

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS  
ENVOLVIDAS EM NEOANGIOGÊNESE EM TUMORES  
COLORRETAIS METASTÁTICOS ATRAVÉS DE TÉCNICA  
DE IMUNOFLUORESCÊNCIA MULTIPLEX**

**LEANDRO SPINELLI**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dr. Tiago Goss dos Santos**

**Co-orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de  
Lima**

**São Paulo**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Spinelli, Leandro

**Expressão de proteínas envolvidas em neoangiogênese em tumores colorretais metastáticos através de técnica de imunofluorescência multiplex /**  
Leandro Spinelli – São Paulo 2019.

81p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Tiago Goss dos Santos

Descritores: 1. Neoplasias Colorretais/Colorectal Neoplasms. 2. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 3. Imunofluorescência/Fluorescent Antibody Technique

## **AGRADECIMENTOS**

À minha esposa Angélica pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus pais Paulo e Sueli que sempre me incentivaram, deram força e me apoiaram em todas as etapas da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Tiago Goss dos Santos pela confiança depositada nestes anos todos e pelos ensinamentos passados e toda ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Daniel e Aline que sempre estiveram presente e contribuíram de forma admirável para este trabalho.

À Fundação Antônio Prudente por permitir a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Spinelli L. **Expressão de proteínas envolvidas em neoangiogênese em tumores colorretais metastáticos através de técnica de imunofluorescência multiplex.** São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** A adição do anticorpo monoclonal anti-VEGFA, bevacizumabe, a esquemas de quimioterapia contendo fluoropirimidinas está associada a aumento de taxa de resposta, de sobrevida livre de progressão e sobrevida global no tratamento de câncer colorretal metastático. O estudo da expressão das diversas proteínas associadas à angiogênese em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal metastáticos tratados com bevacizumabe pode permitir a identificação de biomarcadores preditores de eficácia para uso na prática clínica. As vias associadas ao VEGF e com as integrinas estão associadas com o controle do processo de neoangiogênese e podem representar marcadores preditores de resposta. Adicionalmente, a aplicação de uma técnica que permite a identificação de vários marcadores em uma única amostra de tecido pode representar um ganho na qualidade da interpretação das características do paciente.

**Objetivos:** Comparar a expressão do CD31, VEGFR2, PIGF, DLL4, NOTCH1, Ki67 e de integrina  $\alpha 2\beta 1$  através das técnicas de IHQ convencional e método multiplex em amostras do tumor colorretal (material patológico do tumor primário ou metastático) de pacientes metastáticos tratados com bevacizumabe e associação destes marcadores com controle da angiogênese e com as características clínicas e patológicas. **Métodos:** Foram selecionados 52 pacientes portadores de câncer colorretal metastático, pacientes que iniciaram bevacizumabe (que tenham recebido  $\geq 2$  ciclos) associado à quimioterapia para o tratamento de adenocarcinoma colorretal metastático (CID10 C18 e C20), entre maio/2006 e novembro/2009 a partir do banco de dados da Central de Quimioterapia do A.C.Camargo Cancer Center, e que possuíam dados clínicos completos e blocos de parafina no arquivo da Anatomia patológica para análise. Foram coletados dados clínicos e patológicos dos pacientes e avaliada a expressão dos marcadores supracitados em cortes histológicos por imuno-histoquímica convencional e técnica Multiplex IHC, que permite a coloração simultânea de múltiplos

biomarcadores em uma mesma lâmina de tecido. **Resultados:** A técnica de imunofluorescência multiplex foi estabelecida com sucesso no nosso laboratório. O padrão de marcação das proteínas previamente estabelecidas por imuno-histoquímica foi semelhante ao observado com a utilização da imunofluorescência. A marcação individual de integrina alfa1-beta2 esteve associada com sobrevida global em pacientes com tumores colorretais metastáticos tratados com quimioterapia e bevacizumabe. Porém, a predição de resposta ainda precisa ser melhor investigada.

**Descritores:** Neoplasias Colorretais. Imuno-Histoquímica. Imunofluorescência

## SUMMARY

Spinelli L. [**Expression of proteins involved in neoangiogenesis in metastatic colorectal tumors by multiplex immunofluorescence methodology**]. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Background:** The addition of the anti-VEGFA monoclonal antibody bevacizumab to fluoropyrimidine containing chemotherapy regimens is associated with increased response rate, progression free survival and overall survival in the treatment of metastatic colorectal cancer. Studying the expression of the various angiogenesis associated proteins in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma treated with bevacizumab may allow the identification of predictive biomarkers of efficacy for use in clinical practice. VEGF and integrin associated pathways are associated with neoangiogenesis process control and may represent predictors of response. Additionally, the application of a technique that allows the identification of multiple markers in a single tissue sample may represent a gain in the quality of interpretation of patient characteristics. **Objectives:** To compare the expression of CD31, VEGFR2, PIGF, DLL4, NOTCH1, Ki67 and  $\alpha 2\beta 1$  integrin by conventional IHC and multiplex method in colorectal tumor samples (pathological primary or metastatic tumor material) of metastatic patients treated with bevacizumab and association of these markers with angiogenesis control and clinical and pathological characteristics. **Methods:** We selected 52 patients with metastatic colorectal cancer, patients who started bevacizumab (who received  $\geq 2$  cycles) associated with chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal adenocarcinoma (ICD10 C18 and C20), between May/2006 and November/2009 to from the A.C.Camargo Cancer Center Chemotherapy Center database, which had complete clinical data and paraffin blocks in the Pathological Anatomy file for analysis. Clinical and pathological data were collected from patients and the expression of the aforementioned markers in histological sections was evaluated by conventional immunohistochemistry and Multiplex IHC technique, which allows simultaneous staining of multiple biomarkers on a single tissue slide. **Results:** The multiplex immunofluorescence technique was

successfully established in our laboratory. The pattern of protein labeling previously established by immunohistochemistry was similar to that observed with the use of immunofluorescence. Individual alpha1-beta2 integrin labeling was associated with overall survival in patients with metastatic colorectal tumors treated with chemotherapy and bevacizumab. However, response prediction still needs further investigation.

**Key-words:** Colorectal Neoplasms. Immunohistochemistry. Fluorescent Antibody Technique

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	A figura mostra os alvos da ação do bevacizumabe (VEGFA), aflibercept (VEGFA, VEGFB e PlGF) e regorafenibe (tirosina quinase do VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3).....	4
<b>Figura 2</b>	A ilustração abrange os seis aspectos propostos por Douglas Hanahan em 2000 na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral.....	7
<b>Figura 3</b>	Infográfico comparativo entre a metodologia tradicional de marcação indireta (com o uso de anticorpo secundário marcado) e o TSA, com as moléculas marcadas de tiramida se depositando ao redor da proteína alvo e ampliando significativamente a sensibilidade do sinal.....	16
<b>Figura 4</b>	Esquema ilustrativo de alguns antígenos, na mesma amostra, apresentando diferentes fluoróforos, utilizando a tecnologia Multiplex IHC.....	17
<b>Figura 5</b>	Imuno-histoquímica convencional de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário).....	33
<b>Figura 6</b>	Comparação entre as duas formas de recuperação antigênica.....	34
<b>Figura 7</b>	Comparação entre a Imuno-histoquímica por fluorescência e Imuno-histoquímica convencional.....	36
<b>Figura 8</b>	Primeiras marcações multiplexadas demonstrando um intenso <i>background</i> .....	38
<b>Figura 9</b>	Marcações multiplexadas, com quatro lavagens em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%.....	40

<b>Figura 10</b>	Marcações multiplexadas, com fluoróforos diluídos 1:100.....	41
<b>Figura 11</b>	Marcações multiplexadas, com fluoróforos diluídos 1:1000.....	43
<b>Figura 12</b>	Comparativo entre as expressões de Notch1 em marcações por imuno-histoquímica convencional e as marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático.....	45
<b>Figura 13</b>	Marcações multiplex em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático, tumor primário.....	47
<b>Figura 14</b>	Marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma de colorretal metastático, tumor primário.....	48
<b>Figura 15</b>	Marcações multiplex em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário).....	49
<b>Figura 16</b>	Marcações multiplex em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário).....	50
<b>Figura 17</b>	Marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário).....	51
<b>Figura 18</b>	Marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário).....	52
<b>Figura 19</b>	Matriz de correlação entre os marcadores angiogênicos.....	54
<b>Figura 20</b>	Sobrevida global (SG) conforme o sexo.....	57
<b>Figura 21</b>	Sobrevida global (SG) conforme terapia adjuvante.....	57
<b>Figura 22</b>	Sobrevida global (SG) conforme estadiamento ao diagnóstico.....	58
<b>Figura 23</b>	Sobrevida global (SG) conforme metástase em fígado.....	59

<b>Figura 24</b>	Sobrevida global (SG) conforme metástase linfonodal .....	59
<b>Figura 25</b>	Sobrevida global (SG) conforme ressecção de metástase.....	60
<b>Figura 26</b>	Sobrevida global (SG) conforme hipertensão arterial.....	60
<b>Figura 27</b>	Sobrevida global (SG) conforme resposta objetiva .....	61
<b>Figura 28</b>	Sobrevida global (SG) conforme expressão de Integrina alfa2beta1.	61
<b>Figura 29</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) em meses.....	62
<b>Figura 30</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme as características histológicas .....	62
<b>Figura 31</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme metástase em fígado .....	63
<b>Figura 32</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme metástase linfonodal .....	63
<b>Figura 33</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme cirurgia do primário	64
<b>Figura 34</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme metástase ressecção de metástase .....	64
<b>Figura 35</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme quimioterapia combinada ao bevacizumabe .....	65
<b>Figura 36</b>	Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme o padrão de resposta .....	65

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Características e especificações dos anticorpos utilizados .....	26
<b>Quadro 2</b>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status</i> .....	28
<b>Quadro 3</b>	Critérios para resposta definidos pelo RECIST 1.1 .....	29
<b>Quadro 4</b>	Combinações de anticorpos nas lâminas de TMA.....	46
<b>Quadro 5</b>	Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos .....	53
<b>Tabela 1</b>	Mediana da intensidade de fluorescência dos marcadores em leitura digital realizada no software Image J .....	53
<b>Tabela 2</b>	Associação entre marcadores imuno-histoquímicos e Resposta Objetiva .....	55
<b>Tabela 3</b>	Associação das características clínicas e patológicas com os marcadores imuno-histoquímicos .....	56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>5FU</b>	5-fluorouracil
<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>bFGF</b>	Basic Fibroblast Growth Factor
<b>CCR</b>	Câncer colorretal
<b>CD31</b>	Cluster of Differentiation 31
<b>CID10</b>	Classificação internacional de doenças
<b>CID10 C18</b>	Neoplasia maligna do cólon
<b>CID10 C20</b>	Neoplasia maligna do reto
<b>DAB</b>	Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DE</b>	doença estável
<b>DLL1</b>	Delta-like 1
<b>DLL3</b>	Delta-like 3
<b>DLL4</b>	Delta-like 4
<b>ECOG</b>	Eastern Cooperative Oncology Group
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FOLFIRI</b>	irinotecano, fluorouracil em bolus e infusão contínua e leucovorin
<b>FOLFOX</b>	oxaliplatina, fluorouracil em bolus e infusão contínua e leucovorin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HAS</b>	hipertensão arterial sistêmica
<b>HIF</b>	hypoxia induced factor
<b>HRP</b>	Horsereadish Peroxidase
<b>ILK</b>	integrin-linked kinase
<b>IHC</b>	Immunohistochemistry
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>IROX</b>	irinotecano e oxaliplatina

<b>JAGGED 1 ou JAG1</b>	ligante do NOTCH
<b>JAGGED 2 ou JAG2</b>	ligante do NOTCH
<b>KRAS</b>	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
<b>Ki67</b>	antígeno marcador de proliferação celular
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NOTCH</b>	receptor transmembrana NOTCH
<b>NOTCH1</b>	receptor transmembrana NOTCH1
<b>NOTCH2</b>	receptor transmembrana NOTCH2
<b>NOTCH3</b>	receptor transmembrana NOTCH3
<b>NOTCH4</b>	receptor transmembrana NOTCH4
<b>NRP1</b>	neuropilina 1
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PECAM1</b>	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
<b>PD</b>	progressão de doença
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PIGF</b>	Placental growth factor
<b>RC</b>	resposta completa
<b>RP</b>	resposta parcial
<b>RTKs</b>	Receptores de tirosina-quinases
<b>SAME</b>	serviço de arquivo médico
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>SLP</b>	Sobrevida livre de progressão
<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>TAF</b>	Tumor-angiogenesis factor
<b>TBST</b>	Tris Buffered Saline with Tween
<b>TGF <math>\alpha</math></b>	Tumor growth factor alfa
<b>TMA</b>	Tissue microarray
<b>TNF</b>	Tumoral necrosis factor
<b>TNM</b>	tumor–node–metastasis
<b>TP53</b>	gene supressor de tumor TP53

<b>TR</b>	Taxa de resposta
<b>TRO</b>	taxa de resposta objetiva
<b>TSA</b>	Tiramyde Signal Amplification
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VEGFA</b>	Vascular Endothelial Growth Factor A
<b>VEGFB</b>	Vascular Endothelial Growth Factor B
<b>VEGFC</b>	Vascular Endothelial Growth Factor C
<b>VEGFD</b>	Vascular Endothelial Growth Factor D
<b>VEGFR1</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
<b>VEGFR2</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
<b>VEGFR3</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	O câncer colorretal.....	1
1.2	Diagnóstico e estadiamento.....	2
1.3	Tratamento do Câncer Colorretal.....	3
1.4	Tratamento do Câncer Colorretal com Ênfase na Angiogênese.....	4
1.5	Principais Aspectos Envolvidos na Progressão Tumoral.....	5
1.6	O Processo de Angiogênese.....	7
1.6.1	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	9
1.6.2	Fator de crescimento placentário (PlGF).....	10
1.6.3	Notch e delta.....	11
1.6.4	Integrinas.....	11
1.6.5	Mimetismo Vasculogênico.....	13
1.7	Imuno-histoquímica (IHC).....	14
1.7.1	Tecnologia TSATM: amplificação de sinal para ensaios imunológicos.....	15
1.7.2	Técnico Multiplex IHC: ensaios com múltiplos marcadores.....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
4.1	Tipos de Estudo.....	20
4.2	Casuística.....	20
4.2.1	Seleção dos Pacientes.....	20
4.2.2	Grupos de Pacientes.....	21
4.3	Materiais e Métodos.....	21
4.3.1	Reações de imuno-histoquímica (IHC).....	21
4.3.2	Protocolo da técnica multiplex IHC.....	21
4.4	Separação das lâminas de TMA.....	27
4.4.1	Dados clínicos coletados.....	27

4.4.2	Critérios de Resposta .....	29
4.4.3	Definição dos desfechos de sobrevida .....	29
4.4.4	Análise Das Marcações .....	30
4.5	Análise Estatística .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1	Padronização de Metodologia .....	32
5.1.2	Comparativo entre as análises de Imuno-histoquímica Convencional e por Fluorescência Multiplex .....	44
5.2	Análise multiplex dos TMAs no grupo caso .....	46
5.2.1	Sistemática das marcações multiplex .....	46
5.2.2	Análise das marcações multiplex .....	47
5.2.3	Resultados das análises Multiplex em TMA .....	48
5.2.4	Análise da Influência da Expressão de Marcadores Imuno-histoquímicos ....	52
5.2.5	Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos .....	53
5.2.6	Marcadores imuno-histoquímicos e Resposta Objetiva .....	54
5.2.7	Associação entre marcadores e características clínicas e patológicas dentre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha .....	55
5.2.8	Associação entre as características clínicas e a Sobrevida Global (SG) .....	56
5.2.9	Associação entre os marcadores e a Sobrevida Global (SG) .....	61
5.2.10	Associação entre as características clínicas e patológicas com a Sobrevida Livre de Progressão (SLP) .....	62
5.2.11	Associação entre os marcadores e a Sobrevida Livre de Progressão (SLP) ...	65
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>

## **ANEXO**

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

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal é uma neoplasia que acomete o intestino grosso (cólon) e/ou reto. Nos últimos anos, este tipo de câncer apresentou um elevado número de novos casos, principalmente na Europa, América do Norte e Austrália. No mundo o câncer colorretal aparece como a terceira neoplasia maligna mais frequente e a segunda maior causa de morte por câncer nos Estados Unidos (MARLEY e NAN 2016).

Segundo estimativas realizadas pelo Instituto Nacional de Câncer-INCA, foram previstos para o ano de 2018, no Brasil, 582.590 novos casos de câncer, onde deste total 17.380 de câncer de cólon e reto em homens e 18.980 em mulheres.

Ainda segundo o INCA, neste cenário onde o risco estimado foi de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres, sendo o terceiro mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres. Na Região Sudeste sem considerar os tumores de pele não melanoma o câncer de cólon e reto é o segundo mais frequente e o terceiro nas Regiões Sul e Centro-Oeste. Nas outras Regiões do país, Nordeste e Norte ocupa a quarta posição. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas Regiões Sudeste e Sul. Nas Regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte é o terceiro mais frequente (Ministério da Saúde 2018).

Os principais fatores de risco para o câncer colorretal estão associados ao estilo de vida uma vez que incluem o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, carne vermelha, ingestão de gordura animal, tabagismo e falta de exercícios. Em países

ocidentais industrializados como Estados Unidos, Canadá, Grã-Bretanha países escandinavos, Dinamarca Austrália e Nova Zelândia, onde o consumo de carnes, gorduras e carboidratos é significativo observa-se uma frequência elevada (MARLEY e NAN 2016; KWON 2017). Já em países como Japão, onde havia uma baixa frequência, a adoção de uma dieta semelhante à de outras nações industrializadas levou ao aumento dos casos da doença. Famílias japonesas e chinesas que migraram para os Estados Unidos e que adotaram uma dieta ocidental, tiveram aumento da incidência do carcinoma colorretal nos descendentes dessas famílias em quatro vezes (SUNG et al. 2005).

## **1.2 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO**

A identificação precisa do local da lesão colorretal e a possibilidade de realização de um exame completo, faz com que a retossigmoidoscopia (rígida ou flexível) seja sempre indicada na suspeita de câncer retal (U.S. Preventive Services Task Force 1996).

Com a vantagem de melhor poder identificar pequenas lesões e de fornecer um achado histopatológico, a colonoscopia é o exame preferencial para o diagnóstico do câncer colorretal.

O estadiamento na enfermidade neoplásica tem como objetivo identificar não somente a extensão loco-regional da lesão primária, mas também a sua extensão a distância, onde o sistema de estadiamento utilizado para o câncer colorretal é o sistema tumor–node–metastasis (TNM) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) onde são utilizados três critérios para avaliar o estágio do câncer: o próprio tumor, os

linfonodos regionais ao redor do tumor, e se o tumor se espalhou para outras partes do corpo.

A mensuração do antígeno carcino-embriônico (CEA) pode auxiliar de forma prognóstica, porém a investigação de eventuais metástases intra-abdominais e pélvicas deve ser feita por meio de exame ultra-sonográfico e/ou por tomografia computadorizada, à critério clínico (LIEBERMAN et al. 2000).

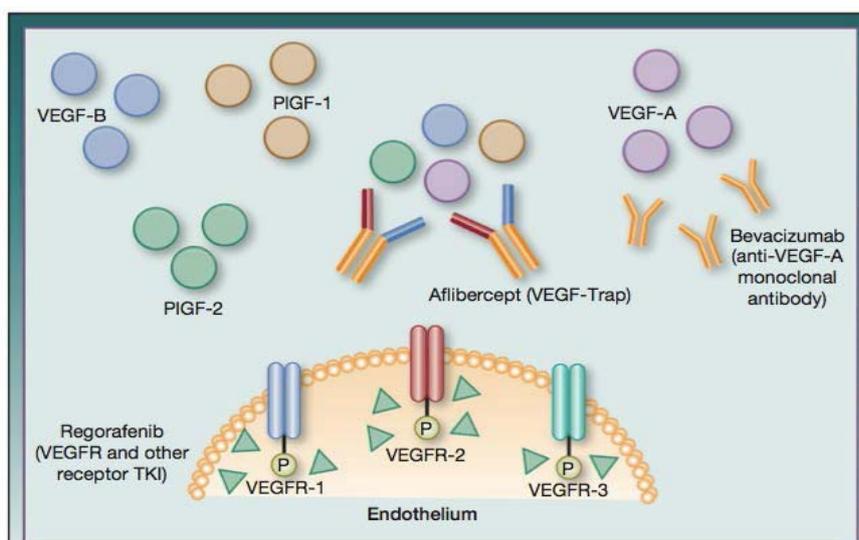
### **1.3 TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL**

O tratamento do paciente com CCR metastático tem evoluído consideravelmente nos últimos anos. Na era pré-quimioterapia efetiva, a sobrevida global (SG) de pacientes com CCR metastático era de 6 meses. Com o advento e exposição desses pacientes a fluoropirimidinas, oxaliplatina e irinotecano em combinação ou sequencial, além de agentes que atuam na angiogênese, como bevacizumabe, aflibercept ou regorafenibe, e agentes anti-EGFR, como panitumumabe e cetuximabe, a SG desses pacientes aumentou para uma mediana de 24 a 30 meses. A ressecção cirúrgica de metástases tem contribuído também para esse aumento de SG, sendo que cerca de 40-50% dos pacientes com metástases ressecadas encontram-se vivos em 5 anos (MEYERHARDT e MAYER 2005).

## 1.4 TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL COM ÊNFASE NA ANGIOGÊNESE

Existem várias drogas com atividade antiangiogênicas que foram desenvolvidas para o tratamento do câncer colorretal metastático, incluindo anticorpos monoclonais anti-VEGF, anticorpos anti-VEGFR2 e inibidores de tirosina-quinases.

Em 1997 foi desenvolvido o bevacizumabe, primeiro anticorpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra o VEGF, criado pela união da região de ligação ao VEGF de um anticorpo murino com uma porção da cadeia pesada da imunoglobulina IgG1 humanizada (93% humano e 7% murino). Dessa forma, ele se liga e neutraliza o VEGF, reduzindo a concentração de VEGF circulante, contrabalançando o efeito pró-angiogênico do mesmo, reduzindo a ligação do mesmo ao VEGFR2 e reduzindo a ativação das vias intracelulares envolvida na formação de novos vasos (REINACHER-SCHICK et al. 2008).



Fonte: CIOMBOR et al. (2013).

**Figura 1** - A figura mostra os alvos da ação do bevacizumabe (VEGFA), aflibercept (VEGFA, VEGFB e PIGF) e regorafenibe (tirosina-quinase do VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3).

