tratamento foram randomizados para continuar o mesmo tratamento ou para mudar para uma quimioterapia alternativa de escolha do médico (Smerage et al. 2014). Observou-se que a interrupção precoce para troca de esquema de quimioterapia não aumentou a sobrevida global, ressaltando-se a informação exclusivamente prognóstica das CTCs. Porém, devemos considerar que a não resposta a uma linha subsequente de tratamento pode também ser atribuída a não existência de uma terapia efetiva após falha ao primeiro tratamento. Um estudo posterior, incluindo somente pacientes luminais em primeira linha de doença metastática, comparou a eficácia do tratamento escolhido pelas informações clínicas a priori ou guiado pelo número de CTCs (Bidard et al. 2021). Neste

estudo, mostrou-se que a mudança do tratamento previamente definido, guiada pelo número de CTCs, melhorou a evolução das pacientes que necessitaram intensificação do mesmo e não interferiu na sobrevida livre de progressão das que puderam ser descalonadas.

Desta forma, a presença de CTCs em pacientes com câncer de mama pode ser considerada como uma ferramenta prognóstica e de potencial valor preditivo de resposta a tratamento e a caracterização fenotípica dessas células poderia ser uma abordagem mais promissora.

1.6 DIVERGÊNCIAS DE PERFIL MOLECULAR ENTRE TUMOR PRIMÁRIO, METÁSTASES E CTCs

Divergências genéticas entre o tumor primário e suas metástases são relatadas e podem impactar na eficiência do tratamento, visto que biomarcadores do tumor primário podem não refletir o estado atual das metástases e não serem suficientemente informativos para direcionar o tratamento (Almendro et al. 2014). Esta discrepância já foi identificada por meio de imunistoquímica (Amir et al. 2012; Curtit et al. 2013; Yang et al. 2014; Shachar et al. 2017), porém, métodos que sejam menos invasivos e possibilitem um acompanhamento em “tempo real” das mudanças que ocorrem durante a progressão tumoral são desejados.

Já é relatado em literatura que as CTCs refletem de forma mais fidedigna as alterações encontradas nas metástases do que aquelas do tumor primário do qual se originaram, tornando a “biópsia líquida” um instrumento da medicina de precisão (Onstenk et al. 2016).

As CTCs podem apresentar amplificação de HER-2 mesmo em tumores primários HER-2 negativos (Mikulová et al. 2014), sendo associados com menores sobrevidas livre de doença e global (Georgoulis et al. 2012). As pacientes com amplificação de HER-2 somente na metástase, quando expostas ao bloqueio HER-2 evoluíram com redução no número de CTCs (Agelaki et al. 2015). O estudo DETECT III mostrou que pacientes com tumores HER-2 negativos, mas com CTCs HER-2 positivas apresentaram ganho de sobrevida global com o tratamento com lapatinibe, sugerindo ser a expressão de HER-2 nas CTCs um biomarcador de benefício ao bloqueio HER-2, independentemente da expressão primária do tumor (Fehm et al. 2020).

Outros estudos, como o DETECT V, não empregam intervenções guiadas pelas características das CTCs, mas tem como objetivo desenvolver um escore de responsividade endócrina baseada no fenótipo das CTCs (Friedl et al. 2020).

Até o momento, a aplicabilidade prática das CTCs no câncer de mama tem sido em parte limitada pelo fato de que a contagem exclusiva do número de células não é suficiente para tomada de decisões em uma situação que cursa com alta heterogeneidade molecular e funcional. Uma melhor caracterização das CTCs poderá potencialmente ser mais informativa do que biópsias dirigidas da metástase, pelo caráter dinâmico das biópsias líquidas. As características funcionais das CTCs estão sendo atualmente identificadas para personalizar a terapia e monitorar a resposta, acompanhando a evolução de resistência ao tratamento, como em outro estudo em andamento, cujos resultados darão um panorama do perfil de heterogeneidades tumoral e molecular que ocorrem durante o tratamento (Paoletti et al. 2015).

