

ÍSYS DE ARAUJO OLIVEIRA

ANÁLISE CITOLÓGICA A PARTIR DE BIÓPSIA LÍQUIDA DE CÂNCER DE MAMA

BRASÍLIA

2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ÍSYS DE ARAUJO OLIVEIRA

ANÁLISE CITOLÓGICA A PARTIR DE BIÓPSIA LÍQUIDA DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro

Coorientadora: Profa. Dra. Andréa Barretto Motoyama

BRASÍLIA

2021

ÍISIS DE ARAUJO OLIVEIRA

ANÁLISE CITOLÓGICA A PARTIR DE BIÓPSIA LÍQUIDA DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro (Presidente)
Universidade de Brasília - UnB

Profa. Dra. Rosângela Vieira de Andrade
Universidade Católica de Brasília - UCB

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa
Universidade de Brasília- UnB

Profa. Dra. Leonora Maciel de Souza Vianna (Suplente)
Universidade de Brasília- UnB

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer à Deus por sempre guiar os meus caminhos, por todas as bênçãos recebidas e me fortalecer para que eu conseguisse finalizar esse desafio. Sem Ele, eu nada poderia ter realizado.

Minha família, principalmente meus pais, João Carlos e Marisete, por todo amor e suporte para que eu sempre corra atrás dos meus sonhos. Sem o apoio de vocês, eu não teria chegado até aqui.

Quero também agradecer às minhas orientadoras, Fabiana Pirani Carneiro e Andréa Barretto Motoyama, pela oportunidade, por me ensinarem tanto e acreditarem sempre no meu potencial. Vocês contribuíram extremamente para a mulher e profissional que eu me tornei.

Agradeço a colaboração e auxílio da equipe de Mastologia do HuB, principalmente à Profa. Dra. Maria de Fátima Vogt, e das agências de fomento: CAPES, FAPDF e FUB (UnB).

Agradeço a Tércia, que foi muito mais do que uma técnica de laboratório, mas uma grande amiga, me ajudando tanto nos experimentos quanto na vida.

Agradeço aos meus amigos, Ana Júlia, Alan, Camila, Carol, De Campos, Fábio, Gabriel, Laryssa, Letícia, Lucas, Luma, Mari, Nathália, Rayane, Victor, Vick, que sempre estiveram ao meu lado ouvindo minhas lamúrias e comemorando minhas vitórias comigo.

Diego, meu amor, que sonha comigo e me motiva a ser melhor todos os dias. Obrigada por fazer a diferença na minha vida e toda cumplicidade, não teria conseguido sem você!

Obrigada por ajudarem a realizar o meu sonho e motivar minhas conquistas.

RESUMO

Introdução. O câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo e é o que tem maior número bruto de novos casos em mulheres. No monitoramento do tratamento ou de possíveis recidivas, a biópsia líquida representa uma alternativa simples e menos invasiva às biópsias de tecido. A biópsia líquida permite detectar células cancerosas que entram na corrente sanguínea conhecidas como Células Tumorais Circulantes (CTCs), que exibem alterações moleculares dinâmicas e possuem informações úteis sobre a composição tumoral, capacidade de invasão, suscetibilidade a medicamentos e resistência à terapia. Nos últimos anos, tem havido grande interesse em tecnologias inovadoras, sensíveis e eficientes para detectar e caracterizar CTCs. **Objetivo.** O objetivo desse estudo foi avaliar a aplicabilidade da citologia e imunocitoquímica para identificação de células de câncer de mama de linhagem e de pacientes em amostras de sangue periférico preparadas por duas técnicas citológicas. **Métodos.** Amostras de sangue de doadores saudáveis enriquecidas com diferentes diluições de células da linhagem humana de câncer de mama MCF-7 e amostras de sangue de pacientes com câncer de mama foram preparadas pelas técnicas de citocentrifugação e *cell-block* e submetidas a Imunocitoquímica, utilizando os marcadores PanCK, EpCAM e GATA-3. **Resultados.** A taxa de recuperação de células MCF-7 variou de 0 a 66% para a citocentrifugação e de 0 a 73,56% para o *cell-block*. As taxas de recuperação foram maiores na maior concentração utilizada (1.000 células/mL) tanto para a citocentrifugação quanto para o *cell-block*, sendo as médias das taxas de recuperação 58,05% e 58,19%, respectivamente. Quanto às características clínicas das pacientes com câncer de mama, a idade média foi de 53 anos. O carcinoma invasivo, o tipo histológico ductal, o grau II e o estágio T2 estavam presentes em 79,73%, 79,66%, 40,68% e 44,07% das pacientes, respectivamente. Invasão vascular foi encontrada em apenas 11 (18,64%) dos espécimes cirúrgicos. As metástases linfonodal e à distância foram observadas em 57,62% e 6,78% das pacientes. Das pacientes, 25,42% estavam iniciando sua primeira linha de terapia. Não foi possível gerar dados de quantificação de CTCs nas amostras de biópsia líquida de pacientes, sendo encontradas células suspeitas para câncer de mama em apenas uma amostra. **Conclusão.** Através citologia e imunocitoquímica de amostras de sangue periférico preparadas por

citocentrifugação e *cell-block* obteve-se resultados satisfatórios para a recuperação de células de linhagem de câncer de mama, independentemente da técnica de preparo utilizada. A citocentrifugação e o *cell-block*, apesar de suas limitações, demonstraram serem técnicas potencialmente viáveis para sua aplicação na avaliação do sangue de pacientes com câncer metastático.

Palavras-chave: Câncer; Células Tumorais Circulantes; Metástase; Biópsia líquida; Citologia; Imunocitoquímica; PanCK; EpCAM; GATA-3.

ABSTRACT

Introduction. Breast cancer is the second most incident in the world and presents the highest gross number of new cases in women. For monitoring response to treatment and possible recurrences, liquid biopsy represents a simple and less invasive alternative to tissue biopsies. Liquid biopsy allows detecting cancer cells that enter the bloodstream are labeled Circulating Tumor Cells (CTCs), which exhibit dynamic molecular changes and possess useful information about tumor composition, invasiveness, drug susceptibility, and resistance to therapy. In recent years, there has been interest in innovative, sensitive, and efficient technologies to detect and characterize CTCs. **Objective.** The aim of this study was to evaluate the applicability of cytology and immunocytochemistry to identify lineage and patients breast cancer cells in peripheral blood samples by two cytological techniques. **Methods.** Blood from healthy donors enriched with different dilutions of MCF-7 human mammary cancer cells and blood from patients with breast cancer were subjected to cytopspin and cell-block techniques and then immunocytochemistry was performed with PanCK, EpCAM and GATA-3. **Results.** The recovery rate of MCF-7 cells ranged from 0 to 66% for cytopspin and from 0 to 73.56% for cell-block. Recovery rates were higher at the highest concentration (1,000 cells/mL) for both cytopspin and cell-block, with mean recovery rates of 58.05% and 58.19%, respectively. The mean age of patients was 53 years. Invasive carcinoma, ductal histological type, grade II and T2 stage was present in 79.73%, 79.66%, 40.68% and 44.07% of patients, respectively. Vascular invasion was found in only 11 (18,64%) of the surgical samples. Lymph node and distant metastasis were found in 57.62% and 6.78% of patients. Of the patients, 25,42% had not been exposed to any previous therapy. It was not possible to generate data on the quantification of CTCs in patients' samples; in only one case possible positive cells were found. **Conclusion.** Satisfactory results of lineage cells recovery were obtained from cytology and immunocytochemistry of peripheral blood samples subject to cytopspin and cell-block, regardless of the preparation technique used. Cyto centrifugation and cell-block, despite their limitations, they may potentially be viable for their application in the evaluation of blood from metastatic patients.