Estudos randomizados avaliaram o papel da adição do bevacizumabe a regimes quimioterápicos comumente usados no tratamento em primeira linha do câncer colorretal metastático. Os resultados desses estudos demonstraram que a adição do bevacizumabe pode promover aumento da taxa de resposta, do tempo até a progressão e/ou da sobrevida global. Em segunda linha de tratamento, GIANTONIO et al. em 2007, avaliaram a adição de bevacizumabe com esquema de quimioterapia contendo oxaliplatina (FOLFOX4), em pacientes previamente tratados em primeira linha com esquemas contendo irinotecano em um estudo conhecido com E320011. Os autores evidenciaram que a adição de bevacizumabe ao esquema quimioterápico FOLFOX4 alcançou uma duração mediana de sobrevida global de 12,9 meses, quando comparado com o esquema FOLFOX4 isolado, que atingiu 10,8 meses (HR: 0,75; P=0,0011) (KABBINAVAR et al. 2005; HOCHSTER et al. 2008; SALTZ et al. 2008).

## **1.5 PRINCIPAIS ASPECTOS ENVOLVIDOS NA PROGRESSÃO TUMORAL**

O potencial proliferativo invasivo, exercida pela célula tumoral pode ser explicada por seis características que irão influenciar na fisiologia normal das células e dos tecidos: 1) auto-suficiência quanto a fatores de crescimento; 2) insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação; 3) evasão do apoptose; 4) potencial replicativo infinito; 5) capacidade de promover angiogênese; Invasão tecidual e metástase.

Células cancerosas podem adquirir a capacidade de sustentar a sinalização proliferativa de variadas formas: elas podem produzir fatores de crescimento que irão estimular uma proliferação autócrina. Além disso, as células cancerosas podem enviar

sinais e estimular as células normais a fornecer fatores de crescimento essenciais ao desenvolvimento e proliferação do câncer (HANAHAN e WEINBERG 2011).

Tecidos normais apresentam um equilíbrio na produção e liberação de sinais que irão promover o crescimento e os ciclos de divisão celular, garantindo a manutenção da homeostase normal e a função dos tecidos.

Por outro lado, as células cancerosas mostram um desequilíbrio nestes sinais, promovendo uma desregulação nos ciclos, nas divisões, no metabolismo e na sobrevivência celular o que leva muitas vezes ao desenvolvimento das células tumorais.

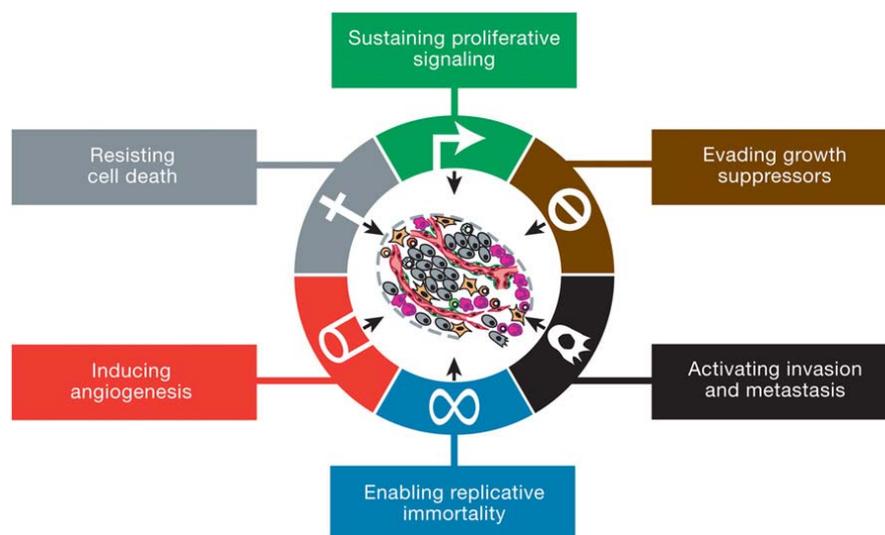
Por muito tempo acreditou-se no conceito de que a morte celular programada pela apoptose era uma barreira natural ao desenvolvimento do câncer, mas estudos recentes demonstraram que as células tumorais possuem a capacidade de desenvolver uma variedade de estratégias para limitar ou contornar a apoptose.

Uma das estratégias comumente observada é a perda de função do supressor de tumor TP53, que elimina os sensores envolvidos na indução da apoptose. Outra alternativa é o aumento da expressão de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) ou de sinais de sobrevivência (Igf1/2), por desregulação (HANAHAN e WEINBERG 2011).

As multiplicidades de mecanismos de prevenção da apoptose provavelmente refletem a diversidade de sinais indutores de apoptose nas populações de células cancerígenas durante a sua evolução para o estado maligno.

As células cancerosas possuem um potencial replicativo ilimitado e esta capacidade contrasta com o comportamento das células na maioria das linhagens celulares normais do corpo, que são capazes de passar apenas por um limitado número

de sucessivos ciclos de divisões celulares. Esta limitação tem sido associada com duas barreiras distintas à proliferação: a senescência, em um estado não-proliferativo, mas viável, e desequilíbrios, que envolvem a morte celular (HANAHAN e WEINBERG 2011).



Fonte: HANAHAN e WEINBERG (2011).

**Figura 2** - A ilustração abrange os seis aspectos propostos por Douglas Hanahan em 2000 na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral.

## 1.6 O PROCESSO DE ANGIOGÊNESE

Sabe-se hoje que um dos mecanismos fundamentais para desenvolvimento do câncer é a formação de novos vasos como sugerido por FOLKMAN em 1971. FOLKMAN (1971) demonstrou o que ficou conhecido como TAF, fator de angiogênese tumoral e este seria um potencial alvo terapêutico, pois a sua inibição poderia evitar o desenvolvimento tumoral e, a partir deste momento, o estudo da expressão dos fatores envolvidos na angiogênese tumoral vem sendo estudados de

forma crescente e significativa. Mais recentemente, esses dados veem sendo corroborados por outros autores.

Em 1989, FERRARA et al. (2003), relataram o isolamento, clonagem e sequenciamento do DNA de uma proteína com capacidade mitógena que posteriormente seria chamado de *Vascular Endothelial Growth Factor*-VEGF (LEUNG et al. 1989). Em 1992, o grupo identificou o primeiro receptor para o VEGF, o *Vascular Endothelial Growth Factor receptor 1*-VEGFR1.

Desde então, várias moléculas pró-angiogênicas já foram identificadas, entre elas, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fatores de crescimento ligados à heparina, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fatores de necrose tumoral (TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ) e fator de transformação de crescimento (TGF $\alpha$ ) (KERBEL 2008). Além destes, em muitos tumores outros fatores de crescimento são produzidos e estimulam a angiogênese; outros tumores induzem, de alguma forma, as células adjacentes normais a sintetizar e secretar esses fatores. O fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF), o fator transformador de crescimento alfa (TGF  $\alpha$ ) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os quais são secretados por vários tumores, têm propriedades angiogênicas. Os novos vasos sanguíneos nutrem o tumor em crescimento, permitindo seu aumento de tamanho e, também, o aumento da ocorrência de mutações mais prejudiciais. A presença de um vaso sanguíneo adjacente também facilita o processo de metástase (LODISH et al. 2014).

### 1.6.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

Fisiologicamente em resposta ao tecido lesado, como por exemplo no processo de cicatrização o VEGF atua através de sua ligação a receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intracelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial. A expressão do VEGF é regulada de acordo com a taxa de oxigenação do tecido. Situações como esta aumentam a demanda de oxigênio e, conseqüentemente, a expressão do fator induzível por hipóxia (*Hypoxia Inducible Factor* - HIF), o que aumenta a expressão do VEGF e estabiliza o seu RNA mensageiro (mRNA). Após a cicatrização do tecido ocorre um excesso de aporte de oxigênio e conseqüentemente a expressão do VEGF é inibida, o seu respectivo mRNA se instabiliza pela expressão de HIF (SEMENZA 2002).

O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas da qual fazem parte o fator de crescimento placentário (PlGF), VEGFA, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E VEGFF. As funções biológicas do VEGF são mediadas pela sua ligação aos seus receptores tirosina-quinase: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. A neuropilina 1 (NRP1) é um co-receptor transmembrana, reforçando a atividade do VEGFR2.

Essa glicoproteína é expressa em diversas isoformas a partir de *splicing* alternativo VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 e VEGF206. Entre essas, as principais são VEGF121 e VEGF165 (KERBEL 2008).

A ativação do VEGF desencadeia diversas vias de sinalização intracelular que resultam em proliferação, sobrevivência, mitogênese, migração e diferenciação das células endoteliais, assim como sua atuação no aumento da permeabilidade vascular (HICKLIN et al. 2005).

### **1.6.2 Fator de crescimento placentário (PlGF)**

O PlGF é uma glicoproteína dimérica, pertencente a família do VEGF que se liga ao VEGFR1, sendo dispensável ao desenvolvimento vascular normal, mas com importante relevância na angiogênese patológica.

O PlGF humano apresenta três isoformas, que diferem no tamanho e propriedades de ligação: (i) PlGF-1 (PlGF131), (ii) PlGF-2 (PlGF152) e (iii) PlGF-3 (PlGF203).

Foi demonstrado que o PlGF apresenta níveis elevados em diversos tumores, como gástrico, cólon, pulmão, mama, rim, fígado e cérebro, tendo influência no prognóstico destes tumores (FISCHER et al. 2008). Em contrapartida, YAO et al. (2011), em modelos de linhagem celular tumoral, demonstraram que a eficácia do anticorpo anti-PlGF ocorre apenas nas células tumorais com hiperexpressão de VEGFR1, provavelmente inibindo as vias MAPK e PI3K, acrescentado-se o fato de que não houve ação do anti-PlGF nas células endoteliais, não ocorrendo redução da angiogênese. Assim, especula-se que expressão/atividade de VEGFR1 possa ser um potencial biomarcador para terapia anti-PlGF (WEI et al. 2005) demonstraram que PlGF foi expresso com maior frequência nas células tumorais do que nos tecidos normais, e que a expressão foi maior nos estádios mais avançados.

SUNG et al. (2012), através de imuno-histoquímica, concluíram também que a expressão elevada de PlGF nas células tumorais está associada a estádios mais avançados (em nenhum paciente com EC I, em 11% nos com EC II, em 82% nos com EC III e em 100% nos com EC IV) e pior sobrevida em pacientes com câncer colorretal.

### **1.6.3 Notch e delta**

Outra via de sinalização importante durante o processo de angiogenese é a via dos receptores transmembrana NOTCH, estes receptores têm sido implicados na patogênese do câncer. A família NOTCH consiste de 4 receptores (chamados NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 e NOTCH4) e 5 ligantes (JAGGED 1 ou JAG1, JAG2, delta-like 1 ou DLL1, DLL3 e DLL4), que são proteínas transmembrana (RANGANATHAN et al. 2011).

Em 2015, PAIVA et al., avaliaram a expressão de proteínas envolvidas com angiogênese em amostras de tumores colorectais de pacientes que receberam bevacizumab em conjunto com chemother-APY. Os níveis de expressão elevados de VEGFR1 e VEGFR3 foram associados a uma taxa mais elevada de metástases do pulmão. A expressão VEGFR3 também foi associada com metástase hepática. A expressão de NOTCH1 foi associada com um aumento do risco de metástases em linfonodos e uma pior sobrevivência global.

O NOTCH1, através da interação com seus ligantes e VEGFR2, determina o número de ramificações de novos vasos, sendo fundamental para a formação de vasos funcionantes. O NOTCH é importante para manter o equilíbrio da proliferação celular, diferenciação e apoptose, sendo que a perda desse equilíbrio pode resultar em iniciação, progressão e metástase do câncer colorretal (SUMAN et al. 2014).

### **1.6.4 Integrinas**

As integrinas fazem parte das famílias das moléculas de adesão celular. Existem uma variedade de integrinas, sendo descritas pelo menos 24 na espécie

humana. As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas que se ligam ao citoesqueleto e podem mediar adesão celular, migração, proliferação e angiogênese.

Uma molécula de integrina é composta de duas subunidades de glicoproteínas transmembrana associadas, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$ . As duas subunidades atravessam a membrana celular, com uma pequena cauda C-terminal intracelular e um grande domínio extracelular N-terminal. A porção extracelular liga-se diretamente a uma proteína extracelular, como a fibronectina ou a laminina. A cauda intracelular da integrina liga-se à talina, e essa, por sua vez, liga-se aos filamentos de actina.

No seu estado inativo, a porção extracelular fica dobrada e, na porção intracelular, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ficam em contato. Quando o domínio extracelular se desdobra, o contato das duas unidades é quebrado, tanto na porção extracelular como intracelular. Como resultado, o sítio de ligação da talina na cauda da cadeia  $\beta$  fica exposto e ligase à talina e essa aos filamentos de actina, de forma que, quando um ligante da integrina (por exemplo: fibronectina, laminina, contra-receptores da superfamília das Igs - ICAM ou fibrinogênio) liga-se à sua porção externa, a célula reage ligando o seu citoesqueleto à molécula de integrina através da porção interna da molécula, isso é chamado ativação de fora para dentro.

Uma ativação inversa, de dentro para fora, também pode ocorrer: moléculas reguladoras intracelulares, como fosfoinosítídeo PIP<sub>2</sub>, produzidas em resposta a sinais recebidos de fora da célula através de outros receptores da membrana como receptores tirosina-quinases, podem ativar a talina.

A talina compete com a cadeia  $\alpha$  de integrina pelo sítio de ligação na cauda da cadeia  $\beta$ , de modo que quando a talina liga-se a cadeia  $\beta$ , ela desfaz a ligação  $\alpha$ - $\beta$  intracelular, separando as duas pernas da integrina na porção intracelular e,

consequentemente, a porção externa sai da posição dobrada para a forma ativa estendida (ALBERTS et al. 2010).

As integrinas possuem papel fundamental na angiogênese através não somente de ligação celular, mas também por ativar vias de sinalização intracelular, como por exemplo, RAS-MAPK e FAK (*focal adhesion kinase*) permitindo influenciar o comportamento celular de acordo com a natureza da matriz circundante e o estado da ligação da célula com essa matriz (FU et al. 2012).

Após a ativação, devido à interação com seus respectivos ligantes, as integrinas podem regular atividades celulares por meio de interações cruzadas com receptores de fatores de crescimento, incluindo receptores de VEGF, utilizando proteínas sinalizadoras comuns às duas vias e ativar vias intracelulares, ILK, FAK e PI3K, que também irão influenciar na angiogênese (VLAHAKIS et al. 2005 e 2007; NILAND e EBLE 2012).

#### **1.6.5 Mimetismo Vasculogênico**

Além da utilização de vasos sanguíneos regulares para a circulação, alguns tumores parecem utilizar um meio de circulação independente da angiogênese. Em 1999, MANIOTIS et al. relataram a formação de canais microvasculares por células de melanoma sem a participação de células endoteliais e independente da angiogênese foi denominado de mimetismo vasculogênico.

Em melanoma e outros tumores, o mimetismo vasculogênico mostrou-se associado com expressão de marcadores endoteliais como Tie-1, EphA2, LamC2 e moléculas anticoagulantes como os inibidores da via do fator tecidual.

Em trabalho realizado em 2009 por BAETEN et al. das 117 amostras de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretal 23 apresentaram sinais de mimetismo vasculogênico, demonstrado pela presença de células Ki-67 positivas em numerosas células tumorais em proliferação e alta expressão de EphAe e LamC2.

Outro dado importante foi a relação do mimetismo com a evolução da doença, onde dos 2 pacientes que apresentavam Duke A, não foi observado mimetismo. Já em estágios mais avançados foram observados a presença de mimetismo vasculogênico em 5 dos 72 pacientes (6,9%) com Dukes B, em 9 dos 32 pacientes (28,1%) com Dukes C e em 9 dos 11 pacientes (81,8%) com Dukes D.

## **1.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)**

De um modo geral, os métodos convencionais de imuno-histoquímica são utilizados amplamente nas mais diversas áreas da ciência, sendo de extrema importância no campo da patologia diagnóstica, pois exerce papel fundamental para a caracterização de neoplasias.

Na área da pesquisa do câncer, a imuno-histoquímica possibilita a obtenção de uma variedade de informações que atuam como fatores prognósticos de doença, avaliação da efetividade de novos tratamentos e a verificação da toxicidade de drogas terapêuticas em processo de desenvolvimento, sendo de fundamental importância no auxílio a pesquisa médica, por conta da irrestrita busca por metodologias de tratamentos personalizados (WERNER et al. 2005).

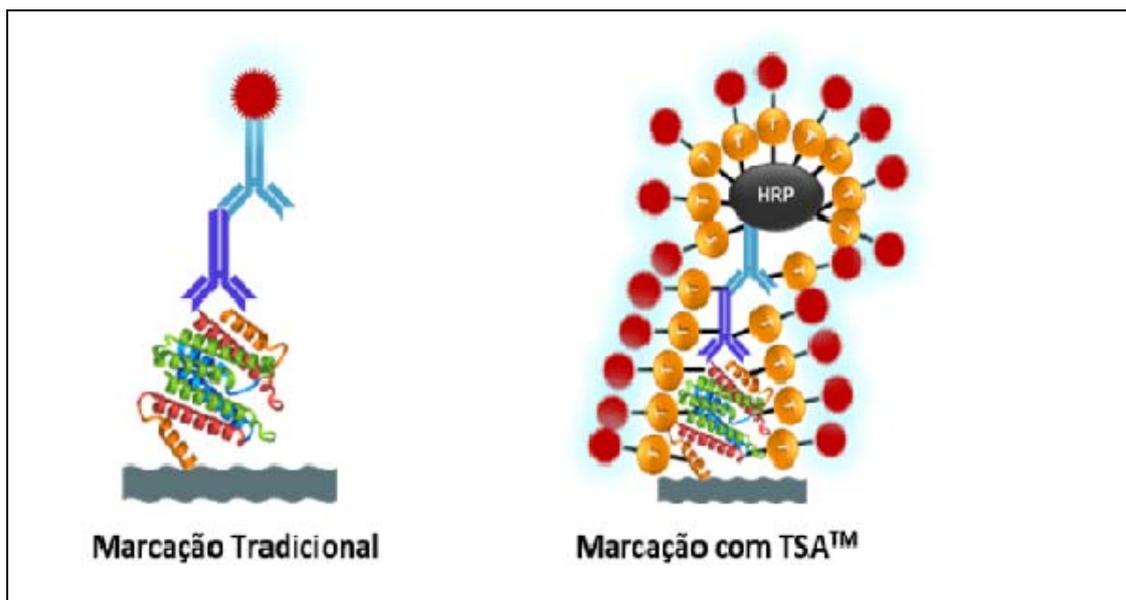
Pode-se observar através a aplicação da técnica de IHQ algumas vantagens como a alta especificidade das reações, a localização dos antígenos pesquisados, a

caracterização do contexto morfológico e da distribuição espacial dos antígenos, a avaliação semi-quantitativa do nível de expressão dos marcadores e, principalmente, apresentar *in vitro* as respostas biológicas *in vivo* (MORENO 2016).

### **1.7.1 Tecnologia TSATM: amplificação de sinal para ensaios imunológicos**

A tecnologia de Amplificação de Sinal por Tiramida (TSA: *Tiramyde Signal Amplification*) basea-se na técnica de Deposição Catalisada de Reporters (CARD: *Catalyzed Reporter Deposition*), em imunoenaios de fase sólida. Na presença de pequenas quantidades do peróxido de hidrogênio, o HRP (*Horsereadish Peroxidase*) converte o reagente TSA marcado em uma molécula intermediária extremamente reativa. A molécula de TSA reativa reage rapidamente e se liga de forma covalente, em regiões adjacentes das proteínas-alvo, a resíduos de tirosina ou triptofano. A ligação da molécula ativa de tiramida ocorre somente ocorre em locais ao qual a enzima HRP está ligada. As moléculas de TSA reativo que não se ligaram ao complexo formam dímeros que são eliminados durante as etapas de lavagem (MORENO 2016).

Além de aumentar a sensibilidade da reação e ser ideal para proteínas de baixa expressão ou ensaios associados a anticorpos de baixa afinidade, a técnica permite uma redução no consumo de reagentes, diminuindo a redução do custo total do ensaio. (MEZEY e TÓTH 2007).



Fonte: MORENO (2016)

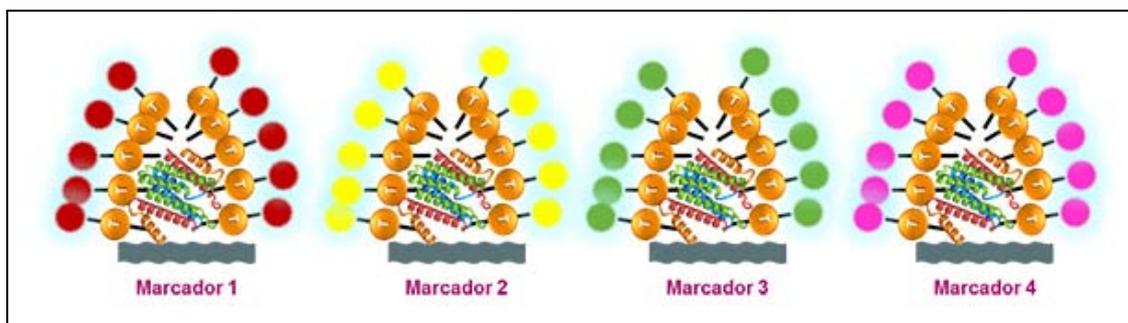
**Figura 3** - Infográfico comparativo entre a metodologia tradicional de marcação indireta (com o uso de anticorpo secundário marcado) e o TSA, com as moléculas marcadas de tiramida se depositando ao redor da proteína alvo e ampliando significativamente a sensibilidade do sinal.

### 1.7.2 Técnica Multiplex IHC: ensaios com múltiplos marcadores

Ainda pouco utilizada, a técnica multiplex de imuno-histoquímica favorece-se da característica da ligação covalente entre as moléculas de tiramida marcada e o complexo formado por antígeno, anticorpos e HRP presente na tecnologia do TSA<sup>TM</sup>, o que abre a possibilidade para a caracterização multiplexada da amostra.

A adoção de ensaios multiplexados de IHQ oferece benefícios singulares em relação ao método de simples marcação, como a contextualização espacial dos marcadores e avaliação da coexpressão celular individual na amostra. A caracterização dos tipos celulares e heterogeneidade do microambiente histológico assim como o monitoramento de vias de sinalização celular também é um diferencial da técnica uma vez que ocorre a preservação da arquitetura do tecido e das relações celulares (MORENO 2016).

Outro ponto importante desta técnica é a capacidade da realização de ensaios com múltiplos biomarcadores no mesmo corte de tecido, reduzindo o número de cortes seriados, necessários para a investigação de diferentes alvos (MEZEY e TÓTH 2007).



Fonte: MORENO (2016)

**Figura 4** - Esquema ilustrativo de alguns antígenos, na mesma amostra, apresentando diferentes fluoróforos, utilizando a tecnologia Multiplex IHC.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão de proteínas associadas com a angiogênese, utilizando técnica de coloração simultânea de múltiplos biomarcadores em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal metastático que tenham recebido bevacizumabe como parte do tratamento sistêmico.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Padronizar técnica de marcação simultânea de múltiplos biomarcadores em uma mesma lâmina.
- 2 Correlacionar as expressões de proteínas associadas com controle de angiogêneses com as características clínicas e patológicas.
- 3 Avaliar a associação da taxa de expressão dos marcadores CD31, Integrina  $\alpha 2\beta 1$ , Notch1, VEGFR2, DLL4, PlGF, Ki67.
- 4 Avaliar a expressão do CD31, Integrina  $\alpha 2\beta 1$ , Notch1, VEGFR2, DLL4, PlGF, Ki67 em material anátomo-patológico do tumor primário e em material anátomo patológico da metástase.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Como citado anteriormente, a adição do bevacizumabe a regimes quimioterápicos tem por finalidade neutralizar o VEGF e assim diminuir a ativação das vias intracelulares envolvidas na angiogênese, resultando muitas vezes no aumento da taxa de sobrevida global.