Como perspectiva para as “biópsias líquidas”, a partir do momento em que as informações mostrarem-se preditivas, e que uma estratégia específica seja de valor em interferir no curso clínico de um tumor de forma não possível com métodos de imagem convencionais ou marcadores sorológicos (que somente demonstram progressão, mas não os “drivers” moleculares), ela pode ser realisticamente associada a um novo padrão no manejo dos tumores sólidos (Markman 2016). Considerando que as CTCs constituem um dos compartimentos da “biópsia líquida”, seria interessante comparar seu perfil de expressão protéica com o perfil de expressão protéica das metástases, para verificar se as CTCs podem ser usadas em como substitutas de biópsias de sítios metastáticos.

2 OBJETIVOS

- ✓ Detectar CTCs no sangue periférico de pacientes com câncer de mama metastático e correlacionar sua expressão protéica de receptores hormonais e HER-2 com a mesma expressão protéica no tumor primário e nas metástases.

- ✓ Avaliar a expressão de TGF- β RI nas CTCs e correlacioná-la com sobrevidas livre de progressão e global.

3 METODOLOGIA

3.1 PACIENTES E DESENHO DO ESTUDO

Este estudo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 2345/17) Anexo 1, foi composto por duas coortes de pacientes com câncer de mama atendidas no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil: uma prospectiva, incluindo pacientes no período de setembro de 2017 a julho de 2019 e uma coorte retrospectiva tratada entre outubro de 2013 e janeiro de 2015 (amostras de pacientes de outro estudo não publicado), ambos com indicação clínica de biópsia devido a achados de imagem de lesão suspeita de metástase. Além, disso, deveriam ter idade superior a 18 anos e extensão da doença mensurável pelos critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos (RECIST) Versão 1.1.34. Foram excluídas pacientes com metástases ósseas exclusivas ou com histórico prévio de outras neoplasias. A exclusão de pacientes com metástases ósseas como sítio único de metástase, deveu-se à potencial alteração na imunogenicidade pelo processo de descalcificação do material, comprometendo os resultados da imunohistoquímica para RE, RP e HER2.

Amostras de sangue foram coletadas no momento imediatamente anterior à realização de biópsia de lesão suspeita de metástase no Departamento de Imagem do referido hospital e em uma paciente previamente ao procedimento cirúrgico de ressecção de metástase cerebral. A expressão protéica de RE, RP e HER2 das CTCs obtidas do sangue das pacientes foi comparada com as expressões do tumor primário e da metástase (em comparação com laudo anatomopatológico dos prontuários das pacientes do A.C.Camargo Cancer Center). As amostras de biópsia foram consideradas RE e RP positivas se 1% a 100% dos núcleos do tumor estivessem corados na imunoistoquímica, e HER-2 positivo se houvesse coloração completa da membrana em mais de 10% das células (3+) ou amplificada por hibridização in situ se coloração moderada (2+), de acordo com as diretrizes atualizadas da ASCO / CAP.

As características clínicas e patológicas dos pacientes também foram obtidas nos prontuários médicos (Tabela 1 do artigo aceito para publicação e Tabela Suplementar 1 em Anexos).

Participaram do estudo apenas as pacientes que leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). A identificação dos pacientes foi feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

3.2 ISOLAMENTO DE CTCs

Para cada paciente, no momento imediatamente antes da abordagem da lesão suspeita de metástase, 8 mL de sangue foram coletados, por punção venosa periférica, em tubos EDTA (BD Vacutainer®) e mantidos sob homogeneização por até 4 horas, à temperatura ambiente, até realização da filtração.

A filtração foi empregada para o isolamento pelo tamanho de células tumorais epiteliais (ISET®; Rarecells Diagnostics, Paris, França), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Após filtragem, as membranas foram lavadas com PBS, secas ao ar livre “overnight” e estocadas a -20°C até o momento da análise.

3.3 IMUNOCITOQUÍMICA

Os ensaios de imunocitoquímica foram realizados em membranas ISET®, para análise de expressão de RE, RP, HER2 e TGF β -RI. As membranas contendo as CTCs capturadas foram cortadas e colocadas em placas de 24 poços para recuperação antigênica, seguidas de hidratação. As células foram permeabilizadas e a peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio.

Os spots das membranas foram então submetidos à imunocitoquímica de dupla marcação (diaminobenzidina [DAB] + / Permanente Vermelho; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) e incubadas com anticorpos diluídos em solução salina tamponada com Tris e soro fetal bovino a 10%. Para amplificar o sinal do anticorpo, os spots foram incubados com o sistema Envision G / 2 Doublestain, coelho / camundongo (Agilent Technologies), seguido de incubação com DAB + / vermelho permanente (Agilent Technologies). As células foram coradas com hematoxilina e analisadas em microscópio óptico (BX61; Olympus, Tóquio, Japão).

Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti HER-2 (diluição 1:400, lote #4290S; Cell Signaling Technologies, Danvers, Massachusetts, EUA), anti RE (diluição 1:300, lote SL2494175A; Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), anti TGF- β RI (diluição 1:500, lote 3066103; Merck, Darmstadt, Alemanha) e anti RP (diluição 1:100, CusAbio, lote G02275; CusAbio, Houston, Texas, EUA).

Para confirmar que as CTCs analisadas não eram leucócitos, utilizamos anticorpo anti-CD45 (diluição 1: 100; loteF1222Y; CusAbio, Houston, Texas, EUA). As CTCs foram caracterizadas com base nos seguintes critérios: coloração negativa para CD45, núcleo

hipercromático e irregular com tamanho $\geq 12 \mu\text{m}$, presença visível de citoplasma e alta taxa de núcleo para citoplasma (0,8). As contagens de CTC foram determinadas como o número de CTCs por mL de sangue, e cada spot da membrana ISET® foi considerado como 1 mL de sangue. Os pacientes foram considerados positivos para a presença de CTC se pelo menos um dos quatro spots de ISET® analisados contivesse uma CTC (pelo menos uma CTC em 4mL de sangue ou 0,25 CTC em 1mL de sangue). É importante salientar que mesmo com a presença de muitas CTCs, alguns spots do ISET® podem não conter CTCs, e nestes casos não é possível avaliar a expressão protéica. Em relação à análise de expressão de RE, RP, HER-2 e TGF- β RI nas CTCs por imunocitoquímica, consideramos CTC positiva se essa expressasse esses marcadores, independentemente da intensidade, e negativo se a CTC não tivesse expressão. Após as reações imunocitoquímicas, as células foram coradas com hematoxilina e analisadas por microscopia óptica (Research System Microscope BX61; Olympus).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características basais dos pacientes foram expressas como frequências absolutas e relativas para variáveis qualitativas e como valores medianos, mínimos e máximos para variáveis quantitativas. As associações entre variáveis qualitativas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher, conforme apropriado. As associações entre variáveis contínuas e qualitativas foram avaliadas pelo teste U de Mann-Whitney. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia também foram calculados. O coeficiente Kappa foi usado para caracterizar o grau de concordância da expressão proteica entre os tumores primários, metástases e CTCs.

As curvas de sobrevivência foram estimadas pelo estimador Kaplan-Meier, e a diferença entre as curvas foi avaliada pelo teste de log-rank. Em relação à idade ao diagnóstico, a determinação de dois grupos de observações em relação a um ponto de corte simples foi estimada utilizando o máximo do log-rank padronizado, conforme proposto por Lausen e Schumacher. A sobrevida livre de progressão foi medida a partir da linha de base (primeira coleta de CTC) até a progressão da doença, determinada por exames de imagem. Os pacientes que não vivenciaram um evento foram censurados na última visita ao hospital. O nível de significância bilateral foi fixado em 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas usando o IBM SPSS Statistics versão 24.0 (IBM Corporation, Armonk, NY) and R software version 3.4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

4. LINK DO ARTIGO PUBLICADO

Para os resultados, acesse o [link](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34644733/): **https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34644733/**

5 CONCLUSÕES

- Houve alta taxa de detecção de CTCs por ISET® nesta amostra de pacientes com câncer de mama metastático.
- A taxa de concordância entre expressão de RE, RP e HER2 entre o tumor primário e metástases foi alta.
- A concordância entre a expressão proteica nas CTCs, detectadas por ISET®, e nas metástases e tumor primário não foi significativa.
- Classificando-se os tumores em triplo negativos e não triplo negativos, observou-se alta especificidade e acurácia das CTCs detectadas por ISET® na definição do subtipo da metástase, sugerindo que esta metodologia possa ser útil na avaliação de metástases em tumores triplo negativos.
- Houve uma paradoxal correlação inversa entre o número de CTCs detectadas por ISET® e a sobrevida global, que poderia estar relacionada à menor captação de células em transição epitélio mesênquima e/ou EpCAM positivas por este método.
- A expressão de TGF- β RI pode ser identificada nas CTCs e correlacionou-se com uma tendência a pior prognóstico, sem significância estatística.