Keywords: Cancer; Circulating Tumor Cells; Metastasis; Liquid biopsy, Cytology; Immunocytochemistry; PanCK; EpCAM; GATA-3.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica.....	29
Tabela 2 – Recuperação e taxa de recuperação das células MCF-7 adicionadas a sangue de doadores saudáveis para as técnicas de citocentrifugação e <i>cell-block</i>	34
Tabela 3 – Informações sobre idade e faixa de idade de maior prevalência das pacientes com câncer de mama.....	36
Tabela 4 – Diagnóstico patológico das lesões das mamas das pacientes.....	36
Tabela 5 – Tipos histológicos dos tumores das pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	36
Tabela 6 - Grau de diferenciação dos tumores das pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	37
Tabela 7 – Classificação do tamanho dos tumores das pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	37
Tabela 8 – Classificação do comprometimento dos linfonodos regionais das pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	37
Tabela 9 – Classificação quanto a presença de metástases à distância nas pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	38
Tabela 10 – Expressão dos marcadores de receptor de estrogênio (RE) nas pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	38
Tabela 11 - Expressão dos marcadores de receptor de progesterona (PR) nas pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	38
Tabela 12 - Expressão do índice de proliferação celular medido por Ki-67 nas pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	39

Tabela 13 – Expressão dos marcadores de HER2 nas pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	39
Tabela 14 – Invasão vascular nas pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	39
Tabela 15 – Invasão perineural nas pacientes com carcinoma invasivo de mama.....	39
Tabela 16 – Tipo de cirurgia realizada nas pacientes para o diagnóstico de câncer de mama.....	40
Tabela 17 – Momento das coletas das amostras de sangue das pacientes com carcinoma invasivo em relação ao início da terapia.....	40
Tabela 18 – Tipo de terapias empregadas no tratamento das pacientes com câncer de mama.....	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma da metodologia realizada.....30
- Figura 2.** Imunocitoquímica para PanCK 100X. Citocentrifugado do sangue com células da linhagem MCF-7 positivas (coradas em marrom, na seta), em diferentes concentrações celulares: 1000 células/mL (A), 100 células/mL (B) e 10 células/mL (C)..... 32
- Figura 3.** Imunocitoquímica para PanCK 10X. Controle positivo: corte histológico de pele com expressão na epiderme (A). Cell-block do sangue com células (setas) da linhagem MCF-7, em diferentes concentrações celulares: 1000 células/mL (B), 100 células/mL (C) e 10 células/mL (D).....33
- Figura 4.** Corte de cell-block de sangue com células (seta) de linhagem MCF-7 (20X, HE).....35
- Figura 5.** Imunocitoquímica para PanCK (A e B) e coloração HE (C) 400X em amostra de sangue de paciente. Células escamosas (escamas córneas) contaminantes e positivas (coradas em marrom e rosa, na seta), no citocentrifugado (A), no cell-block (B) e no HE (C).....41
- Figura 6.** Imunocitoquímica (400X), estruturas fúngicas contaminantes (coradas em marrom) em amostra de sangue de paciente. A, PanCK, no citocentrifugado. B, C e D, PanCK, EpCAM e GATA-3, respectivamente, no cell-block.....42
- Figura 7.** Imunocitoquímica em amostra de sangue de paciente (40X), leucócitos com marcação inespecífica (corados em marrom, na seta), para PanCK, EpCAM e GATA-3 (A, B, e C, respectivamente).....43
- Figura 8.** Amostras de sangue da paciente 63. Coloração HE em um corte de cell-block sem células suspeitas morfológicamente para carcinoma (A). Células suspeitas para células tumorais circulantes (nas setas) em B, C e D. Imunocitoquímica de amostra preparada por citocentrifugação com marcação para EpCAM (B). Imunocitoquímica em amostra do cell-block com marcação para PanCK (C) e GATA-3 (D). Aumento de 20X.....45

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CTs	Células Tumorais
CTCs	Células Tumorais Circulantes
CK5/6	Citoqueratina 5/6
DAB	Diaminobenzidina
DF	Distrito Federal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EPCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
HE	Hematoxilina- Eosina
HUB	Hospital Universitário de Brasília
INCA	Instituto Nacional do Câncer
PanCK	Pan Citoqueratina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
ER	Receptor de estrogênio
HER2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
PR	Receptor de progesterona
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UNACON	Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	CÂNCER DE MAMA E SUAS ESTIMATIVAS	14
1.2	CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA.....	14
1.2.1	Classificação histológica.....	14
1.2.2	Classificação do grau	15
1.2.3	Classificação molecular	16
1.2.4	Estadiamento TNM.....	18
1.3	DIAGNÓSTICO.....	19
1.4	BIÓPSIA LÍQUIDA.....	20
1.5	CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES	20
2.	JUSTIFICATIVA.....	23
3.	OBJETIVOS.....	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4.	METODOLOGIA.....	25
4.1	CULTURA DE CÉLULAS E ENRIQUECIMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	25
4.2	AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES	25
4.3	HEMÓLISE DO SANGUE.....	26
4.4	CITOCENTRIFUGAÇÃO	26
4.5	COLORAÇÃO PAPANICOLAOU.....	26
4.6	CELL-BLOCK PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA.....	27
4.7	COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA	28
4.8	IMUNOCITOQUÍMICA.....	28
5.	RESULTADOS	31
5.1	ANÁLISE DA TAXA DE RECUPERAÇÃO EM AMOSTRAS DE SANGUE ENRIQUECIDAS COM CÉLULAS DE LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO E O CELL-BLOCK.....	31
5.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA	35
5.3.1	Contaminantes das amostras de pacientes.....	41
5.3.2	Células com marcação inespecífica	42

5.3.3 Achados citopatológicos suspeitos de Células Tumorais Circulantes no sangue de paciente com câncer de mama	44
6. DISCUSSÃO.....	46
6.1 AMOSTRAS DE SANGUE COM LINHAGEM CELULAR	46
6.2 AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA .	49
7. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
APÊNDICES	69
ANEXOS.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA E SUAS ESTIMATIVAS

O câncer é um importante problema de saúde pública, a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018 (OMS, 2018). Estima-se que essa doença se tornará a principal causa de morte e a barreira mais importante para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo no século XXI (BRAY et al., 2018).

Dentre os tipos de tumores, o câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo e é o que tem maior número bruto de novos casos em mulheres (BRAY et al., 2018). De fato, para o Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para cada ano do triênio 2020-2022 apontam que ocorrerão 66 mil novos casos de câncer de mama, correspondendo a aproximadamente 30% de todos os cânceres em mulheres, e estimou-se que no Distrito Federal seriam diagnosticados, aproximadamente, 730 novos casos em 2020 (BRASIL, 2019).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama abrange um heterogêneo grupo de tumores com diferentes características morfológicas, fenotípicas, moleculares e de respostas ao tratamento (KALINOWSKI et al., 2019; TSANG, TSE, 2020), que podem, portanto, receber classificações com base nelas.

1.2.1 Classificação histológica

Histologicamente, o câncer de mama pode ser classificado de acordo com o padrão de crescimento patológico, sendo dividido em carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo, os quais, posteriormente, podem ser classificados em carcinomas ductais e lobulares com base na localização de origem do tumor (CURTIS, 2012; MAKKI, 2015; MASSIHNIA et al., 2016; TSANG, TSE, 2020).

O carcinoma *in situ* refere-se a um carcinoma inicial, que por definição não ultrapassa a membrana basal e, portanto, não tem potencial metastático. Ele é limitado pela presença de uma barreira natural, a camada de células mioepiteliais em torno da proliferação neoplásica (CSERNI, 2020).

O carcinoma invasivo se refere à proliferação anormal maligna de células neoplásicas no tecido mamário, que conseguem invadir o estroma (MAKKI, 2015). Existem mais de 20 tipos histológicos diferentes de cânceres de mama invasivo. O mais comum é o carcinoma ductal invasivo, do tipo não especial, que representa cerca de 70% a 80% de todos os cânceres invasivos, seguido por carcinomas lobulares invasivos, que representam cerca de 10% de todos os cânceres invasivos. O restante são os tipos histológicos menos comuns, como carcinomas tubulares, cribriformes, mucinosos, micropapilares, papilares, medulares, metaplásicos, apócrinos e outros (LAKHANI, 2012; TSANG, TSE, 2020).

1.2.2 Classificação do grau

A classificação do grau engloba a avaliação microscópica da diferenciação histológica de três características tumorais: a formação de túbulos como uma expressão da diferenciação glandular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Um sistema de pontuação numérica de um a três é usado para garantir que cada fator seja avaliado de forma independente (LAKHANI, 2012).