O estudo da expressão das diversas proteínas associadas à angiogênese em pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal metastático e sua associação ao tratamento sistêmico com bevacizumabe, bem como a identificação de um biomarcador reprodutível através de técnica que permite a identificação de vários marcadores em uma única lâmina de tecido, de forma simultânea e com maior sensibilidade na detecção destes marcadores em relação às técnicas comumente utilizadas, poderá auxiliar o clínico na tomada de decisões em relação a uma conduta terapêutica mais acertiva e com eventual redução a exposição a um tratamento potencialmente tóxico de indivíduos onde a terapia antiangiogênica não seria eficaz.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo de coorte, retrospectivo, longitudinal, uni-institucional.

### 4.2 CASUÍSTICA

#### 4.2.1 Seleção dos Pacientes

Este estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 2437/17 (Anexo 1). Foram coletados dados de 52 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretal (CID10 C18 e C20) metastático que receberam bevacizumabe como parte do tratamento sistêmico. Sendo que desses 21 pacientes apresentavam material patológico disponível da metástase, enquanto 31 dispõe de material do tumor primário.

- **Critérios de inclusão:**

Pacientes que receberam  $\geq 2$  ciclos de bevacizumabe associado à quimioterapia com esquema FOLFOX, FOLFIRI ou demais esquemas contendo 5FU infusional.

- **Critérios de exclusão:**

- Foram excluídos os pacientes que receberam apenas 1 ciclo de bevacizumabe;

- Combinação com outros esquemas de quimioterapia diferente de FOLFOX, FOLFIRI ou ausência 5FU infusional;
- Ausência de material anátomo-patológico disponível nos arquivos;
- Realizaram tratamento em outra instituição diferente do A.C.Camargo Cancer Center;
- Não apresentavam dados suficientes no prontuário médico.

#### **4.2.2 Grupos de Pacientes**

Foi realizado levantamento de pacientes que iniciaram bevacizumabe (que tenham recebido  $\geq 2$  ciclos) associado à quimioterapia para o tratamento de adenocarcinoma colorretal metastático (CID10 C18 e C20), entre maio/2006 e novembro/2009 a partir do banco de dados da Central de Quimioterapia do Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center.

### **4.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.3.1 Reações de Imuno-Histoquímica (IHQ)**

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas seguindo o protocolo descrito abaixo:

#### **DESPARAFINIZAÇÃO**

Banhos sequenciais com:

Xilol 3x de 5 minutos;

Etanol 100% 4x de 1 minuto;

Retirar e colocar na cuba com H<sub>2</sub>O destilada;

Colocar em água corrente por 5 minutos.

### **RECUPERAÇÃO**

Colocar as lâminas em cuba com solução tampão CITRATO 10 mM pH=6,0 dentro do micro-ondas por 45 segundos em 100% de potência e 15 minutos na potência 20%.

Aguardar 15 minutos em temperatura ambiente.

### **BLOQUEIO**

Realizar o bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, com 4 trocas de 5 minutos cada. (20 min)

(Utilizar um suporte para as lâminas e cobrir com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, tirando o excesso a cada troca)

Lavar as lâminas em água corrente por 5 min.

Retirar o excesso de H<sub>2</sub>O com o auxílio de um papel filtro e marcar com caneta hidrofóbica em volta do corte.

Colocar 200 uL de Protein block 20 min em câmara úmida.

Colocar em uma cuba com H<sub>2</sub>O por 1 min.

### **INCUBAÇÃO COM O ANTICORPO PRIMÁRIO**

Incubar as lâminas com o anticorpo primário (200 uL) **diluído** (em títulos previamente estabelecidos) e deixar *overnight* a 4°C.

## **REVELAÇÃO**

Lavar as lâminas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar por 30 min com **anticorpo secundário** - HRP.

Lavar as lâminas com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar as lâminas em solução substrato: diaminobenzidina-tetrahydrocloro (DAB)

1 gota para 1000uL por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

## **CONTRA-COLORAÇÃO**

Lavar as lâminas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contra-corar com Hematoxilina de Harris por 2 minutos e novamente lavar com água corrente e destilada.

## **MONTAGEM DAS LÂMINAS**

Utilizar reagente da DAKO ou seguir a sequência abaixo:

Etanol 80% por 30 segundos;

Etanol 95% por 30 segundos;

Etanol 100% 2 vezes por 30 segundos cada;

Xilol 4 vezes por 30 segundos cada.

Montar as lâminas com entellan.

### **4.3.2 Protocolo da Técnica Multiplex IHC**

#### **DESPARAFINIZAÇÃO**

Banhos sequenciais com:

Xilol 3x de 10 minutos.

Etanol: (100% 1 x 5 min; 95% 1 x 5 min; e 70% de 1 x 2 minutos).

Lavagem das lâminas em água destilada H<sub>2</sub>O (1 x 2 minutos) e TBST (1 x 2 minutos).

### **RECUPERAÇÃO**

Colocar as lâminas em cuba com solução tampão CITRATO 10 mM pH=6,0 dentro do micro-ondas por 45 segundos em 100% de potência e 15 minutos na potência 20 %

Aguardar de 15-30 minutos em temperatura ambiente.

Lavar das lâminas em água destilada H<sub>2</sub>O (1 x 2 minutos) e TBST (1 x 2 minutos).

### **BLOQUEIO**

Usar uma caneta barreira hidrofóbica para rodear completamente o tecido na lâmina, em seguida a lâmina com tampão de bloqueio e incubar em câmara úmida por 10 minutos à temperatura ambiente.

### **INCUBAÇÃO COM O ANTICORPO PRIMÁRIO**

Escorrer o tampão de bloqueio e aplicar o anticorpo primário.

Incubar de acordo com as especificações do fabricante (Perkin Elmer), seguindo as instruções sobre o tempo e a temperatura de incubação.

Usar um volume suficiente para cobrir completamente a lâmina (geralmente 100-300 uL por lâmina).

Lavar as lâminas 3 x 2 minutos em tampão TBST com agitação.

### **INCUBAÇÃO COM O ANTICORPO SECUNDÁRIO-HRP**

Incubar as lâminas com a solução de anticorpo secundário por tempo recomendado pelo fabricante, à temperatura ambiente. Cobrir todo o tecido presente na lâmina, geralmente 100-300  $\mu$ L por slide.

Lavar as lâminas 3 x 2 minutos cada em tampão TBST com agitação.

### **AMPLIFICAÇÃO DO SINAL**

Escorrer o excesso de tampão e pipetar de 100-300  $\mu$ L de TSA (*Opal Working Solution*) diluído 1:1000 com 1 x *Amplification Diluent* nas lâminas e incubar em temperatura ambiente durante 10 minutos.

Lavar as lâminas 3 x 2 minutos cada em tampão TBST com agitação.

### **TRATAMENTO EM MICRO-ONDAS**

Colocar as lâminas em um frasco de plástico e preenchê-lo completamente com tampão AR, cobrir o frasco com tampa, colocar no micro-ondas por 45 segundos na potência máxima (100%) em seguida por 15 minutos a 20% de potência.

Deixar as lâminas esfriarem em temperatura ambiente antes de prosseguir (15 - 30 min). Importante, não deixar as lâminas secar.

Lavar as lâminas em água destilada H<sub>2</sub>O (1 x 2 minutos) e TBST (1 x 2 minutos).

Em casos de multiplexação, reiniciar o protocolo na etapa 3 de bloqueio, caso contrário, seguir com a próxima etapa, **contra-coloração e montagem**.

## CONTRA-COLORAÇÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS

Aplicar 150 µl de DAPI Working solution (diluir 2 gotas para 1 mL de TBS) durante 5 minutos em câmara úmida e montar a lâmina com uma lamínula e meio apropriado para montagem.

Abaixo segue Quadro 1 com as características e especificações dos anticorpos utilizados.

**Quadro 1** - Características e especificações dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Marca/clonagem	Diluição	Recuperação antigênica	Sistema de detecção	Uso para IHQ
<b>CD31</b>	Abcam / policlonal	1:100	Micro-ondas em tampão AR6(Kit Perkin Elmer)	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	Sim
<b>Integrina α2β1</b>	Abcam / 16B4	1:50	Micro-ondas em tampão AR6(Kit Perkin Elmer)	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	Sim
<b>NOTCH1</b>	Thermo Scientific	1:50	Micro-ondas em tampão AR6(Kit Perkin Elmer)	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	Sim
<b>VEGFR2</b>	Neomarkers Policlonal	1: 50	Micro-ondas em tampão AR6(Kit Perkin Elmer)	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	Sim
<b>DLL4</b>	Abcam / policlonal	1:200	Micro-ondas em tampão AR6(Kit Perkin Elmer)	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	Sim
<b>K167</b>	Abcam / policlonal	1:100	Micro-ondas em tampão AR6(Kit Perkin Elmer)	NovoLink Max Polymer Livre de biotina	Sim
<b>PIGF</b>	R&D Systems Policlonal	1:20	Micro-ondas em tampão AR6(Kit Perkin Elmer)	Biotinylated Link Universal LSAB+	Sim

#### 4.4 SEPARAÇÃO DAS LÂMINAS DE TMA

Por se tratar de estudo retrospectivo o bloco de TMA correspondente aos tumores dos casos selecionados para este estudo foi resgatado do arquivo do c Novos cortes histológicos do TMA foram obtidos a partir do bloco já existente.

Quando da execução do bloco contendo os pacientes (grupo de casos), este foi realizado de maneira ordenada e sistemática, orientada através de uma tabela de Excel, que foi utilizada para determinar a posição e identificação exata dos casos no TMA.

Cada caso é representado duas vezes, e o resultado final demonstra uma espécie de imagem em espelho do outro. Cada bloco de TMA foi cortado em micrótomo rotativo a uma espessura de 5,0 micrômetros e os cortes foram transferidos para lâminas silanizadas (Star Frost Knittel Glass, Braunschweig, 64 Germany).

##### 4.4.1 Dados clínicos coletados

As informações clínicas coletadas foram resgatadas dos registros médicos arquivados no SAME e a partir do sistema de prontuário eletrônico MV2000 empregado no hospital e consistiam de: data de nascimento, idade, sexo, comorbidades, data do diagnóstico, localização do tumor, grau histológico, invasão sanguínea, invasão linfática, invasão perineural, número de linfonodos comprometidos, número de linfonodos ressecados, TNM, estágio ao diagnóstico, data da recaída quando M0 ao diagnóstico, locais de metástases, *status* do *KRAS* (esse dado foi resgatado do registro no prontuário), cirurgia do tumor primário, radioterapia neoadjuvante, quimioterapia neoadjuvante, quimioterapia adjuvante, ressecção de metástases, linha da quimioterapia associada ao primeiro uso de bevacizumabe, *performance status*

(ECOG) (**Quadro 2**) antes do início da quimioterapia associada ao bevacizumabe, tipo de quimioterapia associada ao bevacizumabe, linha de tratamento do bevacizumabe, quimioterapia para doença metastática em linhas prévias nos casos que o bevacizumabe foi utilizado em  $\geq 2$  a linha, presença de doença mensurável pré-início do bevacizumabe (casos sem doença mensurável ao início do bevacizumabe foram excluídos), data de início e término da quimioterapia e bevacizumabe, número mediano de ciclos de cada um, dose do bevacizumabe utilizada, melhor resposta atingida, método de imagem que detectou a melhor resposta, se ocorreu ou não progressão de doença e data, método de imagem utilizado para detectar a progressão, ocorrência de hipertensão, se houve uso de bevacizumabe em linhas posteriores, número de linhas utilizadas após progressão, data do último contato com o paciente e *status* do paciente no último contato.

**Quadro 2** - *Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status.*

<b><i>Performance status</i></b>	<b>Definição</b>
0	Completamente ativo, sem restrições na performance.
1	Consegue realizar trabalho leve; paciente em nível ambulatorial; restrições para trabalho pesado.
2	Consegue realizar cuidados próprios, mas incapaz para realizar alguma atividade de trabalho. Permanece < 50% acamado ou restrito em cadeira.
3	Capacidade de realizar apenas alguns cuidados pessoais; confinado a cama ou cadeira > 50% do dia.
4	Não consegue realizar nenhum cuidado pessoal; completamente confinado ao leito ou cadeira.

#### 4.4.2 Critérios de Resposta

Foi utilizada a resposta anotada no prontuário pelo médico assistente. O Departamento de Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center utiliza os critérios de RECIST para avaliação de resposta como prática clínica diária. Porém, o investigador teve a liberdade de reclassificar a resposta como abaixo se necessário.

Segue como exemplo no **Quadro 3**, os critérios de RECIST 1.1 (EISENHAUER et al. 2009).

**Quadro 3** - Critérios para resposta definidos pelo RECIST 1.1

<b>Resposta completa (RC)</b>	Desaparecimento de todas as lesões-alvo e redução dos linfonodos para $\leq 10\text{mm}$ . Desaparecimento de todas lesões não alvo e normalização do marcador tumoral.
<b>Resposta parcial (RP)</b>	Redução $\geq 30\%$ da soma dos maiores diâmetros das lesões alvo
<b>Doença estável (DE)</b>	Sem critérios para RC, RP, nem PD. Lesões não alvo: persistência de uma ou mais lesões ou não normalização do marcador
<b>Progressão de doença (PD)</b>	Aumento $\geq 20\%$ de no mínimo 5mm na soma dos maiores diâmetros das lesões-alvo ou aumento de novas lesões incluindo detecção pelo PET-CT. Lesões não-mensuráveis: aumento significativo da carga tumoral (ex: aumento de derrame pleural de pequeno para volumoso; aumento de linfangite carcinomatosa de localizada para disseminada)

#### 4.4.3 Definição dos desfechos de sobrevida

- 1 **Sobrevida livre de progressão:** tempo entre início do tratamento com bevacizumabe e a primeira progressão registrada em prontuário ou data do último contato para aqueles que não apresentaram progressão da doença.
- 2 **Sobrevida global:** tempo entre o início do tratamento com bevacizumabe e a data do óbito por qualquer causa. Os pacientes foram censurados na data do último contato para aqueles que não apresentaram óbito por qualquer causa.

A atualização mais recente dos dados, incluindo o *status* do paciente e da doença, foi realizada em outubro de 2019.

#### **4.4.4 Análise das Marcações**

Para visualização e aquisição de imagens representativas dos cortes marcados, foram utilizados microscópios de fluorescência Nikon TE-2000U e dois sistemas de microscopia confocal, um Fluoview FV10i da Olympus e um TS SP5 II da Leica. A imagem original foi dividida nos canais vermelho, verde e azul (RGB, red, green, blue) e individualmente corrigidas (contraste e brilho) para remoção de eventuais backgrounds, a cor final da imagem foi dada com os filtros de fluorescência (*filter set*) do software Image J.

Em seguida os dados obtidos foram comparados com resultados do estudo realizado anteriormente (PAIVA et al. 2015).

## **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi utilizada estatística descritiva para descrição das características demográficas e clínico-patológicas das amostras, bem como frequências e percentagens para variáveis ordinais e nominais e a mediana com a variação para variáveis contínuas.

Foram realizados testes avaliando a associação da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos com resposta, considerando as variáveis como contínuas, através do teste de Mann-Whitney.

As curvas de sobrevida foram calculadas por meio do método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste do log-rank.

Foram avaliados os papéis das variáveis demográficas, patológicas e imuno-histoquímicas na sobrevida global e na sobrevida livre de progressão através de análise univariada e multivariada, empregando o método de riscos proporcionais de Cox.

Na análise multivariada, entraram como covariáveis todas as variáveis com  $p \leq 0,05$  na análise univariada.

Todas as análises foram realizadas com o software IBM SPSS versão 25.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA

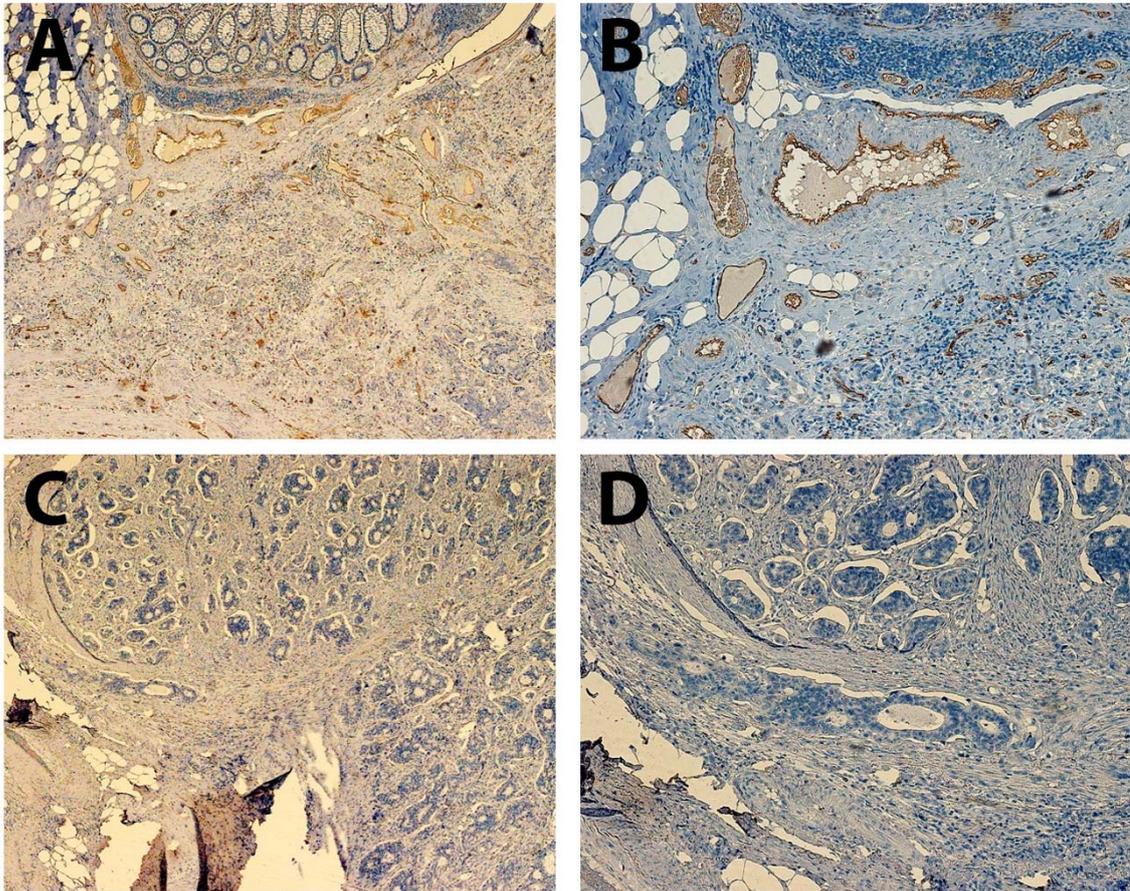
Visto que a metodologia *multiplex* possui como base do seu protocolo a imunohistoquímica convencional, inicialmente foram realizados ensaios com o objetivo de estabelecer as melhores condições para iniciar a padronização com o sistema *multiplex* com o kit Opal™ 4-Color Fluorescent IHC da Perkin Elmer.

Iniciamos realizando ensaios utilizando metodologia convencional para padronizar a técnica nas condições laboratoriais existentes. Adaptações quanto a tempos de incubação, diluição de reagentes e diferentes procedimentos de recuperação antigênica foram necessários para estabelecer a técnica.

Os primeiros ensaios de imunohistoquímica convencional foram realizados utilizando panela de pressão como forma de recuperação antigênica. Foi utilizado o anticorpo contra a proteína CD31 também conhecida como PECAM1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) uma importante glicoproteína transmembrana presente em células endoteliais cuja função está relacionada a adesão entre estas células.

Alguns estudos sugerem a relação desta molécula com eventos relacionado à angiogênese, sendo um modulador pró-angiogênico de células endoteliais. Foi observado em estudo realizado que, em camundongos deficientes de PECAM-1, a angiogênese foi reduzida no granuloma formado por um implante subcutâneo de membrana de polivinil (SOLOWIEJ et al. 2003; WOODFIN et al. 2007).

Na figura abaixo as regiões acastanhadas demonstram a presença da proteína CD31, sugerindo naquela região a presença de vasos sanguíneos.

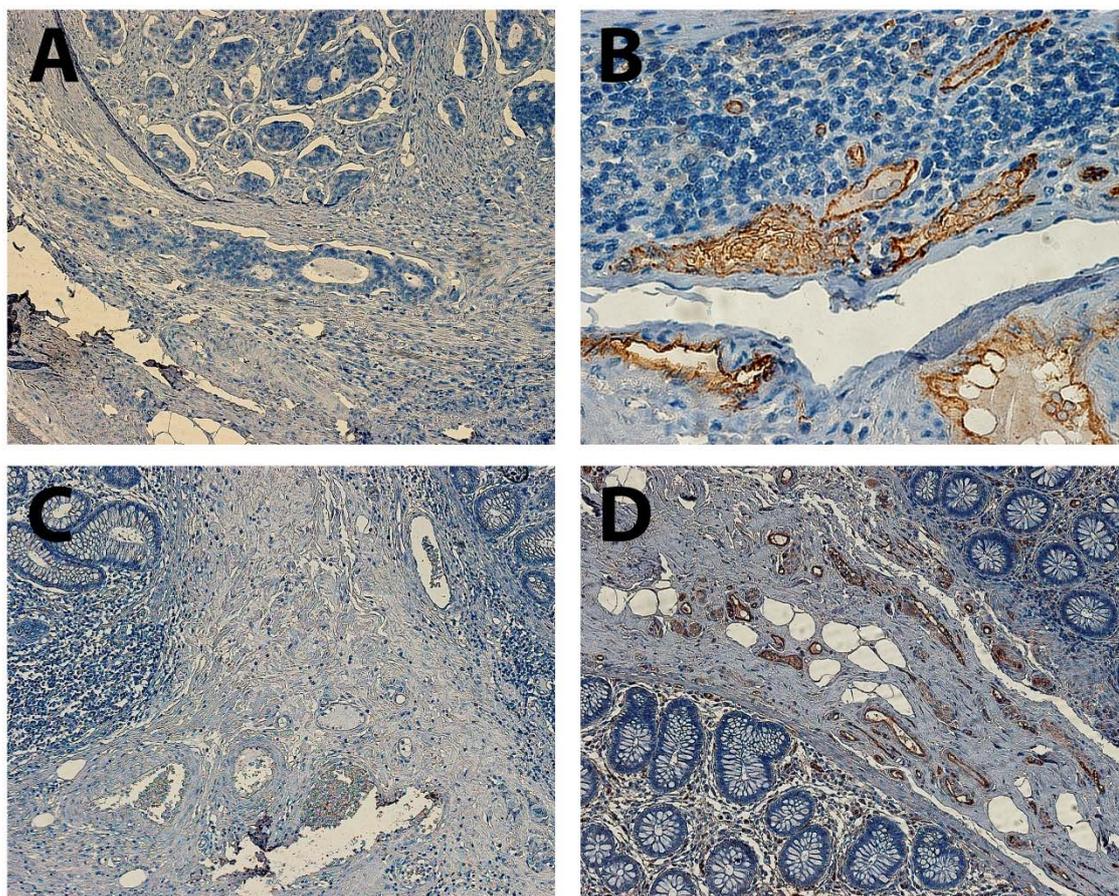


**Figura 5** - Imuno-histoquímica convencional de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário. **(A)** marcação com CD31 demonstrado em castanho **(DAB)**, objetiva de 10x. **(B)** marcação de CD31, objetiva de 20x. **(C)** controle negativo, objetiva de 10x **(D)** controle negativo, objetiva de 20x.