6 REFERÊNCIAS

Agelaki S, Kalykaki A, Markomanolaki H, Papadaki MA, Kallergi G, Hatzidaki D, et al. Efficacy of Lapatinib in Therapy-Resistant HER2-Positive Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLoS One*. 2015 Jun 17;10(6):e0123683.

Aktas B, Kasimir-Bauer S, Müller V, Janni W, Fehm T, Wallwiener D, et al. Comparison of the HER2, estrogen and progesterone receptor expression profile of primary tumor, metastases and circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2016 Jul 25;16:522.

Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, 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 Oct 15;10(20):6897-904.

Almendro V, Kim HJ, Cheng YK, Gönen M, Itzkovitz S, Argani P, et al. Genetic and phenotypic diversity in breast tumor metastases. *Cancer Res*. 2014 Mar 1;74(5):1338-48.

Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, et al. Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Feb 20;30(6):587-92. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2016 Apr 1;34(10):1156.

André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for *PIK3CA*-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2019 May 16;380(20):1929-40.

Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. 2006 Jul;59(7):729-35.

Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jan 12;366(2):109-19.

Bidard FC, Jacot W, Kiavue N, Dureau S, Kadi A, Brain E, et al. Efficacy of circulating tumor cell count-driven vs clinician-driven first-line therapy choice in hormone receptor-positive, erbb2-negative metastatic breast cancer: The STIC CTC Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2021 Jan 1;7(1):34-41.

Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet.* 1997 Oct 11;350(9084):1047-59. Erratum in: *Lancet* 1997 Nov 15;350(9089):1484.

Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors.* New York: Wiley; 2017. Breast tumor; p. 151.

Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Ann Oncol.* 2020 Dec;31(12):1623-49.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006 Jun 7;295(21):2492-502.

Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1368-76.

Chia S. Testing for discordance at metastatic relapse: does it matter? *J Clin Oncol.* 2012 Feb 20;30(6):575-6.

Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im SA, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet.* 2020 Dec 5;396(10265):1817-28.

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

Curtit E, Nerich V, Mansi L, Chaigneau L, Cals L, Villanueva C, et al. Discordances in estrogen receptor status, progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis. *Oncologist*. 2013 Jun;18(6):667-74.]

De Giorgi U, Valero V, Rohren E, Mego M, Doyle GV, Miller MC, et al. Circulating tumor cells and bone metastases as detected by FDG-PET/CT in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2010 Jan;21(1):33-9.

De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes*. 2013;2013:291546.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34.

De Vita V Jr, Hellman S, Rosenberg S. *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (Vol. 2). Wolters Kluwer/Lippincott Williams e Wilkins; 2011.

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 randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.

Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E, Beitsch P, Saboorian H, Euhus D, et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res*. 2002 Jul;8(7):2073-84.

Fehm T, Mueller V, Banys-Paluchowski M, Fasching PA, Friedl TWP, Hartkopf A, et al. Efficacy of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib in the treatment of patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells - results from the

randomized phase III DETECT III trial. *Cancer Res.* 2020 February 15;81(4 Supplement):APD3-12.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):966-78.

Friedl TWP, Krause S, Fehm T, Fasching PA, Schneeweiss A, Müller V et al. Comparison of dual HER2-targeted therapy with trastuzumab and pertuzumab plus CDK4/6 inhibition in combination with either chemo- or endocrine therapy in patients with HER2-positive and hormone-receptor positive metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2020 February 15; 80(4 Supplement):AOT2-01-03.

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

Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, et al. 5-year analysis of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in patients with locally advanced, inflammatory, or early-stage HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a multicentre, open-label, phase 2 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jun;17(6):791-800.

Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol.* 2009 Dec;20(12):1913-27.

Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer.* 1990 Nov 15;46(5):796-800.

Janni WJ, Rack B, Terstappen LW, Pierga JY, Taran FA, Fehm T, et al. Pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in primary breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 May 15;22(10):2583-93.

Lv Q, Gong L, Zhang T, Ye J, Chai L, Ni C, Mao Y. Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol*. 2016 Mar;18(3):322-30.