A formação de túbulos é avaliada em todo o tumor, observando se os túbulos e ácinos glandulares exibem um lúmen central circundado por células neoplásicas polarizadas ou se apresentam alterações desta estrutura chegando a se apresentarem como cordões celulares. O pleomorfismo nuclear é analisado nas áreas de maior alteração levando-se em consideração a regularidade do tamanho, a distribuição da cromatina, a presença e o número de nucléolos e a orientação dos núcleos. Já o índice mitótico é realizado para a área que apresenta maior proliferação através da avaliação de figuras mitóticas definidas (LAKHANI, 2012).

São atribuídas notas para cada uma das três características e os valores são somados para produzir notas de três a nove. O grau é, então, atribuído da seguinte forma: 3-5 pontos é grau 1, bem diferenciado; 6-7 pontos é grau 2, moderadamente diferenciado; 8-9 pontos é grau 3, pouco diferenciado (LAKHANI, 2012).

A classificação do grau é um fator de prognóstico poderoso e deve ser incluído como um componente do conjunto de dados mínimos para relatos histológicos de

câncer de mama, além de ser um componente chave na tomada decisões clínicas (TSANG, TSE, 2020).

1.2.3 Classificação molecular

Levando em consideração as características imunofenotípicas, a avaliação do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) é bastante utilizada na rotina do tratamento do câncer de mama, por serem marcadores de prognóstico e fatores preditivos para terapia hormonal e alvo dirigida (TSANG, TSE, 2020).

Os receptores de estrogênio e progesterona são receptores nucleares de hormônios sexuais que estimulam o crescimento do epitélio mamário normal e neoplásico. Eles estão expressos em cerca de 75% de todos os cânceres de mama e são indicadores da capacidade de resposta à terapia hormonal (MAKKI, 2015; TSANG, TSE, 2020).

O gene HER2 codifica um receptor de fator de crescimento na superfície das células epiteliais normais da mama (EPSTEIN, MA, PRESS, 2010). Aproximadamente, 15% dos cânceres de mama superexpressam HER2 com amplificação do gene correspondente em 17q12 (SLAMON, 1987; LAKHANI, 2012). A presença desse receptor está associada a um pior prognóstico.

Também é analisado o índice de expressão do antígeno Ki-67, que é uma proteína de ligação ao DNA nuclear e é um marcador de proliferação amplamente utilizado para classificar tumores (SOBECKI et al., 2017). Alguns estudos têm mostrado sua presença nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, mas não na fase G0 das células quiescentes ou em repouso, sugerindo seu papel como marcador de proliferação celular em muitos cânceres (URRUTICOECHEA, SMITH, DOWSETT, 2005). O seu índice de marcação, conforme determinado pela análise imunohistoquímica, é indicativo do prognóstico do paciente, sendo que um alto índice de Ki-67, geralmente está associado a um pior prognóstico (MENON et al., 2019).

Os cânceres de mama podem, ainda, serem classificados em subtipos de acordo com os perfis similares de expressão gênica (PEROU et al., 2000), sendo:

luminal A, luminal B, superexpressão de HER2 e o triplo-negativo (GOLDHIRSCH et al., 2011).

O luminal A é o subtipo molecular mais comum, representando cerca de 50% dos cânceres de mama invasivos (VODUC et al., 2010). Eles são positivos para ER e PR, com baixo nível de expressão ou negativos para HER2, e a taxa de proliferação expressa pelo Ki-67 é menor que 14%. Normalmente, são de baixo grau e menos agressivos entre os outros subtipos, apresentando melhor prognóstico. (HAMMOND et al., 2010; MAKKI, 2015).

Os cânceres luminais B compreendem 20% dos cânceres de mama invasivos e tendem a ser de grau mais alto e com o prognóstico pior do que os luminais A. Eles apresentam positividade para ER e PR, enquanto a expressão de HER2 é variável, podendo ser positiva ou negativa. A taxa de proliferação e os graus histológicos são maiores do que o luminal A ($Ki-67 \geq 14\%$). Clinicamente, os pacientes com os tumores luminais A responderiam bem com apenas terapia hormonal, enquanto os com tumores luminais B poderiam precisar de quimioterapia adicional (MAKKI, 2015; TSANG, TSE, 2020).

O subtipo que possui uma superexpressão de HER2, compreende cerca de 15% de todos os cânceres de mama invasivo. Ele é caracterizado pela forte expressão de HER2/neu, enquanto são negativos para ER e PR. Tumores que superexpressam HER2 são de alto grau, mais agressivos e possuem uma alta expressão de Ki-67. Apesar desse subtipo sugerir um prognóstico ruim, eles são altamente responsivos à terapia direcionada ao anti-HER2, utilizando o trastuzumabe (herceptina) (MAKKI, 2015; TSANG, TSE, 2020).

Os cânceres de mama do tipo triplo-negativo ou tipo basal são assim chamados por possuírem um padrão de expressão semelhante ao das células epiteliais basais e das células mioepiteliais normais do tecido mamário, incluindo citoqueratinas basais (PEROU et al., 2000; GOLDHIRSCH et al., 2011; MAKKI, 2015). Eles são negativos para ER, PR e HER2, e superexpressam genes relacionados a proliferação como a citoqueratina 5/6 (CK5/6) e/ou o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), com uma alta expressão de Ki-67 (MAKKI, 2015; AL-THOUBAITY, 2019). Correspondem a aproximadamente 15% dos cânceres de mama invasivos, são de

alto grau, com alto índice de proliferação, possuem prognóstico ruim e não respondem à terapia endócrina ou ao trastuzumabe (YAM, MANI, MOULDER, 2017).

1.2.4 Estadiamento TNM

O sistema de estadiamento de câncer de mama mais utilizado é o estadiamento TNM, publicado pelo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC)*. Esse sistema utiliza informações clínicas e patológicas do tamanho do tumor primário (T), o estado dos linfonodos regionais (N) e metástases distantes (M). O estadiamento combina esses fatores e estratifica a doença em cinco estágios (0, I, II, III e IV), que resumem as informações sobre a extensão da doença regional e metástases para locais distantes (LAKHANI, 2012).

A classificação T é utilizada para descrever o tamanho do tumor primário e sua invasão nos tecidos adjacentes. Frequentemente, há necessidade de correlacionar os achados macroscópicos, microscópicos e de imagem para melhor determinar essa categoria. TX indica que o tumor primário não pôde ser avaliado, T0 indica que não há evidência de tumor, enquanto T1-T4 são usados para identificar o tamanho e extensão do tumor, com aumento progressivo do tamanho e capacidade de invasão de T1 a T4 (LAKHANI, 2012; ROSEN, SAPRA, 2021).

A classificação N é utilizada para descrever o envolvimento de linfonodos regionais do tumor. Nx é usado quando os nódulos linfáticos não podem ser avaliados, N0 indica nenhuma propagação nodal regional, enquanto N1-N3 indica algum grau de propagação nodal, com uma propagação distal progressiva de N1 a N3 (ROSEN, SAPRA, 2021).

A classificação M é usada para identificar a presença de metástases distantes do tumor primário e é determinada principalmente pelos resultados de estudos radiológicos, com confirmação patológica após biópsia em alguns casos. Um tumor é classificado como M0 se nenhuma metástase à distância estiver presente e M1 se houver evidência de metástase à distância (LAKHANI, 2012; ROSEN, SAPRA, 2021).

As categorias TNM são determinadas e o estágio da doença é definido no momento do diagnóstico, conforme apresentado nos Anexos A e B (Classificação TNM no câncer de mama e estadiamento do câncer de mama por agrupamento). O

estágio clínico é atribuído com base no exame físico e estudos de imagem, enquanto o estágio patológico é atribuído após a cirurgia (SAWAKI, SHIEN, IWATA, 2019).

Na edição mais recente da classificação TNM pelo AJCC, houve a incorporação de fatores biológicos, como as informações sobre a expressão de receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), ao estadiamento anatômico tradicional para formar o estadiamento prognóstico (HORTOBAGYI, CONNOLLY, D'ORSI, et al., 2017). Esse estadiamento prognóstico supera a limitação da avaliação da extensão anatômica da doença por si só e prevê o prognóstico do paciente, ajudando a determinar um plano de tratamento com base nisso (SAWAKI, SHIEN, IWATA, 2019; TSANG, TSE, 2020).