Uma das recomendações do fabricante para a realização da metodologia multiplex por fluorescência é que a recuperação antigênica seja realizada em micro-ondas, diferente do que foi realizado com os ensaios anteriores onde a panela de pressão foi utilizada. Portanto, realizamos ensaios de imuno-histoquímica com a

recuperação antigênica em micro-ondas em paralelo com o procedimento convencional.

Após as análises das marcações e comparação entre as duas formas de recuperação antigênica conforme podemos observar nas imagens presentes na Figura 6, verificamos que a recuperação em micro-ondas não alterou o padrão de marcação com anticorpo CD31. Portanto, daqui em diante a recuperação antigênica por micro-ondas foi adotada como método padrão para a marcação multiplex.



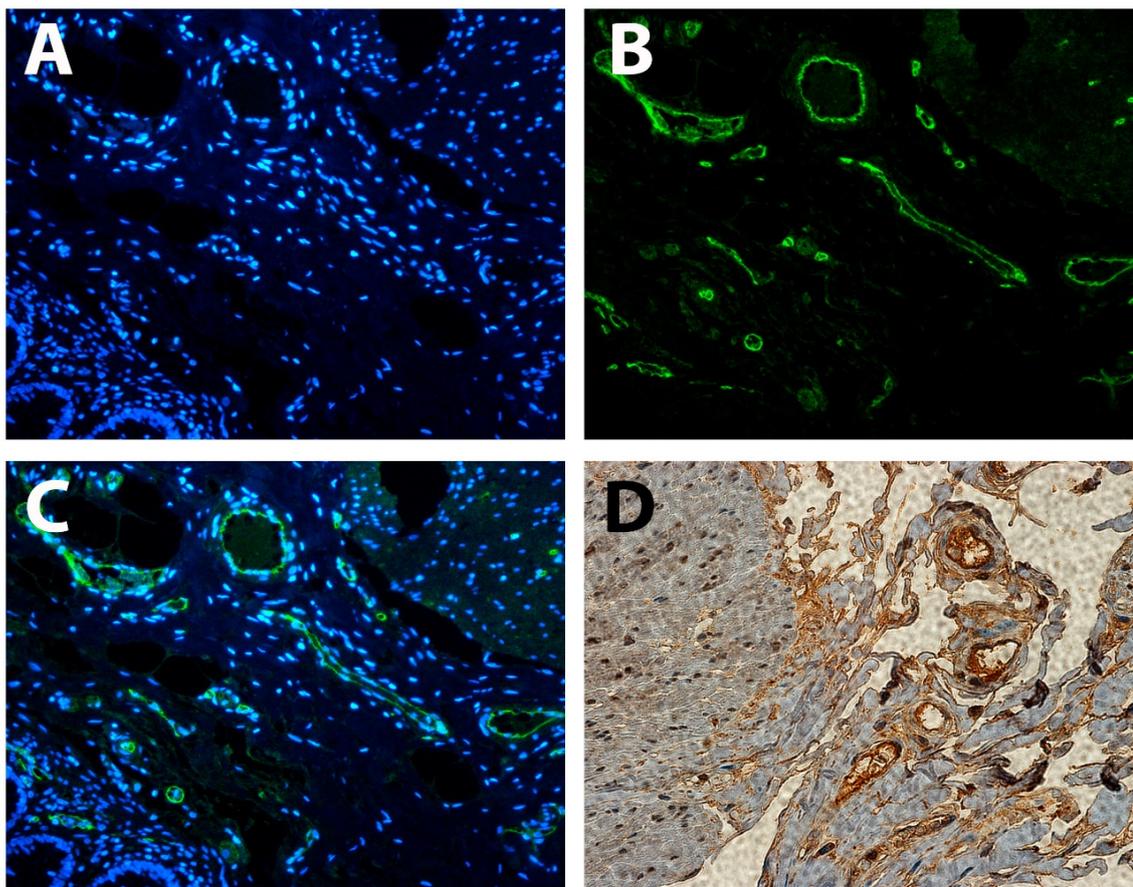
**Figura 6** - Comparação entre as duas formas de recuperação antigênica. Lâmina de adenocarcinoma de colorretal metastático (tumor primário). **(A)** recuperação antigênica em panela de pressão, **controle negativo**. **(B)** recuperação antigênica em panela de pressão, mostrando a expressão de CD31 em castanho. **(C)** recuperação antigênica no micro-ondas, controle negativo. **(D)** recuperação antigênica nas micro-ondas, mostrando a expressão de CD31 em castanho.

Posteriormente iniciamos a marcação com o kit Opal com o objetivo de padronizar esta metodologia. Para os ensaios de teste, foram selecionadas lâminas do grupo de estudos, sendo estas marcadas de forma individual (apenas um anticorpo por lâmina) seguindo rigorosamente o protocolo proposto pelo kit Opal 4-Color Fluorescent IHC da Perkin Elmer e paralelamente foram realizadas marcações por imuno-histoquímica convencional.

Por se tratar de uma metodologia nova e ainda pouco utilizada, tínhamos a necessidade de utilizar um marcador que serviria como referência quanto à localização dos vasos e para tal finalidade optamos em utilizar o anticorpo CD31 utilizando o fluoróforo Opal 520 com emissão fluorescente verde.

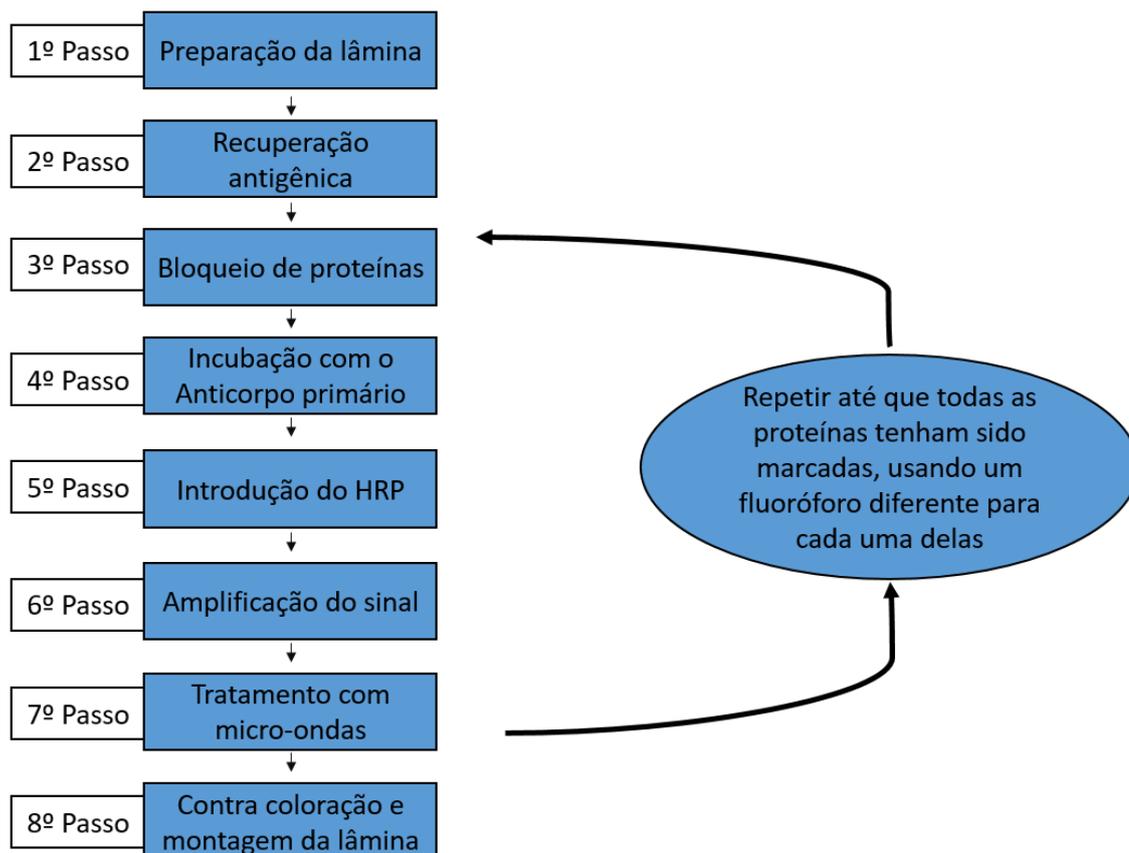
Conforme indicado na Figura 7, a marcação para CD31 com a sonda fluorescente verde foi bem-sucedida, sendo possível visualizar a presença de vasos sanguíneos com nitidez e intensidade. Apesar disso, a presença de um *background* fluorescente foi percebida, indicando a necessidade de ajustes na concentração do fluoróforo.

Sendo assim, observamos que o kit multiplex reproduzia os resultados observados na metodologia convencional.



**Figura 7** - Comparação entre a Imuno-histoquímica por fluorescência e Imuno-histoquímica convencional, em lâmina de adenocarcinoma de colorretal metastático (tumor primário). **(A)** contra coloração com DAPI, evidenciando o núcleo. **(B)** expressão de CD31 em verde (*Filter set* FITC). **(C)** sobreposição das imagens A e B. **(D)** marcação do CD31 por imuno-histoquímica convencional.

Após a avaliação dos resultados das marcações individuais, começamos a realizar testes com dois anticorpos em uma única lâmina, seguindo as especificações do fabricante, conforme apresentado no fluxograma a seguir:



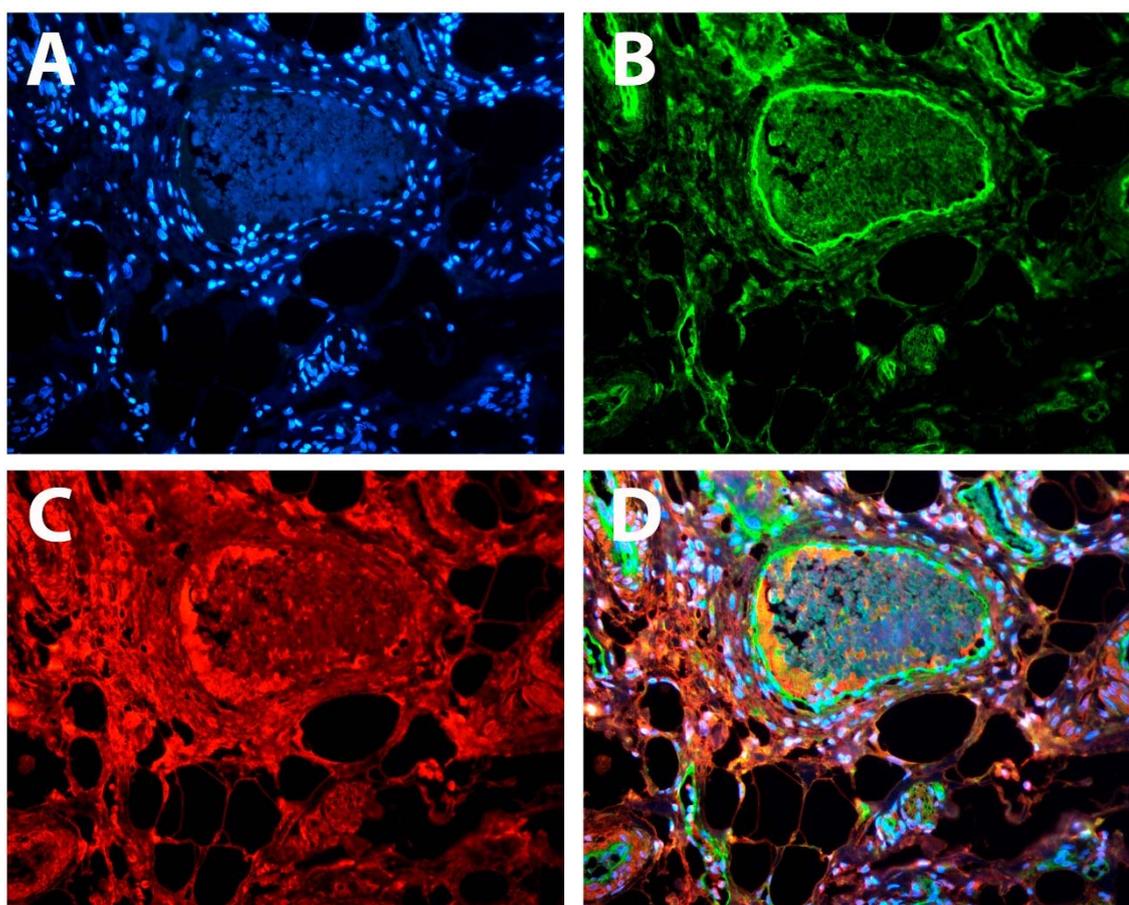
Os anticorpos selecionados para os primeiros ensaios por fluorescência foram escolhidos de acordo com a disponibilidade no banco de anticorpos do BCM, seguindo a lista dos anticorpos selecionados para o projeto e em conformidade com os utilizados em estudos anteriores do nosso grupo (Integrina  $\alpha 2\beta 1$ , DLL4, VEGFR2, NOTCH 1, Ki67 e Integrina  $\alpha 5\beta 3$ ) (PAIVA et al. 2015).

Na primeira marcação simultânea, optamos em realizar duas marcações na mesma lâmina e foram testados os anticorpos CD31 e Interina  $\alpha 2\beta 1$ .

A escolha do CD31 conforme já descrito foi realizada pois trata-se de um marcador de vaso para nortear a identificação das proteínas de interesse dos nossos estudos, todas elas presentes no endotélio vascular (SOLOWIEJ et al. 2003; WOODFIN et al. 2007).

Já a Integrina  $\alpha 2\beta 1$  foi utilizada por se tratar de um dos alvos de interesse em nossos estudos e por permitir a comparação com resultados previamente conhecidos de estudo realizado anteriormente (PAIVA et al. 2015).

Assim como nas marcações individuais conforme demonstramos anteriormente na Figura 7, as primeiras marcações utilizando dois anticorpos primários demonstraram um intenso *background*, conforme pode ser observado na imagem abaixo, Figura 8.

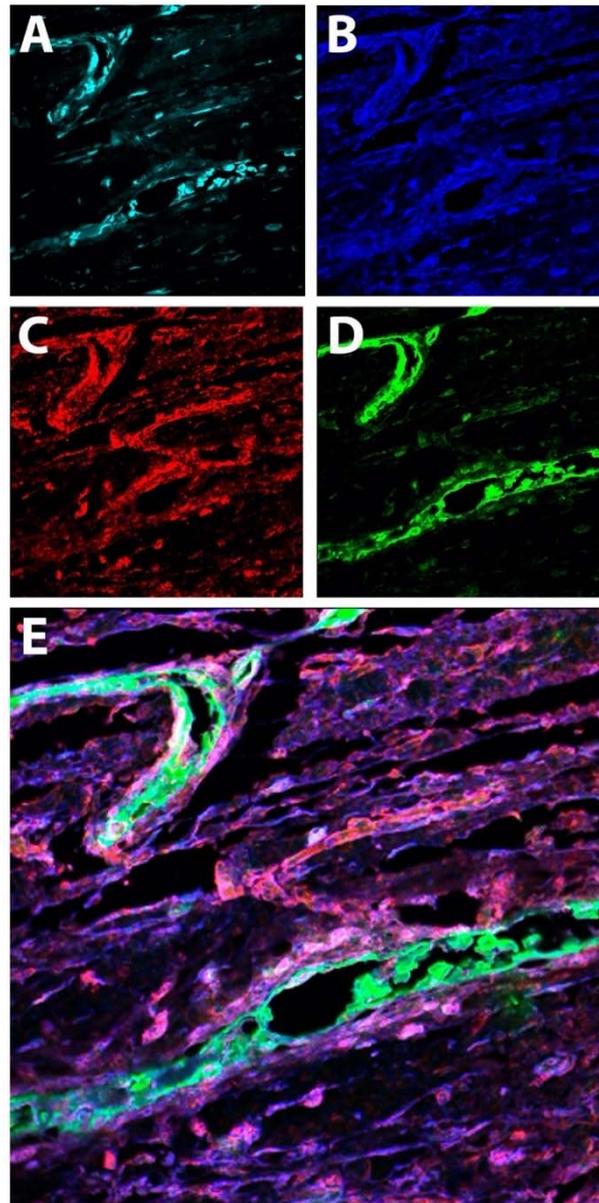


**Figura 8** - Primeiras marcações multiplexadas demonstrando um intenso *background*, em lâmina de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário). (A) marcação com DAPI (B) marcação com CD31 (C) marcação Integrina  $\alpha 2\beta 1$  (Filter set CY3) (D) Sobreposição das imagens A B e C.

As imagens acima demonstram a expressão das proteínas marcadas de forma múltipla em uma única lâmina, onde é possível reconhecer a luz de um vaso sanguíneo delimitado pela marcação com o CD31 (fluorescência em verde), observados nas imagens B e D.

Podemos notar que na luz do vaso também ocorrem marcações, porém, trata-se de marcações inespecíficas provavelmente ocasionadas pela peroxidase endógena presente nos eritrócitos daquele vaso (NELSON e COX 2019).

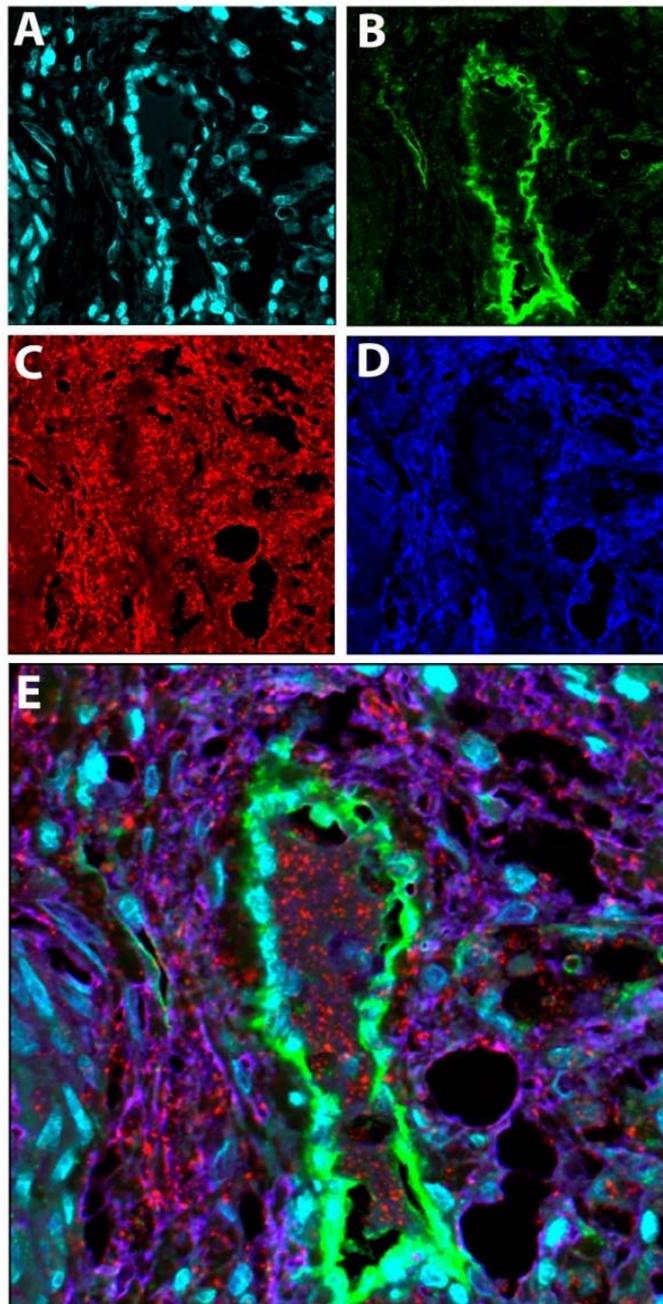
Após a marcação utilizando dois anticorpos, foram realizadas seguidas marcações com a capacidade máxima do kit (até 3 proteínas em uma única lâmina), onde aumentamos o número de lavagens com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% para quatro com o objetivo de melhorar o *background* e eventuais marcações inespecíficas.



**Figura 9** -Marcações multiplexadas, com quatro lavagens em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, em lâmina de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário). **(A)** marcação com DAPI. **(B)** DLL4, (*Filter set CY5*). **(C)** Beta 3 Integrina, (*Filter set CY3*). **(D)** CD31, (*Filter set FITC*). **(E)** Sobreposição das imagens A B, C e D.