Markman M. Liquid-tumor biopsies' and the future of solid tumor oncology. *Oncology*. 2016;91(1):1-2.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624-8.

Mikulová V, Cabiňáková M, Janatková I, Mestek O, Zima T, Tesařová P. Detection of circulating tumor cells during follow-up of patients with early breast cancer: Clinical utility for monitoring of therapy efficacy. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014 Mar;74(2):132-42.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa /2020: incidência de câncer no Brasil. Retrieved 08 23, 2021. Rio de Janeiro: INCA; 2020. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. [2021 mar 14]

Modi S, Saura C, Yamashita T, Park YH, Kim SB, Tamura K, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2020 Feb 13;382(7):610-21.

Morrow M. Identification of the woman at risk for breast cancer: problem solved? *Rec Res Cancer Res*. 1999;151:85-95.

Murthy RK, Loi S, Okines A, Papolomata E, Hamilton E, Hurvitz SA, et al. Tucatinib, Trastuzumab, and capecitabine for her2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2020 Feb 13;382(7):597-609. Erratum in: *N Engl J Med*. 2020 Feb 6;382(6):586.

National Cancer Institute-NCI. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program-SEER. Cancer stat facts: female breast cancer. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>. [2021 agos 12]

National Comprehensive Cancer Network-NCCN. Breast cancer (Version 7.2021). Disponible em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf. [2021 agos 23].

Onstenk W, Sieuwerts AM, Mostert B, Lalmahomed Z, Bolt-de Vries JB, van Galen A, et al. Molecular characteristics of circulating tumor cells resemble the liver metastasis more closely than the primary tumor in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 Sep 13;7(37):59058-69.

Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 Years. *N Engl J Med*. 2017 Nov 9;377(19):1836-46.

Paoletti C, Muñiz MC, Thomas DG, Griffith KA, Kidwell KM, Tokudome N, et al. Development of circulating tumor cell-endocrine therapy index in patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 Jun 1;21(11):2487-98.

Park S, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012 Feb;21(1):50-7.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 May;138(5):1714-26.

Robson ME, Tung N, Conte P, Im SA, Senkus E, Xu B, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's

choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2019 Apr 1;30(4):558-66.

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

Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):737-49.

Schettini F, Giudici F, Giuliano M, Cristofanilli M, Arpino G, Del Mastro L, et al. Overall survival of CDK4/6-inhibitor-based treatments in clinically relevant subgroups of metastatic breast cancer: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2020 Nov 1;112(11):1089-97.

Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2018 Nov 29;379(22):2108-21.

Shachar SS, Mashiach T, Fried G, Drumea K, Shafran N, Muss HB, et al. Biopsy of breast cancer metastases: patient characteristics and survival. *BMC Cancer.* 2017 Jan 4;17(1):7.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020 Jan;70(1):7-30.

Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol.* 2014 Nov 1;32(31):3483-9.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869-74.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8.

Sparano J, O'Neill A, Alpaugh K, Wolff AC, Northfelt DW, Dang CT, et al. Association of Circulating Tumor Cells With Late Recurrence of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018 Dec 1;4(12):1700-1706.

Tolaney SM, Barry WT, Dang CT, Yardley DA, Moy B, Marcom PK, et al. Adjuvant paclitaxel and trastuzumab for node-negative, HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2015 Jan 8;372(2):134-41. Erratum in: *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1989.

Toonkel LM, Fix I, Jacobson LH, Bamberg N, Wallach CB. Locally advanced breast carcinoma: results with combined regional therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1986 Sep;12(9):1583-7.

Trapp E, Janni W, Schindlbeck C, Jückstock J, Andergassen U, de Gregorio A, et al. Presence of circulating tumor cells in high-risk early breast cancer during follow-up and prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2019 Apr 1;111(4):380-387.

Tutt ANJ, Garber JE, Kaufman B, Viale G, Fumagalli D, Rastogi P, et al. Adjuvant olaparib for patients with *BRCA1*- or *BRCA2*-mutated breast cancer. *N Engl J Med*. 2021 Jun 24;384(25):2394-405.

van Ramshorst MS, van der Voort A, van Werkhoven ED, Mandjes IA, Kemper I, Dezentjé VO, et al. Neoadjuvant chemotherapy with or without anthracyclines in the presence of dual HER2 blockade for HER2-positive breast cancer (TRAIN-2): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Dec;19(12):1630-1640.

Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Nov 8;367(19):1783-91. Erratum in: *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2442.

von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M, et al. Trastuzumab emtansine for residual invasive HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2019 Feb 14;380(7):617-628.

Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 15;21(18):3469-78.

Yang YF, Liao YY, Yang M, Peng NF, Xie SR, Xie YF. Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2014 Oct;31(10):214.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **18/04/2017**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2345/17** intitulado: **“Comparação entre expressão de receptores hormonais e de HER-2 entre células tumorais circulantes e metástases de câncer de mama.”**

Pesquisadora responsável: Ludmilla Thomé D Chinen.

Aluna: Solange Moraes Sanches (Doutorado).

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 03 de maio de 2017.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano

2ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa



A.C. Camargo
Cancer Center

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: COMPARAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS E DE HER- 2 ENTRE CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES E METÁSTASES DE CÂNCER DE MAMA

Investigador Responsável: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen

Nome do (a) Voluntário (a): _____

RGH: _____

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

OBJETIVOS DO ESTUDO

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

- a expressão proteica de receptores hormonais e HER2 com a mesma expressão protéica nas metástases do tumor.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao concordar em participar deste estudo, você será submetido a uma única coleta de sangue (aproximadamente 8 mL) antes do procedimento de biópsia.

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

RISCOS

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

Os riscos a que você estará sujeito são os riscos inerentes a qualquer punção venosa como: dor local no ato da punção, sangramento no local, hematoma e raramente flebite (infecção na veia puncionada), mas cuidados serão tomados para reduzir o risco, entre eles a 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, nada precisa ser feito, devendo-se 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 ainda está sendo estudada, não havendo nenhum prejuízo para o sucesso das condutas médicas outras às quais você esteja se submetendo.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios de qualquer espécie para os voluntários, apenas a importância de contribuir para uma pesquisa científica cujos dados obtidos poderão trazer benefícios para pessoas com câncer. A recusa em participar, não acarretará prejuízo na qualidade do tratamento. O pesquisador responsável se compromete a suspender a pesquisa imediatamente ao perceber qualquer risco ou dano a sua saúde, que não previsto neste termo de consentimento.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

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

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo, porém, por se tratar de nova tecnologia, os resultados não poderão indicar cura ou piora do seu quadro, pois ainda não temos valores de referência para

estabelecer uma comparação. Contato dos pesquisadores: Dra. Ludmilla T. Domingos Chinen (2189-5000, ramal 2779).

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. Contudo, seus direitos relativos a indenizações frente aos danos previstos ou não na pesquisa estão resguardados.

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

(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

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

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

Apêndice 2- Tabela Suplementar 1 – Características clinicopatológicas e caracterização molecular das CTCs das pacientes