1.3 DIAGNÓSTICO

Atualmente, na determinação de diagnóstico, prognóstico e decisões sobre tratamento de câncer, são realizadas biópsias tumorais, por meio das quais uma amostra do tumor é retirada do paciente, a partir de tumores primários ou metástases para determinar suas características histológicas (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013; EIGELIENE, SAARENHEIMO, JEKUNEN, 2019).

Após a realização da biópsia, a amostra é analisada por patologistas, e classificada de acordo com a morfologia tecidual e celular, e pela presença de marcadores já estabelecidos que permitem a correta identificação e/ou gradação do tumor.

Contudo, esse procedimento invasivo apresenta diversas limitações, dentre as quais se destacam: (1) a alta heterogeneidade do tumor, que pode comprometer a qualidade de análise patológica (ALMIRZAIE, BAGHERZADEH, AKBARI, 2019); (2) a dificuldade de retirada de biópsias de acompanhamento durante ou após o tratamento, por ser procedimento invasivo, dispendioso, doloroso ou potencialmente arriscado para o paciente (LIANIDOU; STRATI; MARKOU, 2014), especialmente se a lesão-alvo estiver localizada perto de vasos sanguíneos, pulmão ou fígado; (3) dependendo da localização do tumor, a acessibilidade do tecido tumoral também pode ser difícil ou arriscada (POULET, MASSIAS, TALY, 2019); (4) aumento substancial dos custos do

tratamento, juntamente com processamento demorado (EIGELIENE, SAARENHEIMO, JEKUNEN, 2019).

1.4 BIÓPSIA LÍQUIDA

A biópsia líquida representa uma alternativa simples e menos invasiva às biópsias de tecido, sendo um teste realizado em amostras biológicas líquidas, como por exemplo em sangue e urina, à procura de células tumorais (CTs) ou de fragmentos de material genético dessas células como DNA livre, DNA e RNA exossômicos, microRNA (NCI, 2021), sendo usada para avaliar o estado celular, genético e molecular dos tumores cancerígenos (TORRE et al., 2015).

Considerando a facilidade de obtenção de sangue e urina, o processamento das amostras ser mais rápido e barato que a biópsia tradicional, e a possibilidade de coleta de amostras repetidas em curto espaço de tempo para acompanhar em tempo real o desenvolvimento da doença, a eficácia de tratamentos e rastrear a ocorrência de resistência, a biópsia líquida tem se mostrado uma alternativa viável e atraente para estudo do câncer (KARACHALIOU et al., 2015; EIGELIENE, SAARENHEIMO, JEKUNEN, 2019).

1.5 CÉLULAS TUMORAIS CIRCULANTES

As células cancerosas que partem de uma lesão tumoral e entram na corrente sanguínea são conhecidas como Células Tumorais Circulantes, ou CTCs (CASTRO-GINER, ACETO, 2020), e são elas que podem ser identificadas e quantificadas na biópsia líquida. Essas células exibem alterações moleculares dinâmicas e possuem informações úteis sobre a composição tumoral, capacidade de invasão, suscetibilidade a medicamentos e resistência à terapia (GOLD; CANKOVIC; FURTADO, 2015).

As CTCs estão presentes no sangue de muitos pacientes com tumores sólidos (YU et al., 2014) e ocorrem em concentrações muito baixas no sangue periférico da maioria desses pacientes - cerca de uma a dez células tumorais circulantes em 10 mL de sangue (ALIX-PANABIÈRES, PANTEL, 2014).

Todavia, a maior parte dessas células morre na circulação, devido à perda de sinais de sobrevivência derivados da matriz, depuração imunológica, estresse físico

ou tensão de cisalhamento circulatório (YU et al., 2014; VAN DER TOOM, 2016). No entanto, se isoladas de pacientes como células viáveis, elas podem ser genotipadas e funcionalmente caracterizadas, possibilitando o acompanhamento da evolução da doença e resposta do paciente, além da identificação de tratamentos mais eficazes por meio do estabelecimento do perfil de mutação do tumor primário (YU et al., 2014).

Alguns estudos clínicos, envolvendo a detecção e contagem de CTCs em câncer de mama mostraram uma correlação entre a presença dessas células com um pior desfecho clínico, uma diminuição da sobrevida global e da sobrevida livre de doença antes (STATHOPOULOU et al., 2002; XENIDIS et al., 2003, 2006; IGNATIADIS et al., 2007, 2008;) e após o início de uma nova terapia sistêmica em pacientes com câncer de mama operável (CRISTOFANILLI et al., 2004; XENIDIS et al., 2009). Portanto, a detecção e caracterização de CTCs, juntamente com informações clínicas, pode ajudar na identificação de alvos-terapêuticos, mecanismos de resistência, assim como a estratificação dos pacientes e monitoramento em tempo real da resposta às terapias sistêmicas e do aparecimento de metástases (LIANIDOU, MARKOU, 2011).

Nos últimos anos, tem havido grande interesse em tecnologias inovadoras, sensíveis e eficientes para detectar e caracterizar CTCs. As técnicas atualmente disponíveis são baseadas em uma ou mais características das CTCs para distingui-las das células sanguíneas normais circulantes, como características biológicas (expressão de proteínas de superfície, presença de mutações, expressão de genes específicos, viabilidade e invasividade) e/ou propriedades físicas (tamanho, densidade, pH, carga e deformabilidade) (ZHANG et al., 2019).

Cabe lembrar que o *CellSearch*® (Veridex, LLC, Raritan, NJ, EUA), único sistema atualmente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico, assim como a maioria das técnicas anteriores para isolamento de CTCs, é baseado na expressão do fator de adesão de células epiteliais (EpCAM), uma proteína expressa na superfície de células de origem epitelial (ALLARD et al., 2004). Entretanto, essas células estão passíveis a sofrer transição epitelial-mesenquimal (EMT), que é um processo envolvido na metástase, em que as células epiteliais perdem suas características epiteliais e adquirem fenótipo mesenquimal, o que inclui potencial invasivo pela possibilidade de deixar o tecido de origem, migrar para outros

locais e formar metástases. A EMT é caracterizada pela regulação negativa de marcadores epiteliais, como EpCAM e citoqueratinas, e a regulação positiva de marcadores mesenquimais, como vimentina (KSIASKIEWICZ, MARKIEWICZ, ZACZEK, 2012; WU et al., 2015). Por isso, alguns estudos demonstraram a necessidade de avaliar múltiplos marcadores presentes nas CTCs, devido às relativas limitações de avaliar apenas um único biomarcador (HOON et al., 2000). Assim, o marcador ideal seria expresso em todas essas células tumorais circulantes, mas não em células sanguíneas, e sua expressão seria mantida ao longo da progressão da doença, e nunca reprimida durante o processo de invasão e circulação (ALIX-PANABIÈRES, PANTEL, 2014).

Diante do exposto, neste trabalho, foram escolhidos três marcadores para detectar essas células tumorais circulantes. As citoqueratinas e o *Epithelial related antigen* (EpCAM) são marcadores epiteliais, que podem ser reconhecidos, respectivamente pelos anticorpos anti-pancitoqueratina (PanCK, Zeta Corporation, Arcadia, Califórnia, EUA) e anti-*Epithelial related antigen* (clone MOC-31, Biogen, Cambridge, Massachusetts, EUA). O anti-PanCK se liga às citoqueratinas expressas na epiderme e epitélio anexial, marcando todos os tumores epiteliais, diferenciando-os de tumores não epiteliais (ELSTON; FERRINGER, 2014). O anti-MOC-31 é um dos anticorpos que se ligam à molécula de adesão epitelial (EpCAM), uma glicoproteína transmembrana que está presente na maioria do epitélio glandular e nos tumores originados desse epitélio (SOUHAMI et al., 1991). O epítipo reconhecido por MOC-31 é expresso em epitélios benignos e em muitos carcinomas, incluindo aqueles derivados do cólon, estômago, mama, pâncreas, ovário e dutos biliares, sendo muito utilizado como marcador para diagnóstico de efusões malignas (DABBS; KRASINSKAS, 2011; LI et al., 2014). Já o GATA-3 (Zeta Corporation, Arcadia, Califórnia, EUA) é um marcador indicativo de sítio primário de mama. GATA-3 é uma proteína nuclear, membro da família GATA de fatores de transcrição que está envolvido na diferenciação de células luminais na glândula mamária e possui importantes implicações para a patogênese do câncer de mama (KOUROS-MEHR et al., 2006; VODUC, CHEANG, NIELSEN, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama continua sendo a neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada entre as mulheres (BRAY et al., 2018). Com a triagem ativa para detecção precoce e avanços no tratamento, houve uma redução significativa na mortalidade por câncer de mama (LIANG, HALL, LUCCI, 2020).