Mesmo após aumentarmos o número das lavagens com peróxido de hidrogênio 3%, podemos observar na imagem acima que o *background* havia melhorado, porém algumas marcações inespecíficas poderiam estar ocorrendo provavelmente devido a alta intensidade da marcação e para tanto decidimos aumentar a diluição dos

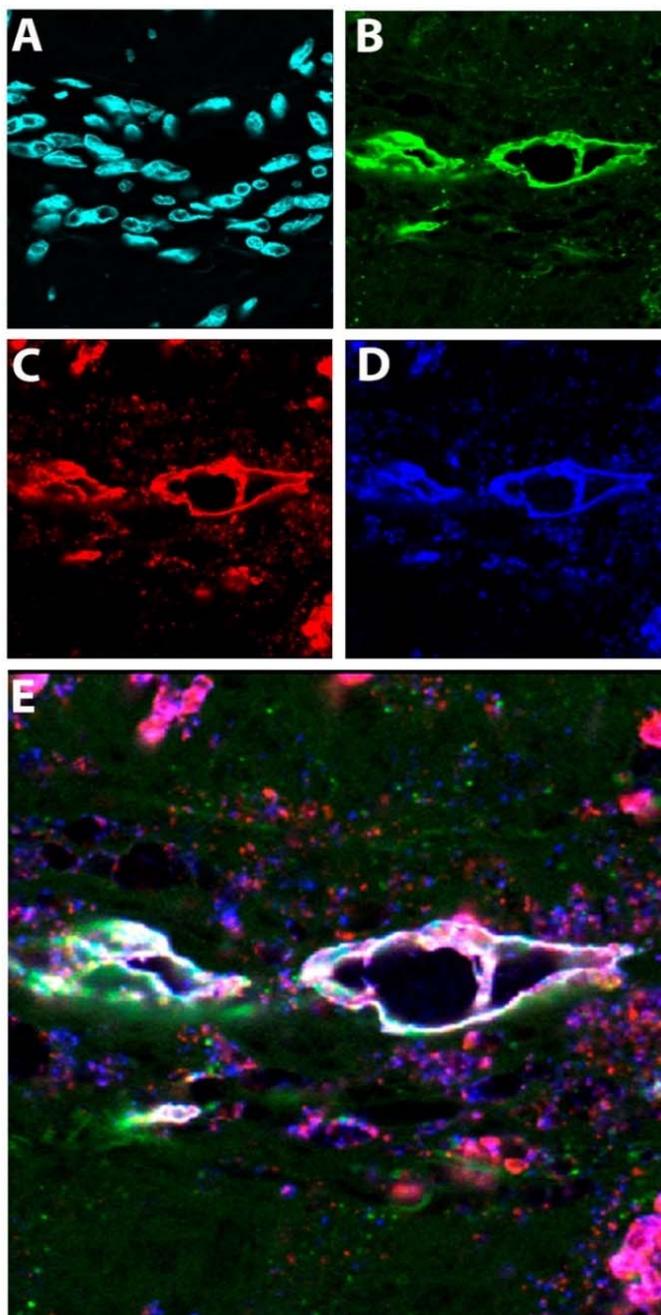
fluoróforos do kit, que sugere 1:50 e passamos a utilizar 1:100, conforme demonstrado na Figura 10.



**Figura 10** - Marcações multiplexadas, com fluoróforos diluídos 1:100, em lâmina de adenocarcinoma de colorretal metastático (tumor primário). (A) marcação com DAPI. (B) CD31, (*Filter set FITC*). (C) VEGFR2, (*Filter set CY3*). (D) Integrina  $\alpha 5\beta 3$  *Filter set CY5*). (E) Sobreposição das imagens A B, C e D.

Após as análises das imagens acima provenientes dos resultados dos testes realizados com diluições 1:100 dos fluoróforos do kit multiplex, decidimos realizar testes com diluições em 1:1000 afim de verificar se o *background* diminuiria ainda mais, pois como é possível observar claramente na imagem B da figura 10, o contorno do vaso marcado com CD31 é evidente e a expressão da fluorescência se destaca na lâmina permitindo distinguir o vaso sanguíneo no tecido.

Seguindo o mesmo procedimento citado acima, realizamos testes com o mesmo material utilizando uma diluição 1:1000 do fluoróforo, conforme podemos visualizar abaixo.



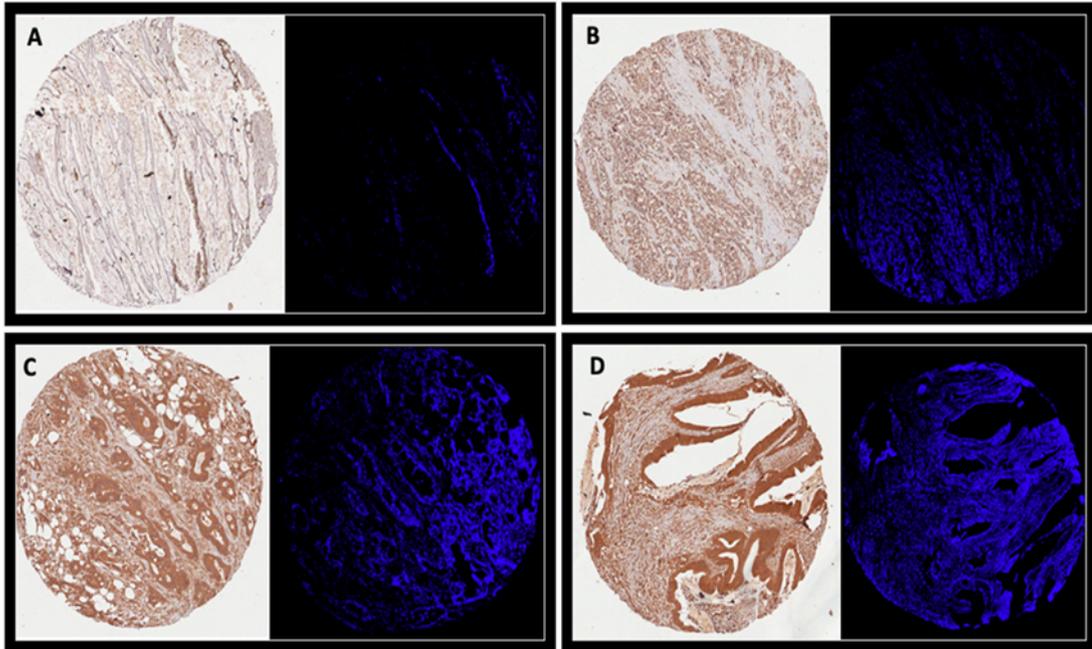
**Figura 11** - Marcações multiplexadas, com fluoróforos diluídos 1:1000. Em lâmina de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário). **(A)** marcação com DAPI demonstrando o núcleo. **(B)** CD31, (*Filter set FITC*). **(C)** NOTCH 1, (*Filter set CY3*). **(D)** Ki67 (*Filter set CY5*). **(E)** Sobreposição das imagens B, C e D.

Analisando os resultados das marcações, finalizamos a padronização do teste, pois concluímos que o *background* e algumas marcações inespecíficas conforme podemos observar nas imagens acima, haviam diminuído e consideramos que os resultados foram satisfatórios.

Inicialmente, as primeiras marcações foram realizadas seguindo o fluxo de trabalho sugerido pelo fabricante e adaptações para as nossas condições laboratoriais foram realizadas com o intuito de otimizar o uso do kit. Conforme foi apresentado, a cada novo teste realizado foram feitas modificações em relação as diluições do reagente de trabalho do kit (*Opal Working Solution*) visto que as marcações apresentavam-se muito intensas devido ao excesso de sinal. Após realizarmos diferentes diluições, passamos a diluição de 1:50 sugerida pelo fabricante para 1:1000 do reagente de trabalho do kit (*Opal Working Solution*), sendo essa a única alteração realizada.

### **5.1.2 Comparativo entre as análises de Imuno-histoquímica Convencional e por Fluorescência Multiplex**

Com o intuito de comparar o padrão de marcação obtido pela imuno-histoquímica tradicional e por fluorescência, as imagens da marcação de NOTCH1 no TMA de tumores colorretais foram recuperadas do arquivo digital do Departamento de Anatomia Patológica e comparadas com as imagens obtidas por microscopia confocal (Figura 12).



**Figura 12** - Comparativo entre as expressões de Notch1 em marcações por imunohistoquímica convencional e as marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático. (A) metástase hepática. (B) tumor primário. (C) tumor primário. (D) metástase hepática.

As imagens acima demonstram que há uma relação na intensidade da expressão do Notch1, tanto na marcação utilizando a imunohistoquímica convencional, quanto na marcação utilizando a técnica por fluorescência multiplex.

Ao analisarmos imagem A, podemos verificar tanto na marcação convencional (à esquerda) como na marcação por fluorescência (à direita) que houve uma baixa expressão da proteína Notch1 quando comparamos com as demais marcações, imagens B, C e D que apresentam uma expressão mais intensa.

## 5.2 ANÁLISE MULTIPLEX DOS TMA<sub>s</sub> NO GRUPO CASO

### 5.2.1 Sistemática das marcações multiplex

Foram realizadas marcações no grupo de casos em TMA dos seguintes marcadores angiogênicos (CD31, Integrina  $\alpha 2\beta 1$ , Notch1, VEGFR2, DLL4, PIGF, KI67).

Para cada lâmina é possível realizar a marcação para 3 proteínas, por isso foi necessário utilizar 4 lâminas de TMA, sendo uma destinada ao controle negativo e 3 para os marcadores.

Para os marcadores, o anticorpo CD31 foi utilizado nas três lâminas como referência de marcação dos vasos, uma vez que essa marcação foi a mais específica entre todos os marcadores estudados. O Quadro 4 indica as combinações de anticorpos utilizadas.

**Quadro 4** - Combinações de anticorpos nas lâminas de TMA.

ID da Lâmina	Anticorpos utilizados						
	CD31	Integrina $\alpha 2\beta 1$	NOTCH1	VEGFR2	DLL4	Ki67	PIGF
Lâmina 1	X	X	X				
Lâmina 2	X			X	X		
Lâmina 3	X					X	X
Lâmina 4							

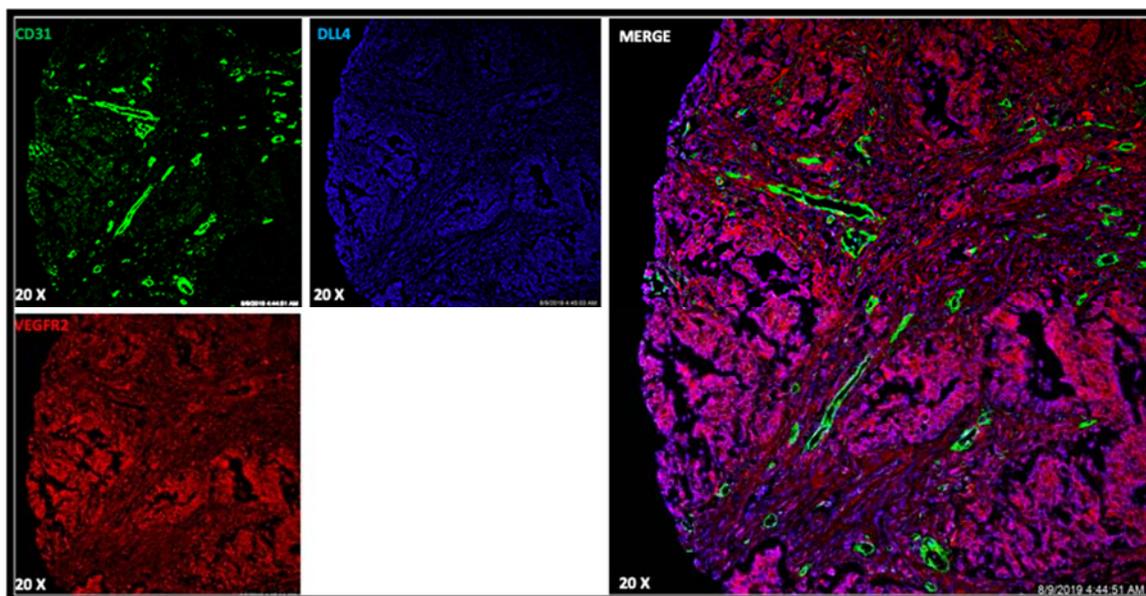
As lâminas de TMA estavam previamente desparafinizadas e não foi necessário a realização da bateria de desparafinização como realizado nas lâminas utilizadas para a validação do kit Opal 4-Color Fluorescent IHC da Perkin Elmer.

Seguiu-se então com as marcações conforme protocolo já descrito anteriormente, utilizando os anticorpos conforme apresentado no Quadro 4.

### 5.2.2 Análise das marcações multiplex

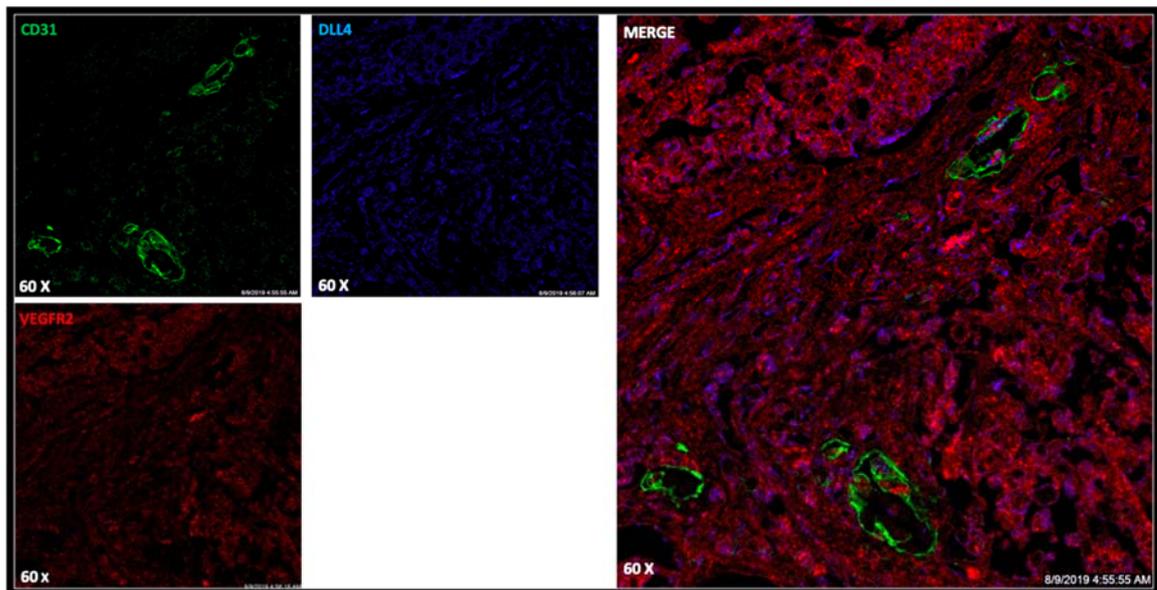
Para a visualização das marcações e captura das imagens utilizou-se o microscópio confocal da Leica TCS SP5, localizado no laboratório do CIPE.

As imagens dos *spots* do TMA foram obtidas em objetiva de 10x para análises quantitativas de fluorescências e nas objetivas de 20x e 60x para visualização da localização dos vasos marcados pelo anticorpo anti-CD31 nos casos representativos que foram escolhidos pra representar os painéis de marcação, conforme indicado na Figura 13.



**Figura 13** - Marcações multiplex em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático, tumor primário. É possível analisar as marcações em objetiva de 20x das expressões das proteínas CD31 (*Filter set FITC*), VEGFR2 (*Filter set CY3*) e DLL4 (*Filter set CY5*) individualmente e a co-expressão celular e contextualização espacial dos marcadores na imagem sobreposta(merge).

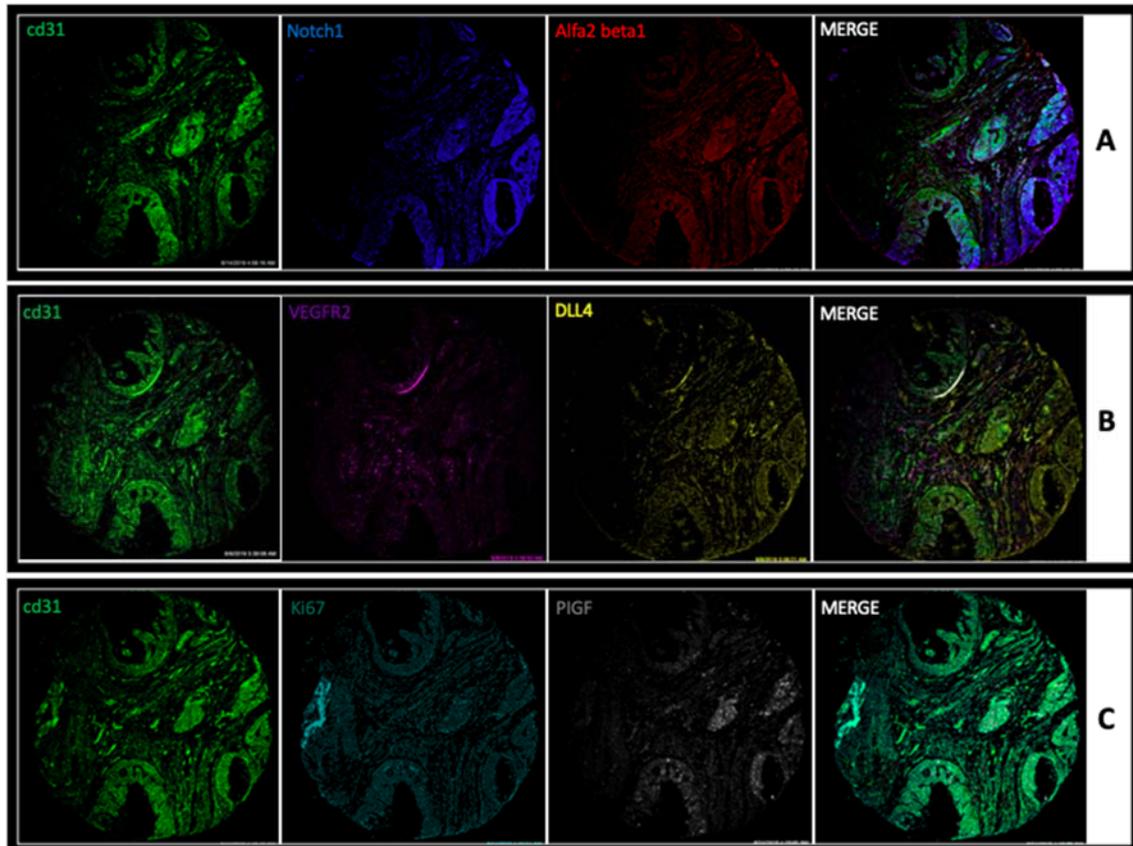
Observando as imagens das Figuras 13 e 14, podemos notar uma das características oferecidas pela técnica de fluorescência multiplex que é a observação de forma simultânea da co-expressão celular das proteínas estudadas e a contextualização espacial dos marcadores quando as imagens de uma mesma região do tecido são sobrepostas.



**Figura 14** - Marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma de colorretal metastático, tumor primário. É possível analisar as marcações em objetiva de 60x das expressões das proteínas CD31 (*Filter set FITC*), VEGFR2 (*Filter set CY3*) e DLL4 (*Filter set CY5*) individualmente e a co-expressão celular e contextualização espacial dos marcadores na imagem sobreposta(merge).

### 5.2.3 Resultados das análises Multiplex em TMA

A Figura 15 mostra imagens representativas de um spot do TMA marcado com os sete marcadores em três lâminas onde é possível identificar o padrão de colocalização das proteínas.



**Figura 15** - Marcações multiplex em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário). Lâmina A, expressão das proteínas CD31, Notch1 e Alfa2 Beta1 integrina. Lâmina B, expressão das proteínas CD31, VEGFR2 e DLL4. Lâmina C, expressão das proteínas CD31, Ki67 e PIGF.

A imagem acima representa todas as marcações realizadas em um paciente em apenas 4 lâminas de TMA.

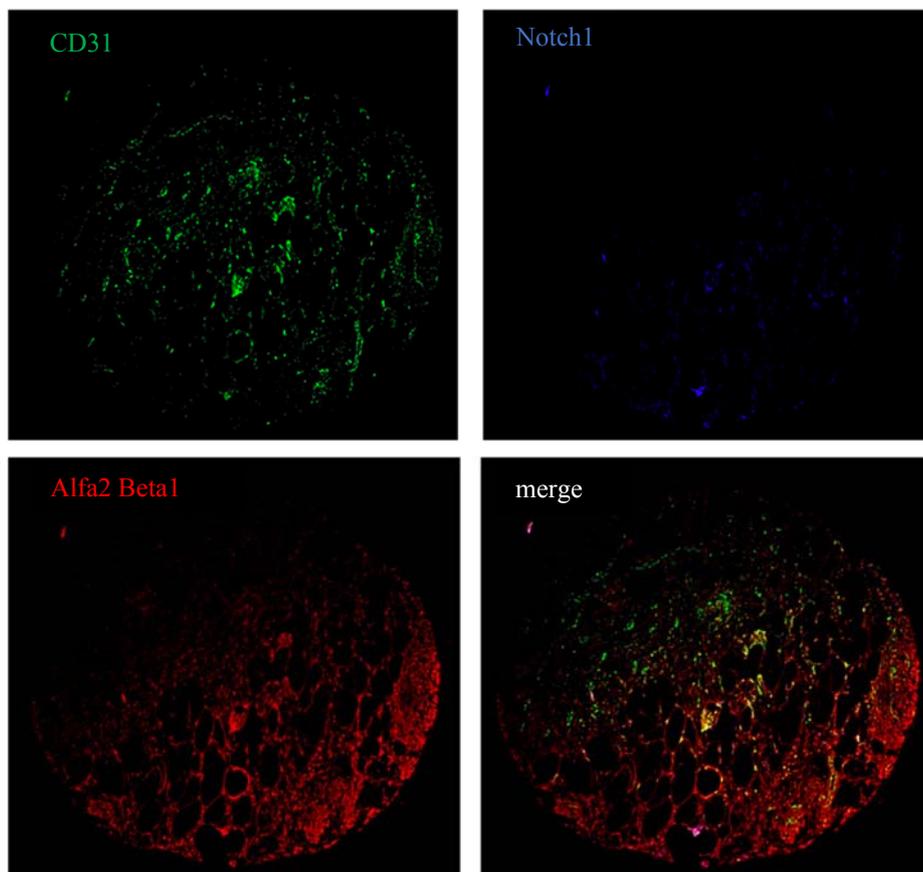
Através do programa Image J foi possível avaliar as expressões das proteínas marcadas, onde na lâmina A CD31 (7,911), Notch1 (15,249), Alfa 2 beta1 (5,609), lâmina B CD31 (7,528), VEGFR2 (5,680), DLL4(3,114), lâmina C CD31 (7,911), Ki67(1,934), P1GF(3,799). Os controles negativos (lâmina 4) apresentaram valores de fluorescência de 0,233 (Canal FITC), 0,075 (Canal CY3) e 0,122 (Canal CY5).