Paciente	data do diagnóstico	data da 1a. recidiva	data da coleta de CTC	subtipo do tumor	subtipo da metástase	subtipo de CTC	local de biópsia	sítios de metástases	CTCs/mL	TGF- β RI na CTC	óbito	data último seguimento ou óbito
1	20/01/2018	11/04/2019	22/04/2019	TN	TN	TN	pulmão	pulmão	19	sim	não	10/06/2020
2	03/01/2013	15/10/2013	28/10/2013	TN	TN	TN	pulmão	fígado, pulmão	1,6	sim	sim	10/02/2014
3	16/04/2019	16/04/2019	24/05/2019	luminal	luminal	TN	fígado	fígado, osso	23	sim	não	28/02/2020
4	25/02/2015	02/06/2019	15/06/2019	luminal	luminal	luminal	fígado	fígado	7,3	sim	não	04/06/2020
5	23/09/2013	18/03/2016	25/05/2018	luminal	luminal	luminal	fígado	fígado, linfonodo ² , osso	10	sim	sim	11/05/2019
6	20/09/2016	15/01/2018	19/02/2018	TN	TN	luminal	pulmão	pulmão	5,3	sim	sim	15/11/2019
7	15/05/2017	15/06/2018	07/03/2018	luminal	luminal	luminal	fígado	fígado	7,5	sim	não	16/06/2020
8	29/09/2015	10/04/2018	10/04/2018	TN	TN	luminal	fígado	fígado	23	sim	sim	20/12/2018
9	15/09/2004	17/02/2014	28/03/2014	luminal	luminal	HER 2	fígado	fígado	6,2	não	-* ⁴	23/04/2014
10	27/03/2019	27/03/2019	04/05/2019	luminal	luminal	Indetet* ¹	fígado	Fígado, linfonodo ² , pulmão	2,7	sim	não	11/06/2020
11	15/12/2011	01/07/2013	07/10/2013	HER 2	HER2	luminal	pulmão	pulmão	2,9	não	-* ⁴	29/03/2017
12	05/08/2011	27/09/2013	21/10/2013	luminal	luminal	luminal	fígado	fígado, linfonodo ²	3,3	não	sim	18/10/2015
13	15/02/2017	15/03/2017	08/12/2017	luminal	luminal	luminal	fígado	fígado, osso	3,5	sim	sim	18/07/2019
14	15/07/2009	15/07/2012	14/03/2014	luminal	luminal	luminal	fígado	fígado, osso, pulmão	6,8	sim	-* ⁴	25/06/2015
15	16/07/2010	15/12/2012	16/07/2014	luminal	luminal	luminal	linfonodo	linfonodo ²	2,6	não	sim	01/06/2015
16	15/07/2014	20/10/2017	24/10/2017	HER 2	HER2	luminal	pulmão	pulmão	1,8	sim	sim	16/11/2019
17	15/01/2015	14/11/2017	01/02/2018	luminal HER2	luminal HER2	luminal	pulmão	pulmão	9,3	sim	sim	18/05/2020
18	15/08/2007	01/12/2017	01/12/2017	luminal	luminal	luminal	pulmão	pulmão	0,5	não	não	18/03/2020
19	24/11/2017	03/03/2018	03/03/2018	luminal HER2	HER2	luminal	fígado	fígado	1	não	não	25/05/2020
20	03/08/2013	15/08/2017	02/10/2017	luminal	luminal	luminal	pulmão	pulmão	3,5	sim	-* ⁴	18/10/2017
21	27/02/2012	31/01/2013	29/01/2015	TN	TN	Indetet* ¹	cérebro	cérebro	0	-* ³	sim	06/06/2015

22	13/10/2015	10/11/2017	10/11/2017	TN	TN	Indetet* ¹	pulmão	pulmão	0	-* ³	sim	11/03/2019
23	13/03/2010	20/04/2011	15/05/2014	luminal	luminal	Indetet* ¹	fígado	fígado, linfonodo* ²	0,4	não	sim	02/12/2017
24	10/07/2013	11/09/2014	11/09/2014	TN	TN	Indetet* ¹	pulmão	pulmão	5	-* ³	sim	14/10/2015
25	22/03/2016	22/04/2016	22/05/2018	luminal	luminal	Indetet* ¹	fígado	fígado, linfonodo* ² , osso, pulmão	0	-* ³	sim	16/05/2019
26	24/05/2018	24/05/2018	24/05/2018	TN	TN	Indetet* ¹	pulmão	pulmão	0	-* ³	sim	09/03/2019
27	25/07/2010	18/04/2019	25/04/2019	luminal	luminal HER2	Indetet* ¹	fígado	fígado, linfonodo* ²	0	-* ³	sim	21/01/2020

Características dos pacientes, com data do diagnóstico do câncer de mama (dia/mês/ano); data da 1ª recidiva do câncer de mama (dia/mês/ano); data da coleta de CTC, que corresponde também à data da biópsia da metástase (dia/mês/ano); subtipo do tumor; subtipo da metástase; subtipo da CTC; local da biópsia; sítios de metástases; número de CTCs/mL; expressão de TGF – RI nas CTCs; óbito e data de última informação do paciente CTC (célula tumoral circulante); TN (triplo negativo), indet (indeterminado)TGF-β RI (Transforming Growth Factor Beta Receptor I)

*¹ indeterminado : os spots de ISET podiam não conter CTCs, impossibilitando a imunocitoquímica e conseqüente definição dos subtipos de câncer de mama

*² linfonodos à distância do tumor de mama (não consideradas no estudo as metástases em linfonodos axilares e supraclaviculares homolaterais ao tumor)

*³ os spots de ISET podiam não conter CTCs, impossibilitando a imunocitoquímica para TGF-β RI ou casos sem identificação de CTCs

*⁴ perda de seguimento