Com o aumento da sobrevida das pacientes com câncer de mama, há a necessidade de desenvolver métodos de monitoramento não invasivos, mais sensíveis, baseados no perfil celular e/ou molecular, com capacidade preditiva de resposta clínica, e complementar aos métodos empregados hoje em pacientes com câncer avançado e metastático. A biópsia líquida é um método de detecção e isolamento de células tumorais e marcadores moleculares circulantes no sangue que permite detectar de forma não invasiva e precocemente possíveis recidivas assim como uma medição dinâmica de indicadores de carga da doença e resposta à terapia, representando uma possibilidade futura de avaliação do prognóstico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade da citologia e imunocitoquímica para identificação de células de câncer de mama de linhagem e de pacientes em amostras de sangue periférico preparadas por citocentrifugação e *cell-block*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de recuperação de células de câncer de mama da linhagem MCF-7 em amostras sangue periférico, preparadas por citocentrifugação e *cell-block*, através da expressão do marcador PanCK;
- Verificar a expressão de PanCK, EpCAM e GATA-3 em amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de mama preparadas por citocentrifugação e *cell-block*.

4. METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS E ENRIQUECIMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE

A linhagem celular humana MCF-7 de câncer de mama foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), lavadas com tampão fosfato-salino 1X (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) e desprendidas das placas adicionando-se tripsina 0,25% por 1 minuto. Acrescentou-se, então, o meio para inativar a tripsina e ser realizada a contagem das células a serem adicionadas em quantidade desejada a amostras de sangue de doadores saudáveis.

Diferentes diluições de MCF-7 foram adicionadas a amostras de sangue de 10 mL de doadores saudáveis a fim de se obter as concentrações de 1.000, 100, 10 e 1 células por mL de sangue. Todas essas concentrações foram realizadas em triplicatas, tanto para a citocentrifugação, quanto para o *cell-block*, com o objetivo de avaliar suas taxas de recuperação.

4.2 AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES

Para a análise de CTCs foram coletadas amostras de sangue de pacientes com câncer de mama. Todos os doadores e pacientes deram seu consentimento para participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (CAAE - 34710214.9.0000.5558), coordenado pela Professora Dra. Andréa Barretto Motoyama.

Amostras de sangue no volume de 15 mL foram coletadas de 74 pacientes com câncer de mama, compreendendo pacientes com câncer metastático e não metastático, recém-diagnosticadas não submetidas à terapia prévia e já diagnosticadas submetidas ou não à terapia, de idades entre 18-80 anos, na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) ou Laboratório de Mastologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

Todas as amostras de sangue foram obtidas por meio de procedimento padrão de punção de veias, por profissional, sendo as seringas, agulhas e tubos de coletas estéreis e descartáveis.

4.3 HEMÓLISE DO SANGUE

As amostras de sangue foram diluídas em tampão de hemólise (1:4/ v:v; Apêndice A) e agitadas por 15 minutos sob refrigeração. As amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos em centrífuga refrigerada 2-16KL (SIGMA®, *Osterode am Harz*, Alemanha), descartado 90% do sobrenadante e repetido o passo de hemólise e centrifugação, deixando-se, ao final, um volume de 200 µl para as amostras de sangue de doadores saudáveis enriquecidas com células de linhagem e 800 µl para as amostras de pacientes.

4.4 CITOCENTRIFUGAÇÃO

Após a finalização da hemólise, 100 µl das amostras foram pipetados em cada citofunil previamente acoplado ao citoclipe e à lâmina, centrifugados a 2.000 rpm por 2 minutos na centrífuga DCS-16 RV (citoPRESVAC®, Buenos Aires, Argentina) e, então, as lâminas foram fixadas em etanol 99% para, então, ser feita coloração Papanicolaou e marcação de imunocitoquímica e posterior contra-coloração com hematoxilina. Para as amostras de sangue com linhagem celular, foram obtidas duas lâminas por réplica biológica; já para as amostras de sangue de paciente, foram obtidas quatro lâminas.

4.5 COLORAÇÃO PAPANICOLAOU

Após a citocentrifugação, realizou-se, em uma das lâminas obtidas de cada amostra, a coloração Papanicolaou, que consiste em uma coloração policromática.

Iniciou-se com uma hidratação gradativa, passando as lâminas por três cubas contendo etanol nas concentrações de 95%, 75% e 50%, para então hidratar as lâminas em água destilada.

As lâminas foram em seguida mergulhadas por dois minutos em hematoxilina (Apêndice B) e então lavadas em água corrente. As lâminas foram lavadas duas vezes em etanol 95% e deixadas por 30 segundos no corante *Orange-G* (Apêndice C). Em

seguida, foram lavadas duas vezes em etanol 95% e mergulhadas por dois minutos no corante EA-65 (Apêndice D).

As lâminas foram lavadas sete vezes em etanol, sendo a primeira lavagem em etanol 95% e o restante em etanol absoluto. Em seguida, foram mergulhadas brevemente em xilol, cobertas com lamínula e seladas com Entellan® (Merck, Darmestádio, Alemanha).

4.6 *CELL-BLOCK* PELO MÉTODO PLASMA-TROMBOPLASTINA

Após a hemólise, foi deixado um volume restante de 200 µL no tubo para as amostras de sangue de doadores saudáveis enriquecidas com células de linhagem. Já para as amostras de sangue de paciente, após a hemólise e citocentrifugação, foi deixado um volume de 400 µL. Em ambos os casos, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 6 minutos para a retirada do sobrenadante, e então adicionaram-se 100 µL de plasma e 100 µL de tromboplastina STA®-Neoplastine® CI Plus 10 (Diagnostica Stago, Asnières sur seine, França) com leve pipetagem para mistura, e então foram deixadas em repouso até a formação do coágulo.

Após a formação do coágulo, adicionaram-se 2 mL de formol salino 0,9% (Apêndice E) para promover o deslocamento do coágulo do fundo do tubo e promover a pré-fixação da amostra. Em seguida, o coágulo foi retirado do tubo e colocado dentro de um cassete previamente identificado, transferindo-o para um frasco contendo formol salino 0,9%.

Posteriormente, os cassetes foram colocados nas cestas do Processador automático de tecidos PT05 (Lupetec®, São Carlos, São Paulo, Brasil), seguindo programação adequada, sendo realizados os processos de desidratação, diafanização ou clarificação e impregnação. Depois, foi realizada a colocação do material em blocos de parafina para realizar a microtomia do bloco e confecção de lâminas histológicas. As lâminas foram a seguir desparafinizadas e submetidas à coloração hematoxilina-eosina (HE) e à imunocitoquímica.

4.7 COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA

Para metade das lâminas obtidas do *cell-block*, realizou-se a coloração hematoxilina-eosina (HE), que é a coloração universal com a qual se inicia todos os exames anatomopatológicos e nos permite visualizar vários constituintes celulares.

Foram realizados dois ciclos de retirada de parafina em estufa a 65°C, seguido de três banhos de xilol por cinco minutos cada. As lâminas foram então hidratadas em etanol, em concentração de 100%, três vezes seguidas, e 95% na última vez, para serem finalmente hidratadas em água destilada.

As lâminas foram colocadas por três minutos em hematoxilina e então lavadas em água corrente. As lâminas foram lavadas uma vez em etanol 95% e deixadas por um minuto no corante eosina (Apêndice F). Em seguida, foram lavadas quatro vezes em etanol, sendo a primeira lavagem em etanol 95% e o restante em etanol absoluto. Foram banhadas em xilol três vezes, cobertas com lamínulas e seladas com Entellan®.

4.8 IMUNOCITOQUÍMICA

Para as lâminas obtidas da citocentrifugação e do *cell-block* foram realizadas as técnicas de imunocitoquímica para localizar antígenos nas células anormais utilizando o kit *EasyLink One* (*Easypath* diagnósticos, Indaiatuba, São Paulo, Brasil).