Os *spots* apresentados nas figuras 16 17 e 18, a seguir, representam as marcações realizadas em tumor primário de adenocarcinoma colorretal metastático de

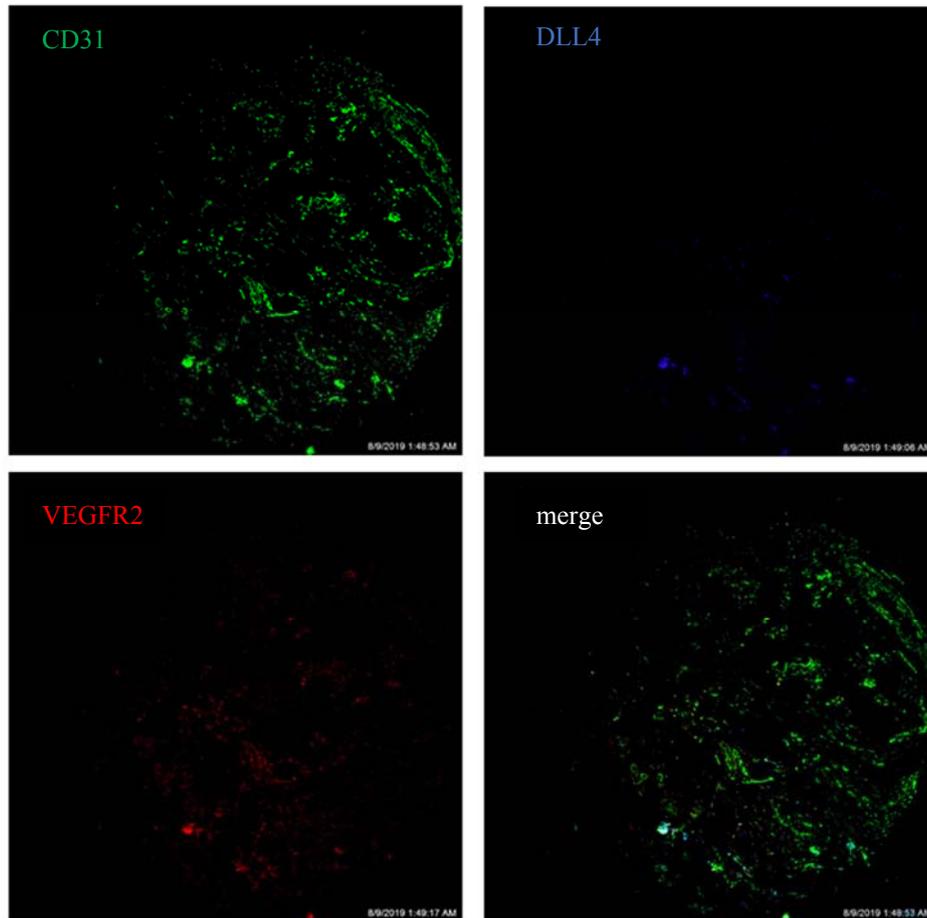
um paciente onde podemos analisar a expressão do CD31 através da fluorescência verde (*Canal FITC*), indicando a presença de vasos sanguíneos.

Ao analisarmos a marcação do Notch1 podemos concluir que houve uma baixa expressão, devido a baixa intensidade de fluorescência do fluoróforo azul (*Filter set CY5*) utilizado para identificar este marcador.

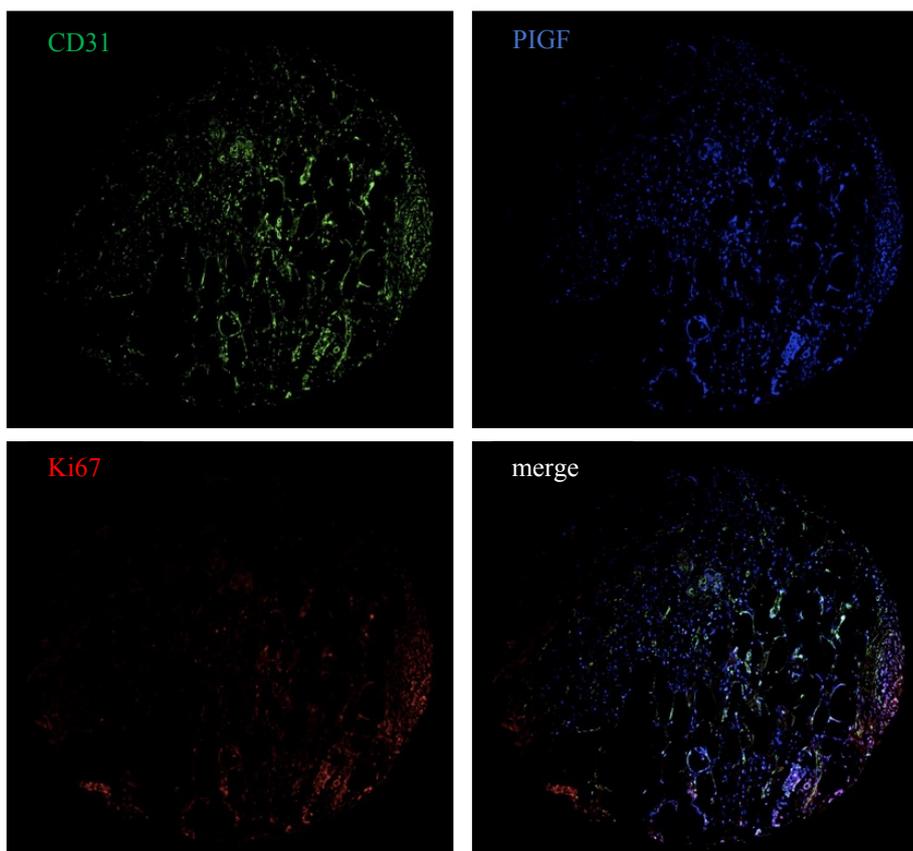
Quando analisamos a sobreposição das imagens (*merge*) é possível verificar claramente as regiões de vasos, uma vez que a fluorescência verde (*Filter set FITC*) se destaca nas imagens sobrepostas.



**Figura 16** - Marcações multiplex em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário). (A-D) lâmina A, CD31, (*Filter set FITC*). NOTCH 1, (*Filter set CY5*). (C) Alfa 2 Beta 1 (*Filter set CY3*).



**Figura 17** - Marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário). CD31, (*Filter set* FITC). DLL4, (*Filter set* CY5). VEGFR2 (*Filter set* CY3).



**Figura 18** - Marcações multiplexadas em lâmina de TMA de adenocarcinoma colorretal metastático (tumor primário). CD31, (*Filter set FITC*). PIGF, (*Filter set CY5*). Ki67 (*Filter set CY3*).

#### 5.2.4 Análise da Influência da Expressão de Marcadores Imuno-histoquímicos

Todos os marcadores foram avaliados no software Image J, segue a Tabela 1 com os valores da mediana para cada marcador.

**Tabela 1** - Mediana da intensidade de fluorescência dos marcadores em leitura digital realizada no software Image J.

Marcador	Mediana (Fluorescência)
CD31	6,40
Alfa2 Beta1	3,92
Notc1	10,76
VEGFR2	3,33
DLL4	2,16
Ki67	2,03
PIGF	5,07

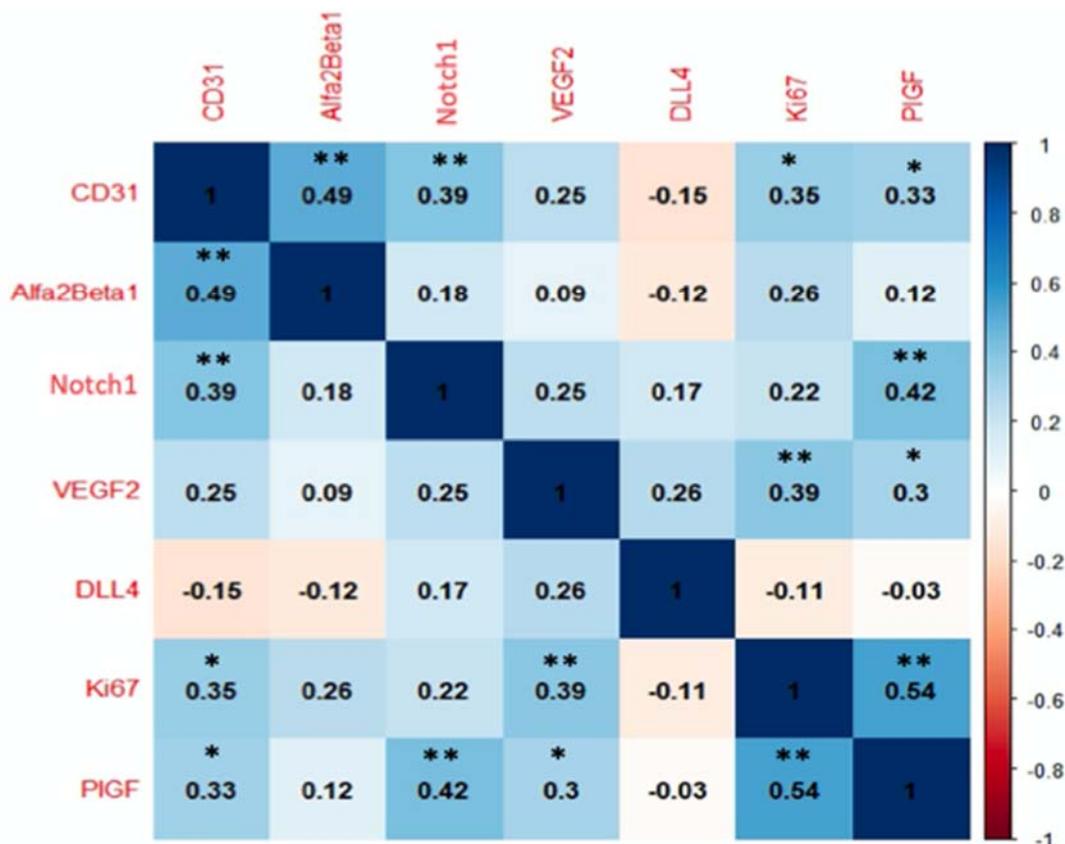
### 5.2.5 Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos

**Quadro 5** - Associação entre os marcadores imuno-histoquímicos.

	CD31	Alfa2 Beta1	Notch1	VEGFR2	DLL4	Ki67	PIGF
CD31	-	<0,001	0,004	NS	NS	0,012	0,017
Alfa2 Beta1	<0,001	-	NS	NS	NS	NS	NS
Notch1	0,004	NS	-	NS	NS	NS	0,002
VEGFR2	NS	NS	NS	-	NS	0,005	0,029
DLL4	NS	NS	NS	NS	-	NS	NS
Ki67	0,012	NS	NS	0,005	NS	-	<0,001
PIGF	0,017	NS	0,002	0,029	NS	<0,001	-

Foi utilizado o teste do qui-quadrado. Se > 20% das caselas tinham valores esperados abaixo de 5 ou valor esperado < 1 foi utilizado o teste exato de Fisher.

Após análise realizada no Quadro 5, observam-se que: o CD31 associa-se a Alfa2 Beta1, Nocth1, Ki67 e PIGF, e não se associa a VEGFR2, nem DLL4. Alfa2Beta1 associa-se somente ao CD31. Notch1 associa-se a CD31 e PIGF. VEGFR2 associa-se apenas ao Ki67 e PIGF. O DLL4 não se associa a nenhum outro marcador estudado. O Ki67 associa-se ao CD31, VEGFR2 e ao PIGF. O PIGF associa-se ao CD31, Notch1 VEGFR2 e Ki67.



**Figura 19** - Matriz de correlação entre os marcadores angiogênicos. O valor de  $r$  está indicado em cada célula. Os valores marcados com \* indicam correlação significativa no nível 0,05 e os valores marcados com \*\* indicam correlação significativa no nível 0,01.

### 5.2.6 Marcadores imuno-histoquímicos e Resposta Objetiva

Não houve associação entre nenhum dos marcadores estudados e resposta objetiva (Tabela 2).

**Tabela 2** - Associação entre marcadores imuno-histoquímicos e Resposta Objetiva.

Variável	Categoria	Resposta Objetiva		Total	p
		RC+RP	DE+DP		
CD31	<mediana	13(52)	10(45,5)	23	0,44
	>mediana	12(48)	12(54,5)	24	
Alfa2Beta1	<mediana	12(48)	10(45,5)	22	0,55
	>mediana	13(53)	12(54,5)	25	
Notch1	<mediana	11(44)	14(63,6)	25	0,14
	>mediana	14(56)	8(36,4)	22	
VEGFR2	<mediana	12(48)	11(50)	23	0,56
	>mediana	13(52)	11(50)	14	
DLL4	<mediana	14(56)	11(50)	25	0,45
	>mediana	11(44)	11(50)	22	
PIGF	<mediana	13(52)	13(59,1)	26	0,42
	>mediana	12(48)	9(40,9)	21	
Ki67	<mediana	15(60)	10(45,5)	25	0,24
	>mediana	10(40)	12(54,5)	22	

Foi utilizado o teste do qui quadrado. Se > 20% das caselas tinham valores esperados abaixo de 5 ou algum valor esperado < 1 foi utilizado o teste exato de fisher.

### 5.2.7 Associação entre marcadores e características clínicas e patológicas dentre os pacientes que receberam bevacizumabe em primeira linha

O uso de bevacizumabe esteve associado com expressão abaixo da mediana em 76,9% (n=10) dos casos marcados CD31 e 76,9%(n=10) dos casos marcados com o VEGFR2. Valores de Notch1 abaixo da mediana estiveram associados com o subtipo histológico adenocarcinoma tubular e desenvolvimento de Hipertensão Arterial (HAS), já valores de Notch1 acima da média estiveram associados a metástase em peritônio. Valores de VEGFR2 abaixo da mediana estiveram associados a pacientes do sexo masculino. Valores de DLL4 abaixo da mediana estiveram associados com presença de metástase em fígado. A expressão de Ki67 abaixo da mediana esteve

associada com ter feito Rxt neoadjuvante, com doença loco-regional, com ter recebido quimioterapia neoadjuvante e quimioterapia adjuvante. PIGF acima da mediana esteve associado a doença loco-regional e com não ter doença detectável pré-bevacizumabe.

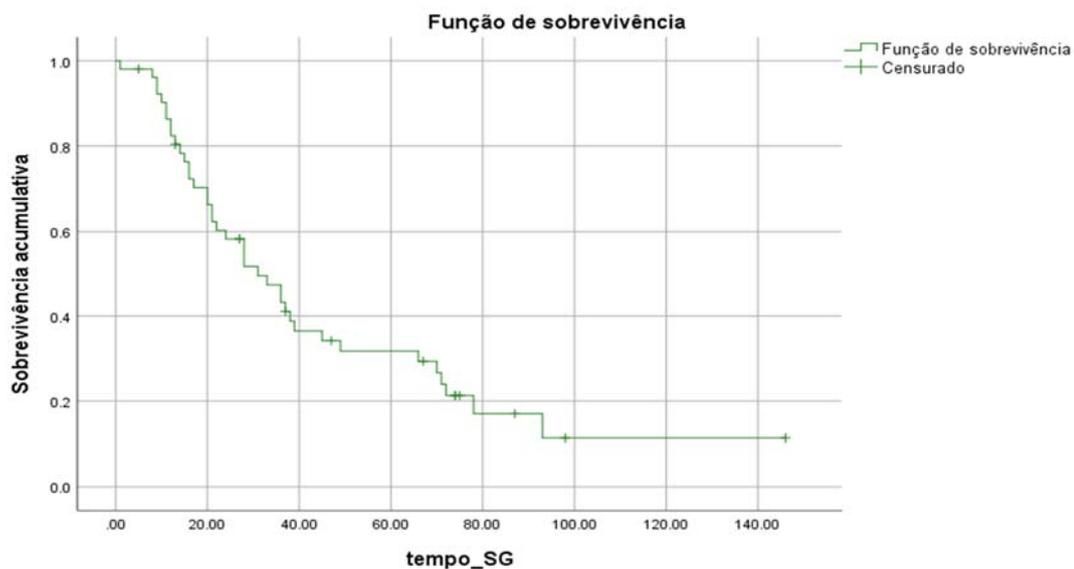
**Tabela 3** - Associação das características clínicas e patológicas com os marcadores imuno-histoquímicos.

<b>Marcador</b>	<b>Expressão</b>	<b>Característica</b>	<b>p</b>
<b>CD31</b>		- uso de bevacizumabe	0,025
<b>Notch1</b>		- Adenocarcinoma tubular	0,018
		- Metástase em Peritônio	0,021
		- HAS	0,01
<b>VEGFR2</b>		- Sexo	0,046
		- uso de bevacizumabe	0,026
<b>DLL4</b>		- Metástase em fígado	0,041
<b>Ki67</b>		doença loco-regional	0,037
		- Rxt neoadj	0,008
		- QT neoadj	0,008
		- Qt adj	0,049
<b>PIGF</b>		Doença loco-regional	0,037
		- Presença de doença detectável pré bevacizumabe	0,019

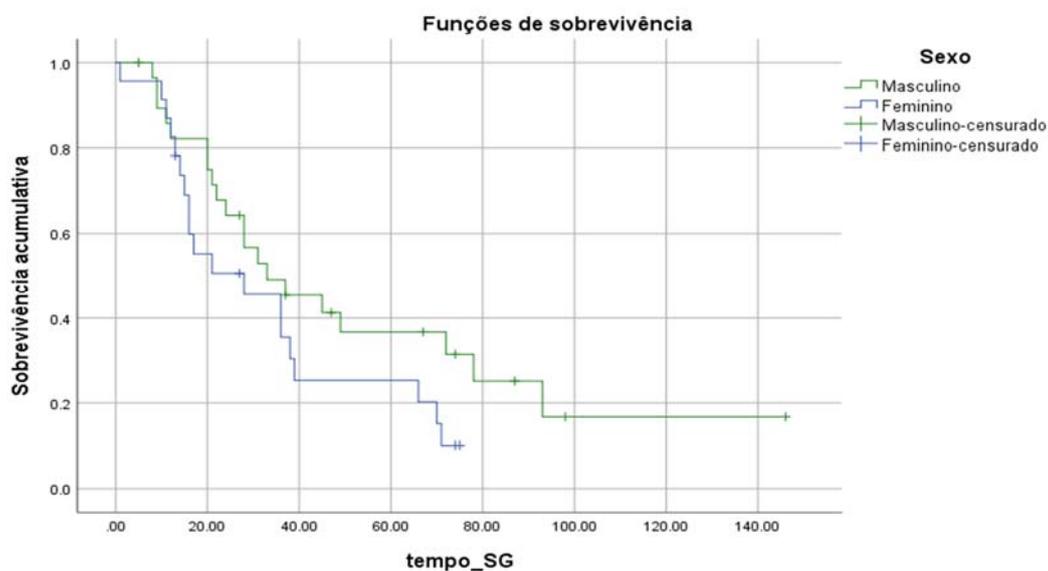
Foi utilizado o teste do Qui-quadrado. Se > 20% das caselas tinham valores esperados abaixo de 5 ou algum valor esperado < 1 foi utilizado o teste exato de Fisher.

### **5.2.8 Associação entre as características clínicas e a Sobrevida Global (SG)**

A SG dos pacientes do estudo está representada na Figura 20 e apresenta uma mediana de sobrevida de 31 meses. Não houve diferença estatística entre pacientes do sexo masculino e feminino (Figura 21).



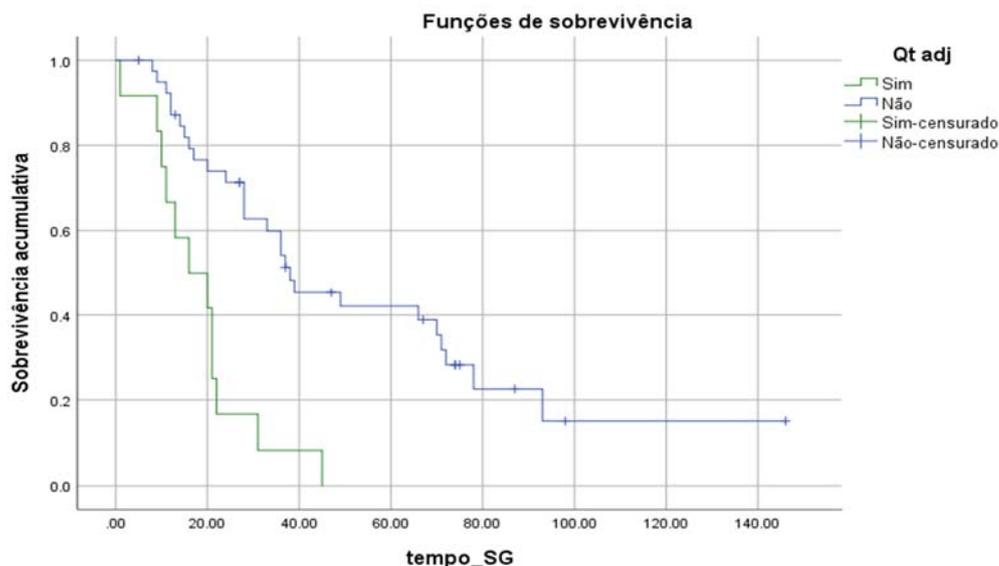
**Figura 20** - Sobrevida global (SG) em meses. A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier.



**Figura 21** - Sobrevida global (SG) conforme o sexo. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (masculino x feminino;  $p = 0,113$ ).

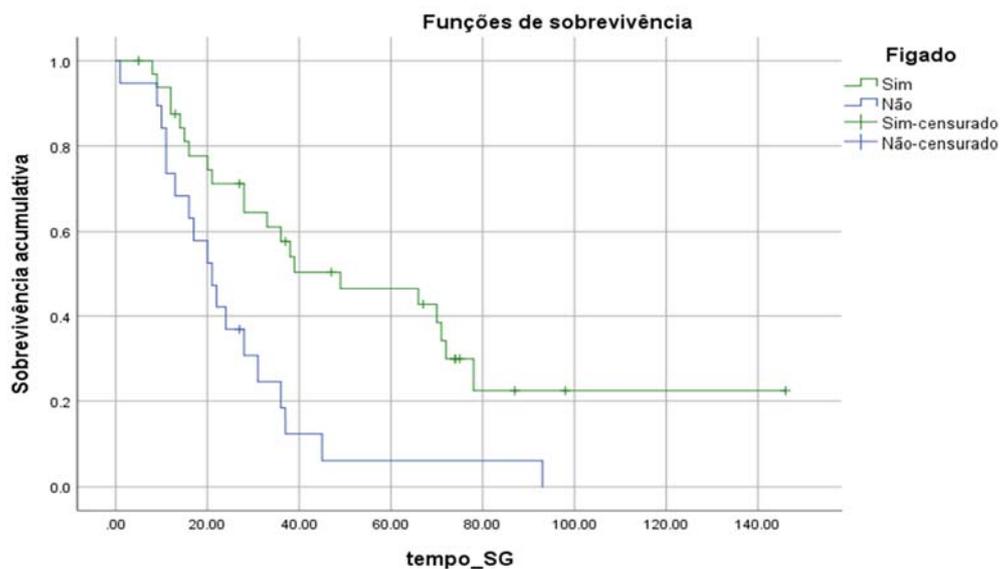
As seguintes características clínicas não estiveram associadas com SG: localização do tumor, histologia, grau, presença de metástase no pulmão, peritônio, SNC e pele, doença loco-regional, cirurgia do tumor primário, radioterapia

neoadjuvante, quimioterapia neoadjuvante (dados não mostrados). Em relação à quimioterapia adjuvante, foi observada diferença estatisticamente significativa em termos de SG para os pacientes que foram submetidos a tratamento adjuvante (Figura 22) (dados não mostrados).