Antes de se iniciar, preparou-se a solução de recuperação antigênica (Apêndice G) e o vaporizador (*steamer*), aguardando até a solução atingir a temperatura de 95°C dentro de cubas de plástico no interior do vaporizador.

Para as lâminas obtidas do *cell-block*, realizou-se a retirada de parafina com quatro banhos de 5 minutos cada em xilol 100%, seguindo de um banho em xilol 50%/etanol 50%. Em seguida, foi feita a hidratação, com três banhos em etanol 100%, um banho em etanol 95%, um banho em etanol 80%, um banho em etanol 70% e um banho em etanol 50%, todos por um minuto, seguido de três banhos por 2 minutos em água destilada, nessa ordem.

As lâminas foram colocadas na solução de recuperação dentro do vaporizador e após atingir a temperatura de 95°C, aguardaram-se 20 minutos. Após isso,

deixaram-se as lâminas, ainda na solução de recuperação, por mais 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas obtidas através da citocentrifugação foram acondicionadas juntamente com as lâminas obtidas do *cell-block* na solução de recuperação durante os 20 minutos finais à temperatura ambiente.

Lavaram-se todas as lâminas para retirar a solução de recuperação nove vezes com água destilada e, então, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena, misturando 450 ml de água destilada com 140 ml de peróxido de hidrogênio, e colocaram-se as lâminas nessa mistura, realizando dois banhos de 10 minutos nessa solução.

Lavaram-se as lâminas cinco vezes em água destilada e realizou-se o bloqueio de proteínas inespecíficas, colocando o bloqueador de proteínas (soro de cabra 10%) nas amostras e aguardando-se por 10 minutos.

Realizaram-se dois banhos de cinco minutos em tampão de lavagem (Apêndice H), que foi cuidadosa- e totalmente removido. Iniciou-se a incubação com os anticorpos primários a 4°C/16h±2h. O anticorpo primário utilizado para as lâminas obtidas das amostras de sangue enriquecidas com células de linhagem foi o PanCK e para as lâminas obtidas das amostras de sangue de pacientes foram PanCK, MOC-31 e GATA-3, conforme Tabela 1. Como controle técnico, foi incluída uma lâmina contendo uma amostra que expressava o antígeno de interesse.

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados na imunocitoquímica

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Controle
Citoqueratina (PanCK)	Zeta	AE1/AE3	1:900	Pele
<i>Epithelial related antigen</i>	Biogen	MOC-31	1:20	Câncer de estômago
GATA-3	Zeta	L50-823	1:90	Mama

Lavaram-se as lâminas três vezes com o tampão de lavagem, que foi retirado totalmente e gotejou-se o de polímero *EasyLink One* (que corresponde ao anticorpo secundário e o reagente estreptovidina peroxidase), incubando-se por 1 hora a temperatura ambiente, e lavando-se três vezes com o tampão de lavagem.

Após a retirada do tampão de lavagem, aplicou-se o cromógeno líquido diaminobenzidina (DAB; K-3466), aguardando até que houvesse a revelação para, então, mergulhar as lâminas em água destilada por dois minutos.

Mergulhou-se as lâminas em Hematoxilina de Harrys por 30 segundos e lavou-se em água corrente. Em seguida, fez-se 11 banhos em etanol nas seguintes concentrações: dois banhos em etanol 50%, dois em etanol 70%, dois em etanol 80%, dois em etanol 95% e três em etanol 100%. Por fim, as lâminas foram mergulhadas brevemente em xilol, cobertas com lamínulas e seladas com Entellan®.

A contagem do número de células positivas para os anticorpos aqui utilizados foi realizada de duas maneiras. Para as lâminas obtidas da citocentrifugação, utilizou-se um microscópio, examinando toda a lâmina com um aumento de 100X, já para o *cell-block*, examinou-se um corte de cada lâmina através de imagens geradas pelo *software* Aperio® ImageScope, ampliado em 10X. Para as pacientes que tiveram caso de metástase à distância confirmado, foi realizada imunocitoquímica em todos os cortes das lâminas confeccionadas a partir do *cell-block*. Na Figura 1 encontra-se representado o fluxograma de como foi realizada a metodologia do presente trabalho.

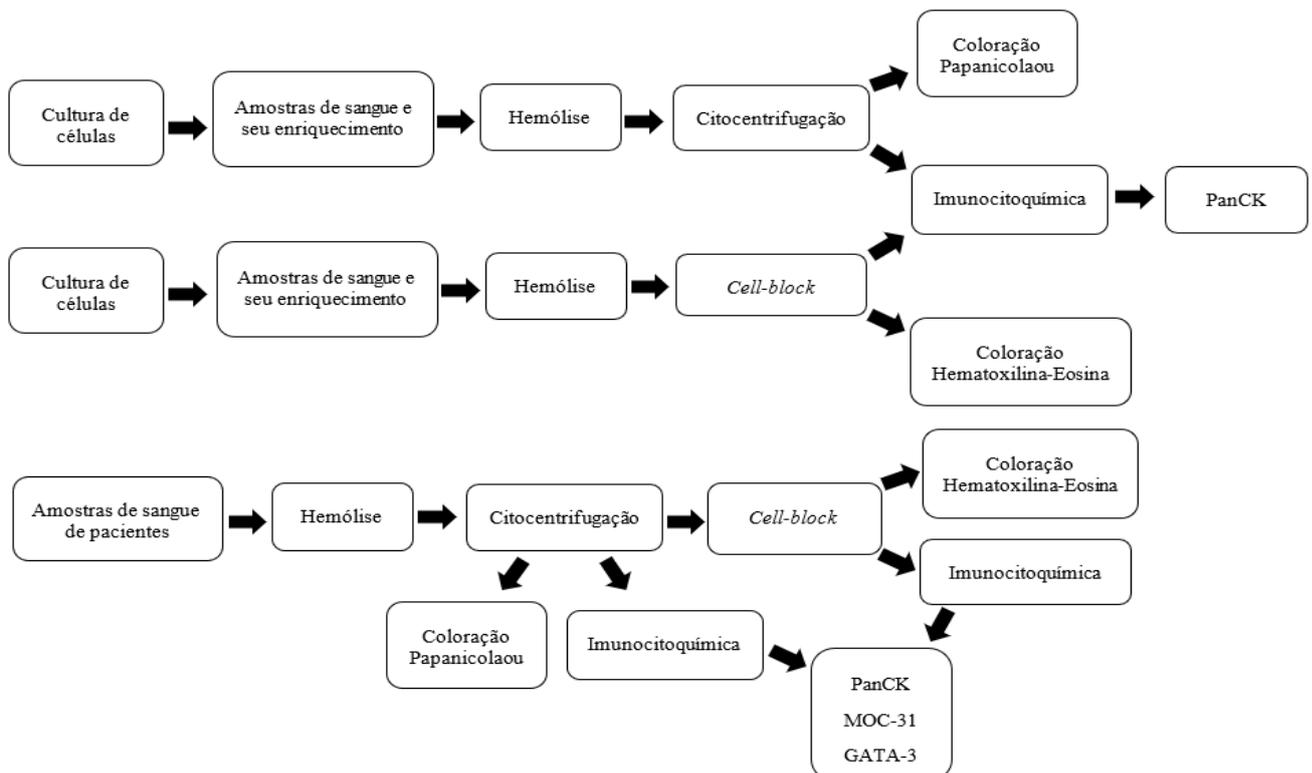


Figura 1. Fluxograma da metodologia realizada.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA TAXA DE RECUPERAÇÃO EM AMOSTRAS DE SANGUE ENRIQUECIDAS COM CÉLULAS DE LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO E O CELL-BLOCK

Das lâminas obtidas pela citocentrifugação de amostras de sangue de doadores saudáveis enriquecidas com células de linhagem tumoral (MCF-7), uma foi submetida à técnica de imunocitoquímica, utilizando o anticorpo anti-PanCK, e a outra à coloração pelo método de Papanicolaou. O número total de células positivas para PanCK variou de 0 a 3.254 células, equivalente a uma taxa de recuperação de 0 a 66%. Imagens representativas podem ser encontradas na Figura 2.

Das lâminas obtidas do *cell-block* de amostras de sangue de doadores saudáveis enriquecidas com células de linhagem tumoral (MCF-7), metade foi submetida à técnica de imunocitoquímica, utilizando o anticorpo anti-PanCK, e a outra metade foi corada com a técnica de coloração Hematoxilina-Eosina. O número total de células positivas para PanCK variou de 0 a 3.678 células equivalente a uma taxa de recuperação de 0 a 73,56%. Imagens representativas podem ser encontradas na Figura 3. A expressão de PanCK foi difusa e mostrou intensidade moderada a intensa na imunocitoquímica das lâminas obtidas da citocentrifugação e *cell-block*.

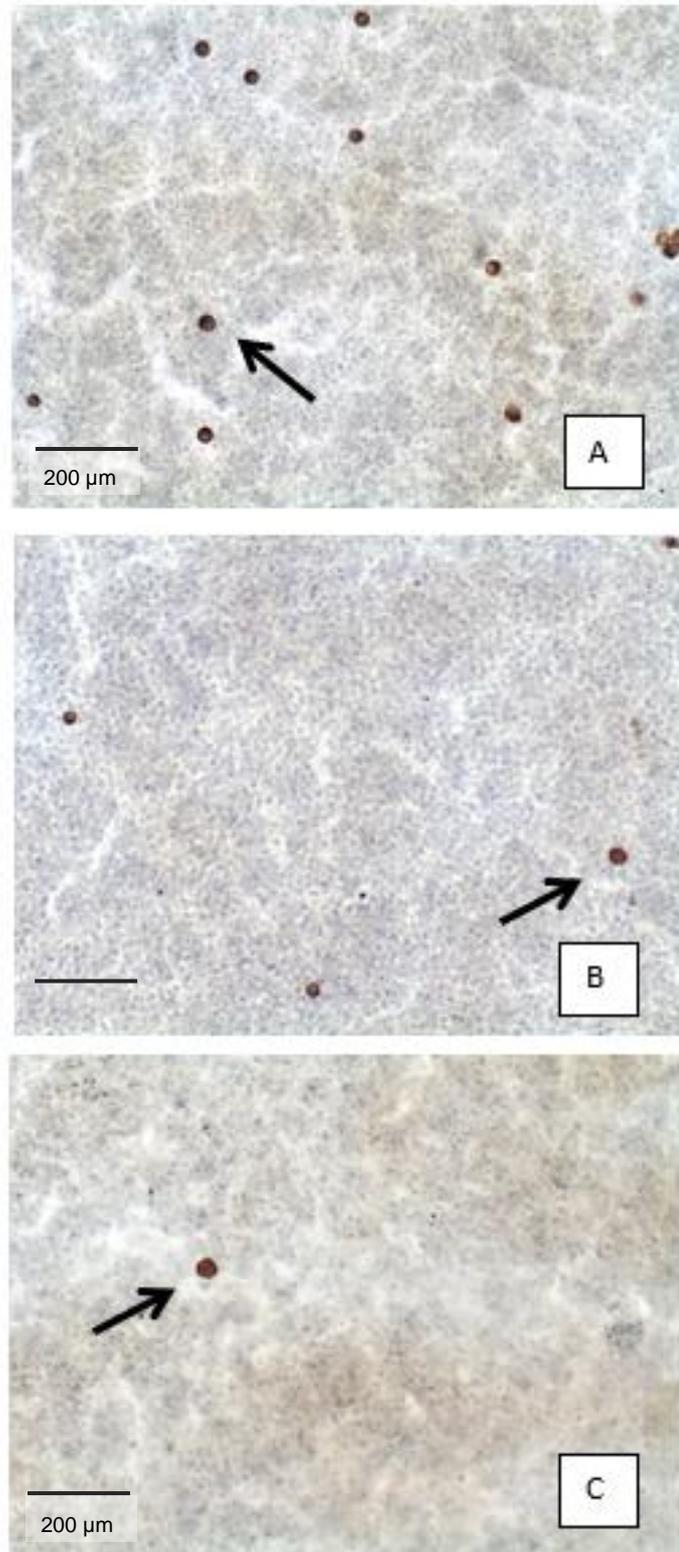


Figura 2. Imunocitoquímica para PanCK 100X. Citocentrifugado do sangue com células da linhagem MCF-7 positivas (coradas em marrom, na seta), em diferentes concentrações celulares: 1000 células/mL (A), 100 células/mL (B) e 10 células/mL (C).

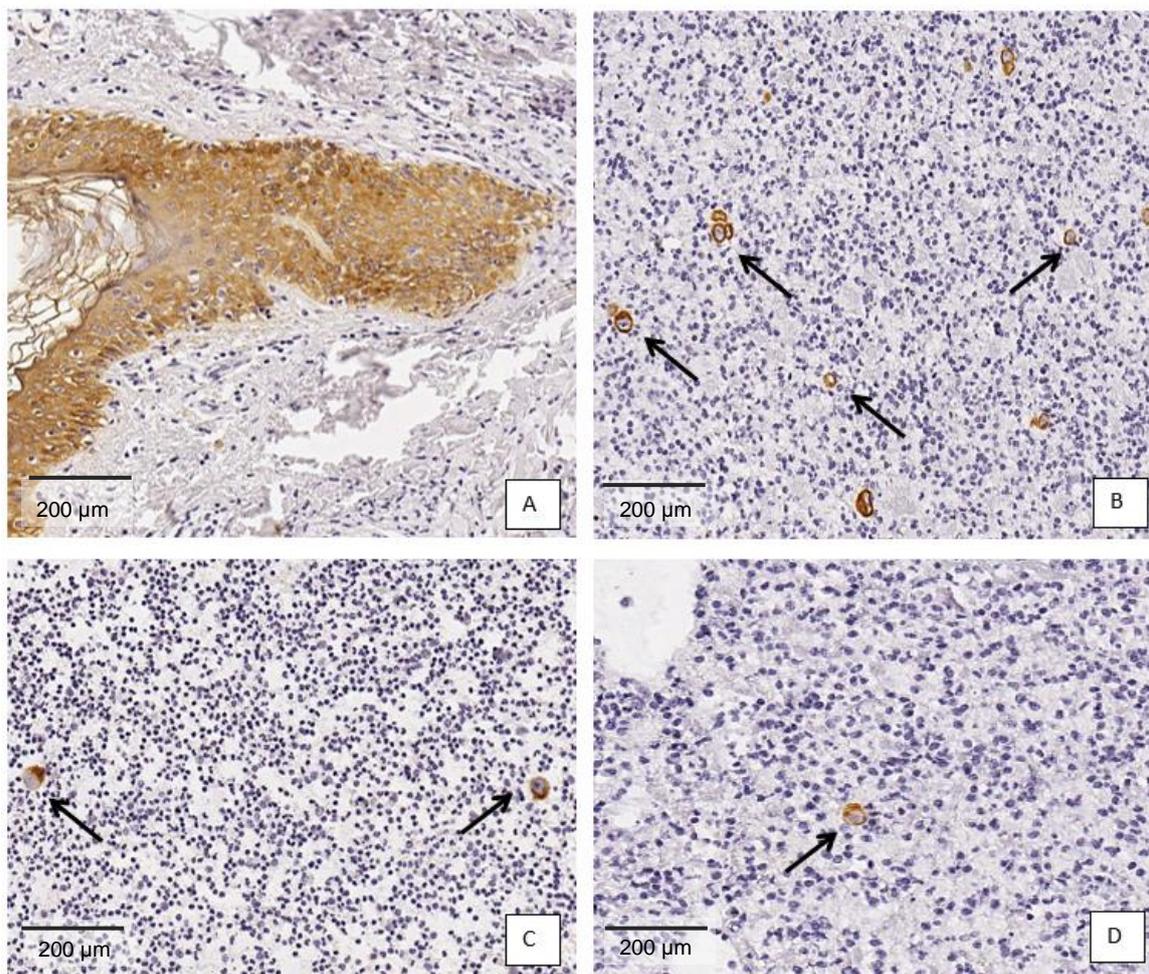


Figura 3. Imunocitoquímica para PanCK 10X. Controle positivo: corte histológico de pele com expressão na epiderme (A). *Cell-block* do sangue com células (setas) da linhagem MCF-7, em diferentes concentrações celulares: 1000 células/mL (B), 100 células/mL (C) e 10 células/mL (D).