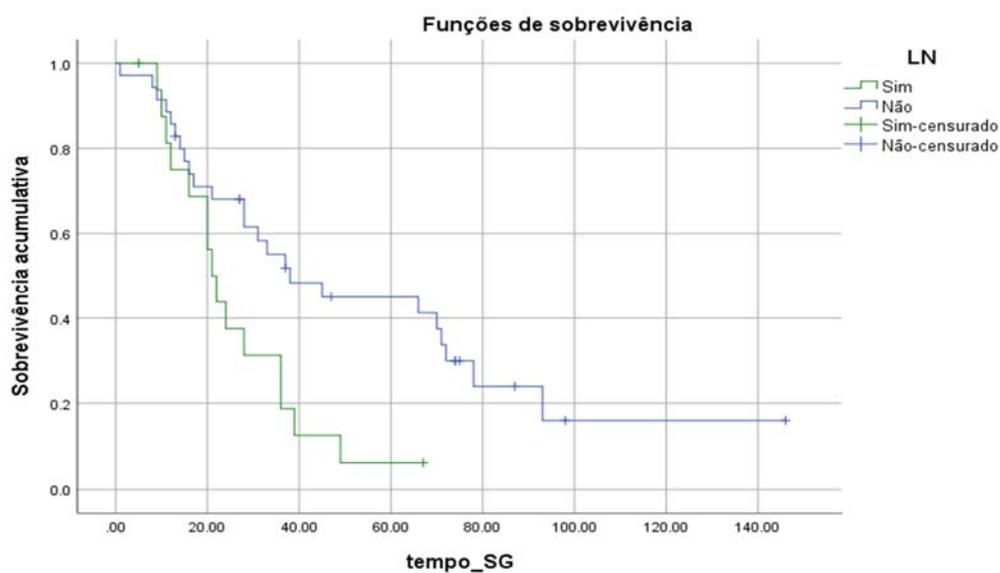


**Figura 22** - Sobrevida global (SG) conforme terapia adjuvante. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (recebeu QT adjuvante x não recebeu QT adjuvante;  $p < 0,001$ ).

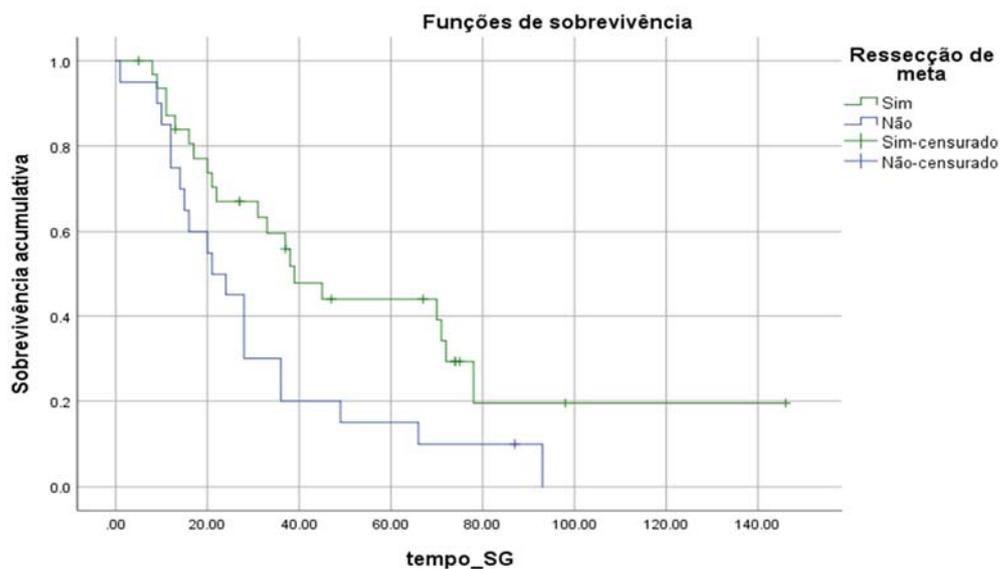
Houve diferença significativa em termos de SG em relação estadiamento ao a presença de metástase no fígado versus outros outros sítios de metástases (Figura 23), presença de metástase linfonodal (Figura 24), ressecção de metástase (Figura 25) e padrão de resposta objetiva (Figura 27).



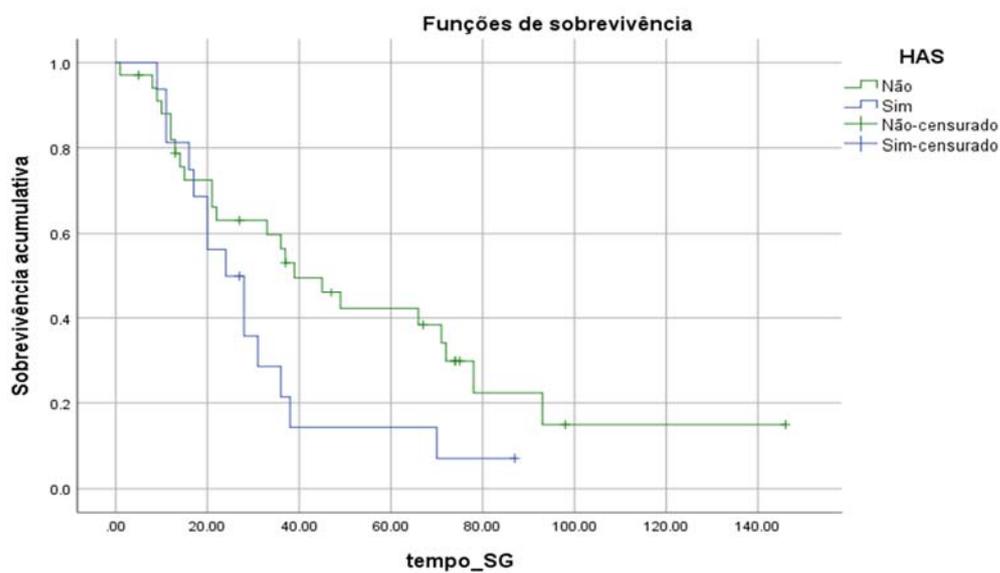
**Figura 23** - Sobrevida global (SG) conforme metástase em fígado. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (sim x não;  $p=0,002$ ).



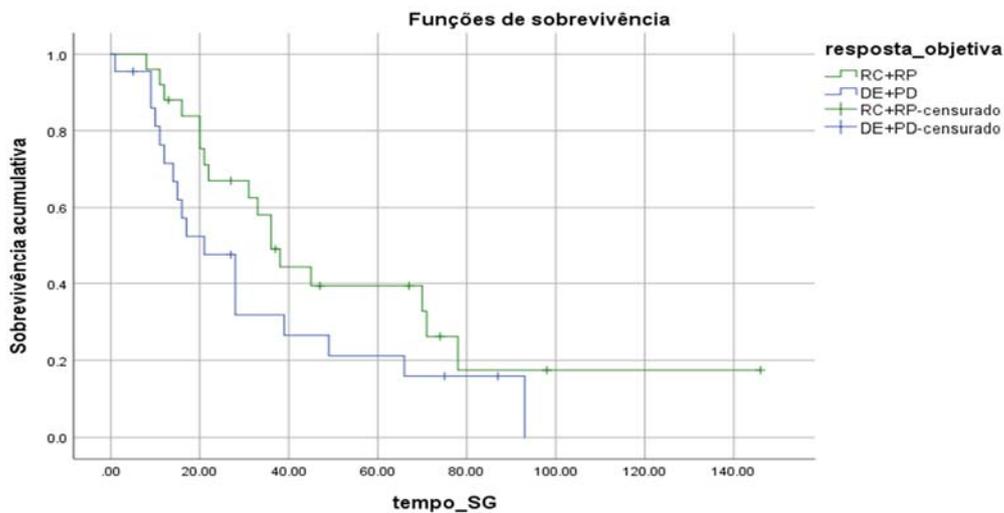
**Figura 24** - Sobrevida global (SG) conforme metástase linfonodal. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (sim x não;  $p=0,011$ ).



**Figura 25** - Sobrevida global (SG) conforme ressecção de metástase. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (sim x não;  $p=0,020$ ).



**Figura 26** - Sobrevida global (SG) conforme hipertensão arterial. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (sim x não;  $p=0,063$ ).

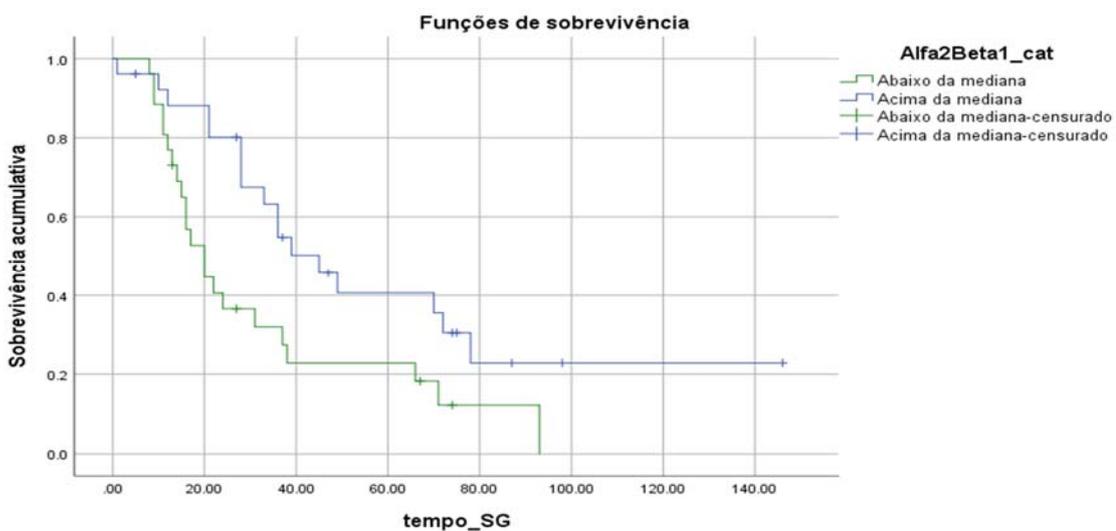


**Figura 27** - Sobrevida global (SG) conforme resposta objetiva. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (RC+RP x DE+PD;  $p = 0,104$ ).

### 5.2.9 Associação entre os marcadores e a Sobrevida Global (SG)

A associação entre SG e os marcadores foi observada para os pacientes que apresentam expressão de integrina alfa2beta1 acima da mediana ( $p=0,013$ ) (Figura 25).

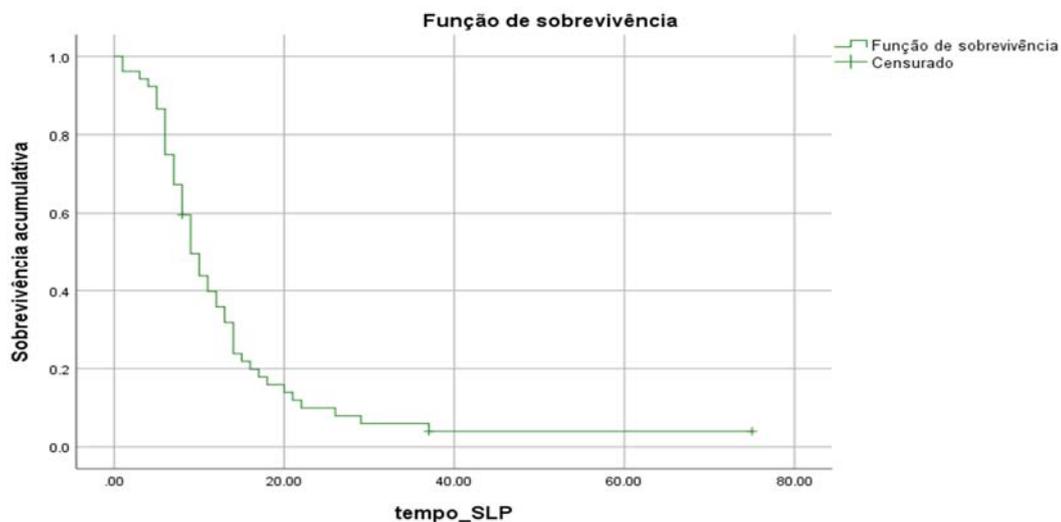
Para os outros marcadores, não houve associação significativa com a SG.



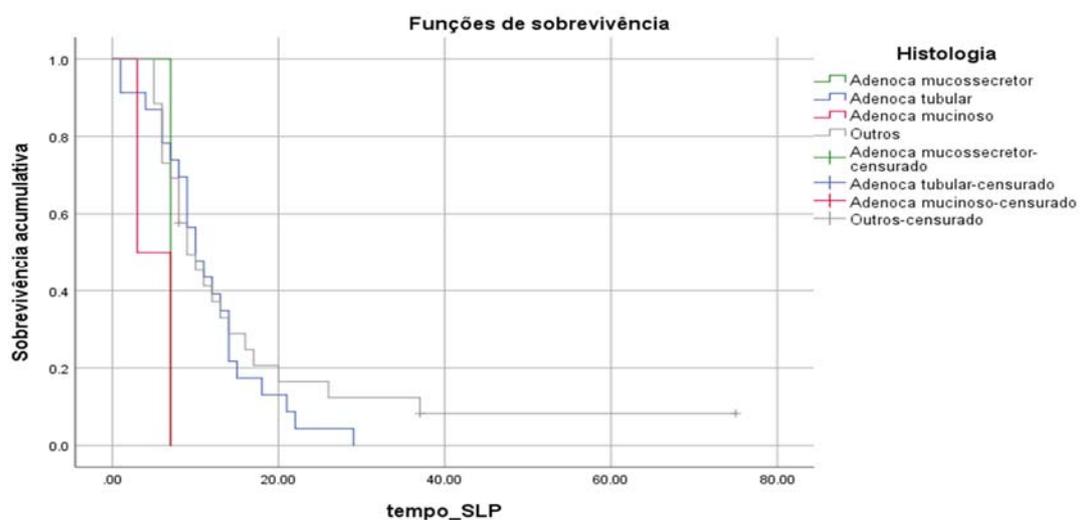
**Figura 28** - Sobrevida global (SG) conforme expressão de Integrina alfa2beta1. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank ( $\geq$ mediana x  $<$  mediana;  $p=0,013$ ).

### 5.2.10 Associação entre as características clínicas e patológicas com a Sobrevida Livre de Progressão (SLP)

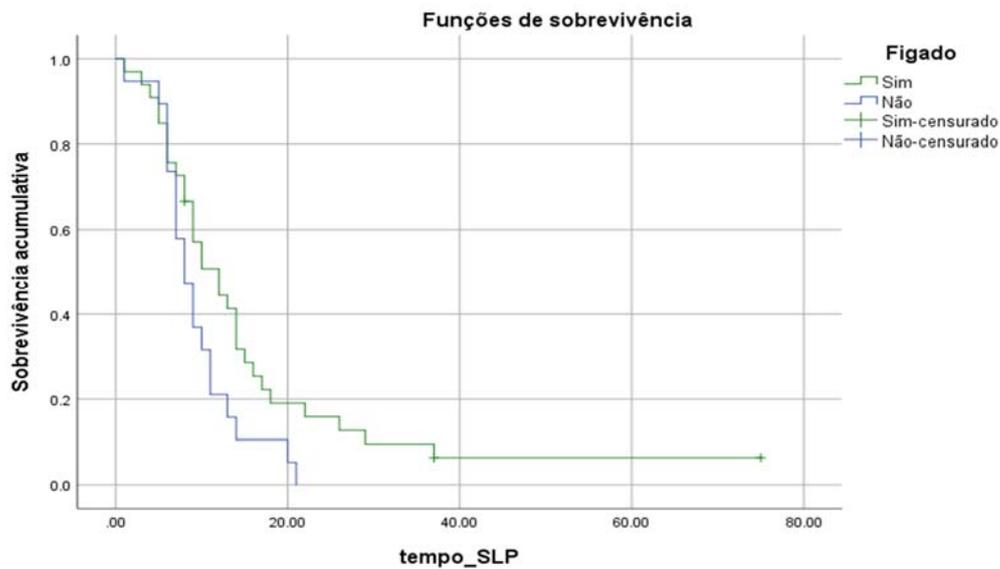
A SLP dos pacientes do estudo está representada na Figura 29 e apresenta uma mediana de sobrevida de 9 meses. Não houve diferença estatística entre pacientes do sexo masculino e feminino.



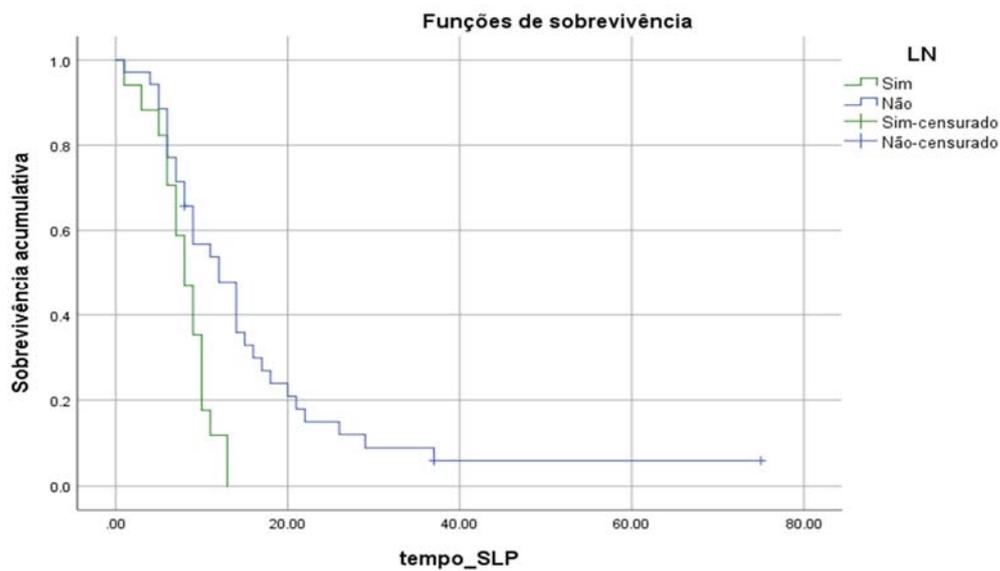
**Figura 29** - Sobrevida livre de progressão (SLP) em meses. A curva foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. Sobrevida mediana foi de 9 meses.



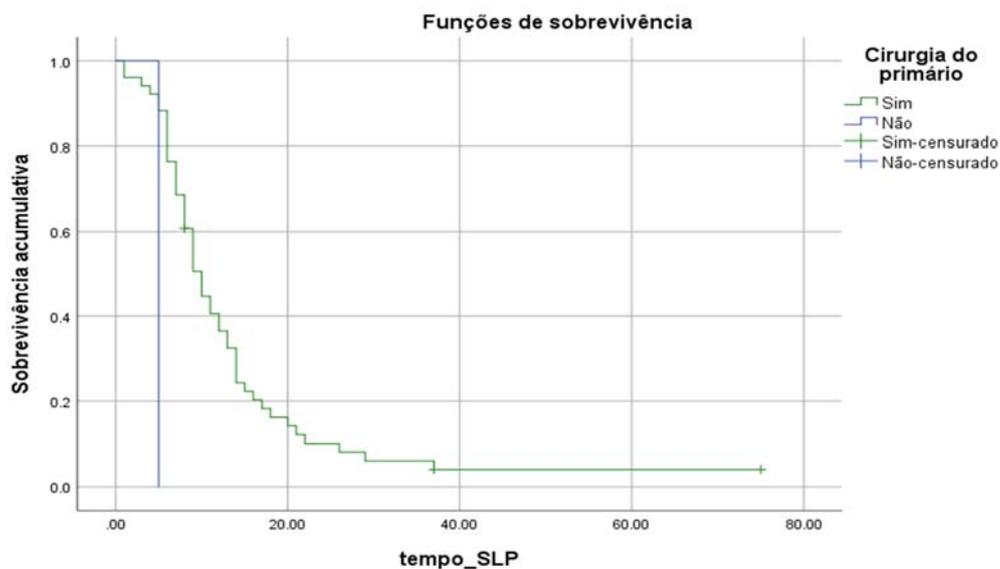
**Figura 30** - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme as características histológicas. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. (sim x não;  $p=0,049$ ).



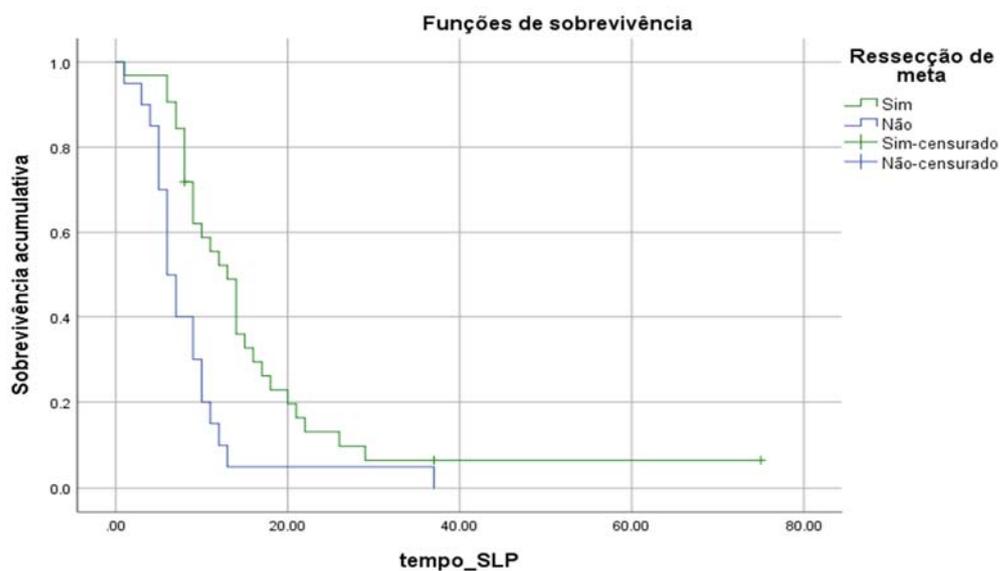
**Figura 31** - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme metástase em fígado. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (sim x não;  $p=0,044$ ).



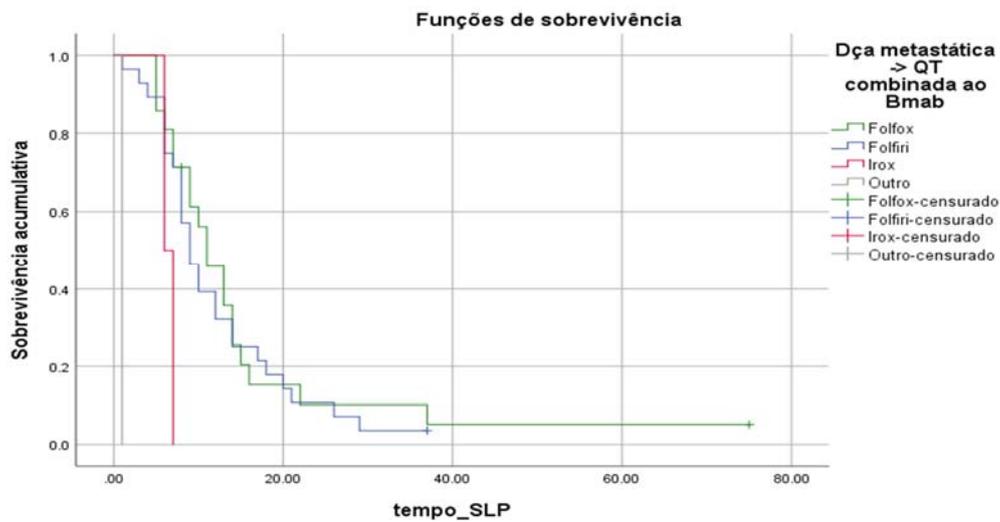
**Figura 32** - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme metástase linfonodal. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. (sim x não;  $p=0,002$ ).



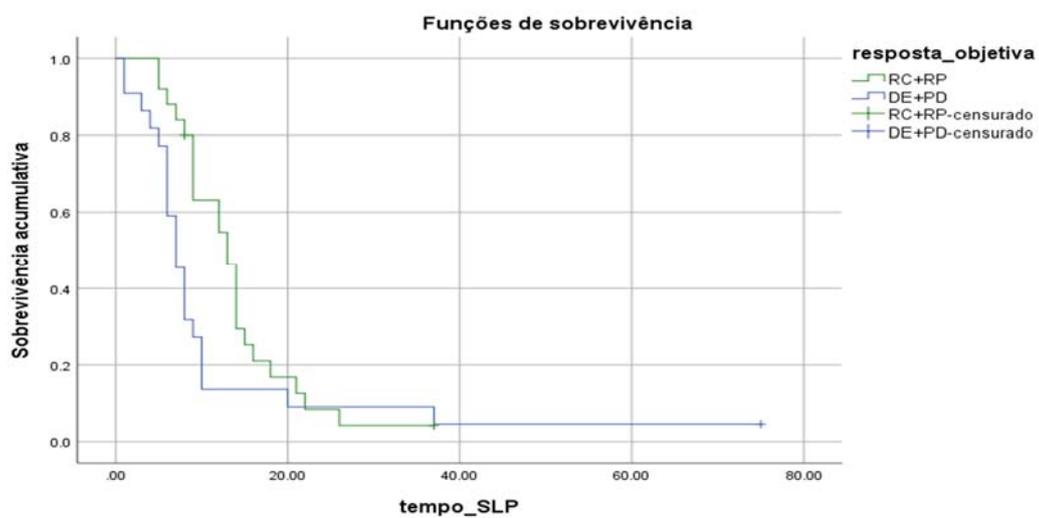
**Figura 33** - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme cirurgia do primário. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. (sim x não;  $p=0,02$ ).



**Figura 34** - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme metástase ressecção de metástase. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (sim x não;  $p=0,001$ ).



**Figura 35** - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme quimioterapia combinada ao bevacizumabe. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank. (sim x não;  $p < 0,001$ ).



**Figura 36** - Sobrevida livre de progressão (SLP) conforme o padrão de resposta. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log-rank (sim x não;  $p = 0,045$ ).

### 5.2.10 Associação entre os marcadores e a Sobrevida Livre de Progressão (SLP)

Não houve associação significativa dos marcadores angiogênicos com a SLP (dados não mostrados).

## 6 DISCUSSÃO

Um dos processos fundamentais e desafiadores da imuno-histoquímica, seja a convencional ou por fluorescência, é a recuperação antigênica, necessária de ser realizada, pois a utilização da formalina na fixação do tecido promove ligações múltiplas entre os grupos aminos dos diversos aminoácidos que compõem a proteína e a formação de pontes de metileno, levando ao bloqueio do acesso do anticorpo ao epítipo-alvo. Um método amplamente utilizado para a recuperação antigênica baseia-se na utilização de altas temperaturas, podendo ser realizada de diversas formas, banho maria, panela de pressão e micro-ondas, tendo como objetivo a exposição dos epítopos de interesse, conforme demonstrado através de ensaios bioquímicos por FRAENKEL-CONRAT et al. (1945) na década de 40, onde demonstraram que as interações entre o formaldeído e as proteínas podiam ser destruídas por aquecimento a altas temperaturas ou por tratamento em soluções alcalinas fortes.

Neste contexto o tempo e a temperatura são cruciais, pois temperaturas muito elevadas ou um tempo muito longo podem levar a desnaturação da proteína e assim “mascarar” ou danificar o antígeno. Por outro lado, temperaturas baixas ou um tempo muito curto podem não ser suficientes para a recuperação do antígeno e exposição do epítipo desejado.

Neste estudo padronizamos a metodologia de imunofluorescência multiplex em cortes parafinados, que permitirá o estudo de múltiplos marcadores simultaneamente em amostras tumorais. A metodologia utiliza reagentes de TSA

fluorescentes para a detecção de anticorpos primários, com redução de autofluorescência e sem reatividade cruzada de anticorpos (STACK et al. 2014).

Em nosso processo de padronização, iniciamos realizamos marcações por IHQ convencional e por fluorescência de apenas uma proteína para comparar o perfil de marcação e padronizar as etapas de recuperação antigênica, lavagens e diluição dos anticorpos. Em seguida realizamos ensaios multiplex em uma única lâmina de tecido, com a marcações simultâneas de três proteínas mais a contracoloração utilizando o DAPI (marcação nuclear). Ao avaliarmos as lâminas dos ensaios multiplex, observamos o mesmo padrão de expressão das proteínas identificado nas marcações individuais, com a vantagem de permitir a observação da coexpressão das proteínas no tecido analisado. Com os resultados considerados satisfatórios por nosso grupo, estabelecemos um fluxo de trabalho e padronizamos a metodologia. Só então partimos para a realização das marcações multiplex em lâminas de TMA, seguindo a rigor o protocolo que foi estabelecido. Com a aplicação do kit multiplex em lâminas de TMA podemos observar alguns benefícios em relação ao método de simples marcação, como a redução do número de cortes seriados, necessários para a investigação de diferentes biomarcadores, resultados também observados em estudos anteriores (MEZEY e TÓTH 2007).

A metodologia multiplex quando aplicada em lâminas de TMAs também se destaca por permitir uma diminuição na quantidade de reagentes utilizados como anticorpos primários, reagentes específicos do kit (fluoróforos). Em conformidade com o que já foi demonstrado por outros pesquisadores, outro ponto importante observado é contextualização espacial dos marcadores e avaliação da coexpressão celular individual na amostra. A caracterização dos tipos celulares e heterogeneidade

do microambiente histológico assim como o monitoramento de vias de sinalização celular também é um diferencial da técnica a ser explorado, uma vez que ocorre a preservação da arquitetura do tecido e das relações celulares (MORENO 2016).

Como se sabe, a angiogênese é regulada por várias vias de sinalização que interagem entre si e acabam dificultando a eficácia da terapia antiangiogênica (PILOTTO et al. 2014). Por este motivo, acredita-se que não apenas um biomarcador seja suficiente para comprovar a eficácia do tratamento com bevacizumabe e selecionar os pacientes que seriam beneficiados com a terapia antiangiogênica, mas a combinação de diferentes biomarcadores envolvidos no processo de sinalização poderiam trazer informações relevantes para uma conduta terapêutica mais eficaz.

A possibilidade de combinar marcadores e montar painéis para diferentes alvos também oferece oportunidades para análise através de imagem digital combinada à softwares para quantificação de biomarcadores em lâminas de TMA (HUANG et al. 2013), mas também no desenvolvimento de protocolos envolvendo mais de um biomarcador, que combinados podem contribuir para a identificação de pacientes que poderiam se beneficiar do tratamento antiangiogênico.

Conforme os trabalhos realizados por GIANTONIO et al. em 2007 e SALTZ et al. em 2008, estudos de fase III demonstraram o benefício de se associar o bevacizumabe à quimioterapia de primeira ou segunda linha em pacientes com câncer colorretal metastático. Devido ao fato destes benefícios não serem evidenciados em todos os pacientes, a identificação de um biomarcador que demonstre a eficácia do tratamento, poderá auxiliar o clínico na tomada de decisões em relação a uma conduta terapêutica mais assertiva com redução a exposição a um tratamento potencialmente tóxico de indivíduos onde a terapia antiangiogênica não seria eficaz. Tendo em vista a

complexidade do processo de angiogênese e dos resultados heterogêneos das pesquisas realizadas até o momento, é pouco provável que apenas um biomarcador seja suficiente para selecionar os pacientes que deverão ser tratados com bevacizumabe, uma vez que não existe nenhum biomarcador aprovado para uso na prática clínica utilizado para selecionar pacientes que se beneficiariam com o uso do bevacizumabe (GIANTONIO et al. 2007; SALTZ et al. 2008). Nós realizamos um estudo retrospectivo em uma coorte de pacientes com câncer colorretal metastático tratados com quimioterapia baseada em 5-FU infusional associado à oxaliplatina, ou irinotecano, e bevacizumabe. O objetivo foi avaliar a eficácia desse tratamento e tentar associá-lo com características clínicas e com a expressão de proteínas envolvidas na angiogênese utilizando técnica de imunofluorescência multiplex.

Em nosso estudo observamos que o marcador CD31 associou-se com Integrina  $\alpha 2\beta 1$ , Noct1, Ki67 e PlGF, e não se associou com VEGFR2, nem DLL4. A integrina  $\alpha 2\beta 1$  associou-se somente ao CD31. Notch1 associou-se com o CD31 e PlGF. VEGFR2 esteve associado apenas ao Ki67 e PlGF. Já o ligante DLL4 não se associou a nenhum outro marcador estudado. O Ki67 associou-se ao CD31, VEGFR2 e ao PlGF. O PlGF associou-se ao CD31, Notch1 VEGFR2 e Ki67.

Em relação a resposta objetiva, não houve uma correlação com a expressão dos marcadores estudados corroborando o que foi apresentado anteriormente por nosso grupo (PAIVA et al. 2015).

Em nosso estudo o uso de bevacizumabe esteve associado com expressão abaixo da mediana em 76,9% (n=10) dos casos marcados com CD31 e 76,9% (n=10) dos casos marcados com o VEGFR2. A baixa expressão do CD31 era algo esperado em nosso trabalho, uma vez que este é um importante marcador de células endoteliais

e a utilização do bevacizumabe promove a diminuição do VEGFA circulante, reduzindo a ligação deste ao VEGFR2, levando a redução da ativação das vias intracelulares envolvida na formação de novos vasos (REINACHER-SCHICK et al. 2008). Em estudos NO16966 e MAX utilizando imuno-histoquímica convencional em pacientes com câncer colorretal tratados com bevacizumabe não encontraram correlação com a expressão de VEGFR2 (STRICKLER e HURWITZ 2012).

Conforme sugerido por VASUDEV e REYNOLDS (2014), diferentes mecanismos podem estar relacionados a resistência a resposta antiangiogênica: 1) heterogeneidade dos vasos sanguíneos; 2) vias de sinalização alternativas; 3) infiltração de células mielóide imaturas ou fibroblastos nos tumores; 4) ativação de HIF; 5) associação aos vasos pré-existentes do tecido normal. Tais mecanismos podem estar relacionados com a dificuldade de se encontrar um padrão na expressão dos marcadores estudados.

Em trabalho realizado por AEJAZ et al. (2016), ficou demonstrado a heterogeneidade da expressão dos marcadores VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 em lâminas de TMA de pacientes com câncer de colorretal. Neste estudo foi realizado uma avaliação comparativa entre os três VEGFRs nos tecidos primários de arquivo de CRC (n = 84). Cada caso foi definido como negativo para VEGFR1 / VEGFR2 / VEGFR3, baixo, médio ou alto. Com base na expressão diferencial dos três VEGFRs, foram observados oito perfis de coloração: VEGFR triplo positivo (n = 12 14%), VEGFR1 predominante (n = 17 20%), VEGFR2 predominante (n = 7, 8 %), VEGFR3 predominante (n = 1 1%), VEGFR1 / 2 predominante (n = 39, 46%), VEGFR1 / 3 predominante (n = 2 2%), VEGFR2 / 3 predominante (n = 3, 4 %) e triplo negativo para VEGFR (n = 3, 4%). Estes estudos demonstraram a variação nos padrões de

expressão de VEGFR2 encontrados na literatura em pacientes com câncer de colorretal podendo explicar as variações de expressão de VEGFR2 observados em nosso trabalho.

Valores de Notch1 abaixo da mediana estiveram associados com o subtipo histológico adenocarcinoma tubular e desenvolvimento de Hipertensão Arterial (HAS), já valores de Notch1 acima da mediana estiveram associados a metástase em peritônio. Valores de DLL4 abaixo da mediana estiveram associados com presença de metástase em fígado. Em estudos realizados utilizando modelos de camundogons transgênicos que apresentavam superexpressão de DLL4 em células endoteliais de vários tipos de tumores sólidos, foi demonstrado, após o acompanhamento do tempo de crescimento e da histopatologia vascular, que alta expressão de DLL4/Notch1 no tecido tumoral pode ser benéfico ao tratamento reduzindo o tamanho do tumor primário, melhorando a administração de drogas tumorais e reduzindo os eventos metastáticos (TRINDADE et al. 2017). Valores de VEGFR2 abaixo da mediana estiveram associados a pacientes do sexo masculino. A expressão de Ki67 abaixo da mediana esteve associada com ter feito Rxt neoadjuvante, com doença loco-regional, com ter recebido quimioterapia neoadjuvante e quimioterapia adjuvante. PlGF acima da mediana esteve associado a doença loco-regional e com não ter doença detectável pré-bevacizumabe.

A respeito das limitações observadas em nosso trabalho, parte delas estão relacionadas a estudos retrospectivos, visto que as informações clínicas e resultados de exames de imagem foram coletados dos prontuários. Na tentativa de atenuar o impacto dos tratamentos posteriores, visto que os pacientes receberam tratamento em

diversas linhas, fizemos uma análise apenas com os pacientes tratados em primeira linha.

A maior parte do material patológico utilizado foi proveniente do tumor primário sempre quando disponível e nem sempre correspondendo ao momento onde iniciou-se o tratamento com o bevacizumabe.

Em relação a metodologia utilizada, a utilização da microscopia confocal para aquisição das imagens mostrou-se limitada quando comparada aos métodos de obtenção de imagens através de sistemas automatizados (VECTRA e Mantra) recomendados pelos fabricantes do kit Opal. A avaliação precisa das marcações realizadas por fluorescência só é possível quando feita através da imagem adquirida por microscopia de fluorescência, e este processo para aquisição das imagens dos spots de TMA foi realizado de maneira individual, o que tornou o processo lento e menos prático quando comparado a IHQ convencional, onde a análise é realizada pelo patologista em microscopia óptica convencional. Outro ponto que devemos levar em consideração está relacionado a reação de imuno-histoquímica, uma vez que a qualidade da reação depende muito da boa qualidade da fixação, processamento do tecido, escolha dos anticorpos primários e do sistema de visualização (SMITH et al. 2010). Neste estudo utilizamos anticorpos padronizados anteriormente em estudo realizado por nosso grupo (PAIVA et al. 2015) para minimizar efeitos adversos nas reações, como por exemplo reações cruzadas com outras proteínas que não as de interesse.

Esperamos que os resultados obtidos nesta análise auxiliem no melhor entendimento da interação entre proteínas associadas com a promoção e regulação da

angiogênese e à resposta e eficácia do tratamento com terapia antiangiogênica, notadamente à terapia com bevacizumabe.

Para perspectivas futuras, pretende-se realizar novas análises estatísticas fazendo combinações com os marcadores estudados.

## 7 CONCLUSÃO

A técnica de imunofluorescência foi padronizada com sucesso em amostras de pacientes de coloproctal metastático e demonstrou que esta deve ser uma importante ferramenta no estudo comparativo das expressões de biomarcadores e alvos de interesse em diferentes estudos em que se deseja avaliar a co-expressão de marcadores.

Os nossos resultados mostraram que houve associação entre o CD31 com Alfa2Beta1, Notch1, Ki67 e PIGF. Alfa2Beta1 apresentou associação com somente com o CD31. Notch1 esteve associado ao CD31 e PIGF. O VEGFR2 associou-se apenas ao Ki67 e PIGF. O DLL4 não se associou a nenhum outro marcador estudado. O Ki67 associou-se ao CD31, VEGFR2 e ao PIGF. O PIGF associou-se ao CD31, Notch1 VEGFR2 e Ki67.

A expressão de CD31 e VEGFR2 esteve associada ao uso de bevacizumabe. Valores de Notch1 abaixo da mediana estiveram associados com o subtipo histológico adenocarcinoma tubular e desenvolvimento de Hipertensão Arterial (HAS) e metástase em peritônio. Valores de DLL4 estiveram associados com presença de metástase em fígado.

Valores de VEGFR2 abaixo da mediana estiveram associados a pacientes do sexo masculino. PIGF esteve associado a doença loco-regional e com não ter doença detectável pré-bevacizumabe.

Não foi observado associação significativa dos marcadores angiogênicos com a SLP.

Nos últimos anos, foram realizadas melhorias significativas no tratamento do câncer de colorretal com terapias antiangiogênicas, muitas das quais se concentraram na inibição da via do fator de crescimento endotelial vascular / receptor VEGFR (VEGF / VEGFR). No entanto, o resultado destes tratamentos não tem sido tão eficaz quanto se esperava inicialmente. Com base nos estudos recentes acerca de angiogênese tumoral, ficou evidente que existem muitas vias de sinalização compensatórias que podem superar a inibição da angiogênese tumoral direcionada ao VEGF / VEGFR e podem contribuir para a progressão do tumor. Portanto, o refinamento da eficácia de terapias antiangiogênicas exigirá, por um lado, uma abordagem mais focada e racionalizada na busca por biomarcadores preditivos e, por outro lado, uma abordagem terapêutica mais ampla usando estratégias terapêuticas combinadas ou agentes antiangiogênicos com múltiplos alvos, com base em nos diversos perfis patológicos moleculares e de vários tipos e subtipos de câncer humano.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aejaz N, Leslie R, Drew MN, et al. Heterogeneity of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, 3 in primary human colorectal carcinoma. **Anticancer Res** 2016; 36:2683-96.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2010. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular; p.1169-78.

Baeten CI, Hillen F, Pauwels P, de Bruine AP, Baeten CG. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. **Dis Colon Rectum** 2009; 52:2028-35.

Ciombor KK, Berlin J, Chan E. Aflibercept. **Clin Cancer Res** 2013; 19:1920-5.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). **Eur J Cancer** 2009; 45:228-47.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med** 2003; 9:669-76.

Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? **Nat Rev Cancer** 2008; 8:942-56.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N Engl J Med** 1971; 285:1182-6.

Fraenkel-Conrat H, Cooper M, Olcott HS. The reaction of Formaldehyde with proteins. **J Am Chem Soc** 1945; 67:950-4.

Fu G, Wang W, Luo BH. Overview: structural biology of integrins. **Methods Mol Biol** 2012; 757:81-99.

Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. **J Clin Oncol** 2007; 25:1539-44.

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

Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol** 2005; 23:1011-27.

Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, et al. Safety and efficacy of oxaliplatin/ fluoropyrimidine regimens with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): final analysis of the TREE-Study. **J Clin Oncol** 2008; 26:3523-9.

Huang W, Hennrick K, Drew S. A colorful future of quantitative pathology: validation of Vectra technology using chromogenic multiplexed immunohistochemistry and prostate tissue microarrays. **Hum Pathol** 2013; 44:29-38.

Kabbinavar FF, Hambleton J, Mass RD, et al. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:3706-12.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. **N Engl J Med** 2008; 358:2039-49.

Kwon D. **Cooking up cancer?** April 1, 2017. Available from: <URL:<https://bit.ly/2TJji04>> [2019 set 12].

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science** 1989; 246:1306-9.

Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, et al. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans affairs cooperative study group 380. **N Engl J Med** 2000; 343:162-8.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A. **Biologia celular e molecular**. 7<sup>th</sup> ed. São Paulo: ArtMed; 2014. p.1120.

Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. **Int J Mol Epidemiol Genet** 2016; 3:105-14.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. **Am J Pathol** 1999; 155:739-52.

Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. **N Engl J Med** 2005; 352:476-87.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2018 incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Moreno LC. **Caracterização das técnicas de imuno-histoquímica (IHC)**. Lab Network; 2016. Disponível em: <URL:<https://bit.ly/2tDn7cz>> [2019 jun12].

Nelson LD, Cox MM. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7<sup>th</sup> ed. São Paulo: ArtMed; 2019. Porque Pitágoras não comia fafel: deficiência da glicose-6-fosfato-desidrogenase; p.566-70.

Niland S, Eble JA. Integrin-mediated cell-matrix interaction in physiological and pathological blood vessel formation. **J Oncol** 2012; 2012:125278.

Paiva TF Jr, de Jesus VH, Marques RA, et al. Angiogenesis-related protein expression in bevacizumab-treated metastatic colorectal cancer: NOTCH1 detrimental to overall survival. **BMC Cancer** 2015; 15:643.

Pilotto S, Bonomi M, Massari F, et al. Anti-angiogenic drugs and bio- markers in non-small-cell lung cancer: a ‘hard days night’. **Curr Pharm Des** 2014; 20:3958-72.

Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ, et al. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:338-51.

Reinacher-Schick A, Pohl M, Schmiegel W. Drug insight: antiangiogenic therapies for gastrointestinal cancers--focus on monoclonal antibodies. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol** 2008; 5:250-67.

Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. **J Clin Oncol** 2008; 26:2013-9.

Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. **Biochem Pharmacol** 2002; 64:993-8.

Smith NR, Baker D, James NH, et al. Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. **Clin Cancer Res** 2010; 16:3548-61.

Solowiej A, Biswas P, Graesser D, Madri JA. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. **Am J Pathol** 2003; 162:953-62.

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.

Strickler JH, Hurwitz HI. Bevacizumab-based therapies in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **Oncologist** 2012; 17:513-24.

Suman S, Das TP, Ankem MK, Damodaran C. Targeting notch signaling in colorectal cancer. **Curr Colorectal Cancer Rep** 2014; 10:411-6.

Sung CY, Son MW, Ahn TS, et al. Expression of placenta growth factor in colorectal carcinomas. **J Korean Soc Coloproctol** 2012; 28:315-20.

Sung JJ, Lau JY, Goh KL, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening. **Lancet Oncol** 2005; 6:871-6.

Trindade A, Djokovic D, Gigante J, Mendonça L, Duarte A. Endothelial Dll4 overexpression reduces vascular response and inhibits tumor growth and metastasization in vivo. **BMC Cancer** 2017; 17:189.

U.S. Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer. In: **Guide to Clinical Preventive Services: Report of the U.S. Preventive Services Task Force**. 2<sup>nd</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. p.89-103.

Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis** 2014; 17:471-94.

Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin  $\alpha 9\beta 1$ . **J Biol Chem** 2005; 280:4544-52.

Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, et al. Integrin  $\alpha 9\beta 1$  directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis. **J Biol Chem** 2007; 282:15187-96.

Wei SC, Tsao PN, Yu SC, et al. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. **Gut** 2005; 54:666-72.

Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41:353-64.

Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2007; 27:2514-23.

Yao J, Wu X, Zhuang G et al. Expression of a functional VEGFR-1 in tumor cells is a major determinant of anti-PlGF antibodies efficacy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:11590-5.

## 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 **23/01/2018**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **10/10/2017**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2437/17** intitulado: "**Expressão de proteínas envolvidas em neoangiogênese em tumores colorretais metastáticos através de técnica de imunofluorescência multiplex.**"

**Pesquisador responsável: Tiago Góss dos Santos.**

**Aluno: Leandro Spinelli (Mestrado)**

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

São Paulo, 30 de janeiro de 2018.

Atenciosamente,

**Dra. Sandra Caires Serrano**

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