As taxas de recuperação nas diferentes concentrações foram dispostas na Tabela 2. Observou-se que as taxas de recuperação foram maiores na maior concentração (1.000 células/mL) tanto pela citocentrifugação quanto no *cell-block*, sendo as médias das taxas de recuperação de 58,05% e 58,19%, respectivamente. Ao analisar as duas técnicas, as médias das taxas de recuperação para as concentrações de 100 células/mL e 10 células/mL foram similares, ficando em torno dos 30%. Na menor concentração (1 célula/mL), só foram recuperadas células pela citocentrifugação. Considerando-se todas as concentrações, a média das taxas de recuperação encontradas foram de 33,95% para a citocentrifugação e 30,50% para o *cell-block*.

Tabela 2 – Recuperação e taxa de recuperação das células MCF-7 adicionadas a sangue de doadores saudáveis para as técnicas de citocentrifugação e *cell-block*

Concentração (Células/mL)	Quantidade esperada	Citocentrifugação			Cell-block		
		Quantidade recuperada	Taxa de recuperação (%)	Média (%)	Quantidade recuperada	Taxa de recuperação (%)	Média (%)
1000	5000	3254	65,08	58,05	3678	73,56	58,19
		3232	64,64		2737	54,74	
		2222	44,44		2314	46,28	
100	500	277	55,4	25,73	164	32,8	30,47
		86	17,2		149	29,8	
		23	4,6		144	28,8	
10	50	33	66	32	28	56	33,33
		8	16		16	32	
		7	14		6	12	
1	5	2	40	20	0	0	0
		1	20		0	0	
		0	0		0	0	
Média				33,95%			30,50%

Nas lâminas que foram realizadas a coloração Papanicolaou e HE é possível identificar morfológicamente as células tumorais de linhagem diferenciando-as das células do sangue. As células tumorais são maiores, com citoplasma amplo e atipias nucleares (cariomegalia e nucléolos evidentes). Essas lâminas encontram-se representadas na Figura 4.

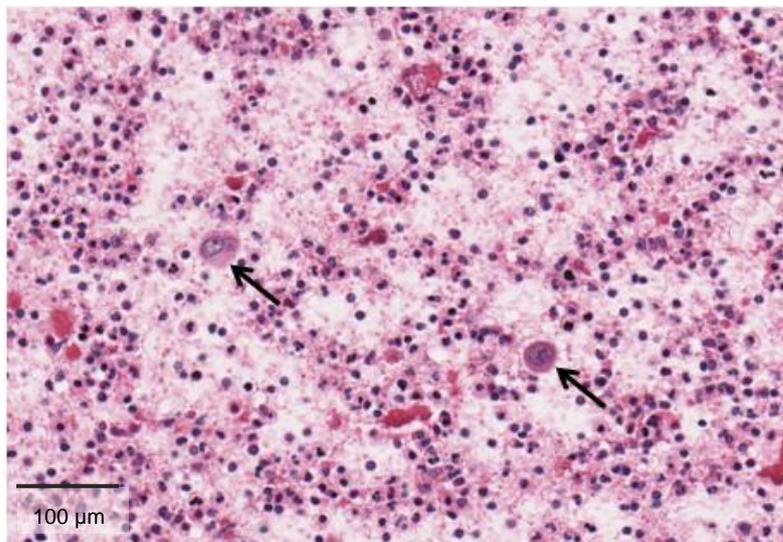


Figura 4. Corte de *cell-block* de sangue com células (seta) de linhagem MCF-7 (20X, HE).

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS DAS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Os parâmetros clínicos e anatomopatológicos das pacientes analisados foram: idade; padrão de crescimento patológico; tipo histológico; grau de diferenciação dos tumores; estadiamento TNM; expressão dos marcadores RE, RP, Ki-67 e HER2; invasão vascular e perineural; tipo de cirurgia e tratamento. A tabela completa contendo todos os parâmetros de cada paciente pode ser visualizada no Apêndice I.

Um total de 74 amostras de sangue de pacientes foram coletadas entre março de 2018 e março de 2020. O tempo de evolução das pacientes, do momento da coleta até a última consulta de acompanhamento, variou de um a 36 meses. A idade média (\pm desvio padrão) das pacientes foi de $53,3 \pm 8,2$ anos (mediana, 52,5). As pacientes encontraram-se na faixa de 32 a 77 anos, sendo as faixas de 41 a 50 anos e de 51 a 60 anos as de maior prevalência com 32,43 e 33,78%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Informações sobre idade e faixa de idade de maior prevalência das pacientes com câncer de mama

Idade das pacientes	Faixa de idade	N	%	
Média	53,3	30-40 anos	5	6,76
Intervalo	32-77	41-50 anos	24	32,43
		51-60 anos	25	33,78
		61-70 anos	16	21,62
		71-80 anos	4	5,41

Com relação ao diagnóstico patológico, 59 (79,73% das pacientes) apresentavam carcinoma invasivo Tabela 4. Quanto a prevalência do tipo e grau histológico dos carcinomas invasivos, o ductal foi o de maior prevalência, sendo observado em 79,66% das pacientes, e o grau II de Nottingham foi observado em 40,68% dos carcinomas invasores. (Tabelas 5 e 6).

Tabela 4 – Diagnóstico patológico das lesões das mamas das pacientes

Diagnóstico patológico	n	%
Carcinoma Invasivo	59	79,73
Carcinoma In situ	7	9,46
Desconhecido	2	2,70
Sem malignidade	6	8,11

Tabela 5 – Tipos histológicos dos tumores das pacientes com carcinoma invasivo de mama

Tipos histológicos	n	%
Ductal	47	79,66
Lobular	4	6,78
Ductal e Lobular	6	10,17
Medular	1	1,69
Micropapilar	1	1,69

Tabela 6 - Grau de diferenciação dos tumores das pacientes com carcinoma invasivo de mama

Grau	n	%
I	10	16,95
II	24	40,68
III	18	30,51
Não Avaliável	1	1,69
Desconhecido	6	10,17

Com relação ao estadiamento do tumor, observou-se maior prevalência de T2 (44,07%), N0 (40,68%) e M0 (74,58%), sendo encontrados quatro casos de metástases à distância, como apresentado nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7 – Classificação do tamanho dos tumores das pacientes com carcinoma invasivo da mama

Tamanho do tumor	n	%
T1	9	15,25
T2	26	44,07
T3	14	23,73
T4	9	15,25
Desconhecido	1	1,69

Tabela 8 – Classificação do comprometimento dos linfonodos regionais das pacientes com carcinoma invasivo de mama

Envolvimento de linfonodos regionais	n	%
N0	24	40,68
N1	22	37,29
N2	11	18,64
N3	1	1,69
Desconhecido	1	1,69

Tabela 9 – Classificação quanto a presença de metástases à distância nas pacientes com carcinoma invasivo da mama

Metástase	n	%
MX	11	18,64
M0	44	74,58
M1	4	6,78

A respeito da classificação molecular, ao analisar a expressão dos marcadores nos carcinomas invasivos observa-se que eram positivos para o receptor de estrogênio (RE) e progesterona (PR), respectivamente, 84,75% e 74,58% dos casos (Tabela 10 e 11, respectivamente). Para o índice de proliferação celular medido por Ki-67, 93,22% dos casos foram positivos (Tabela 12). Já o status de HER2 prevaleceu o negativo (escore 0 e 1+) em 81,36% dos casos (Tabela 13).

Tabela 10 – Expressão dos marcadores de receptor de estrogênio (RE) nas pacientes com carcinoma invasivo de mama

Status RE	n	%
Positivo	50	84,75
Negativo	9	15,25

Tabela 11- Expressão dos marcadores de receptor de progesterona (PR) nas pacientes com carcinoma invasivo da mama

Status PR	n	%
Positivo	44	74,58
Negativo	15	25,42

Tabela 12 - Expressão do índice de proliferação celular medido por Ki-67 nas pacientes com carcinoma invasivo da mama

Status Ki-67	n	%	Positivos % Ki-67 (n=55)		
				n	%
Positivo	55	93,22	≤ 14%	16	29,09
Negativo	1	1,69	> 14%	38	69,09
Desconhecido	3	5,08	Desconhecido	1	1,82

Tabela 13 – Expressão dos marcadores de HER2 nas pacientes com carcinoma invasivo da mama

Status HER2	n	%
Positivo (escore 3+)	7	11,86
Indeterminado (escore 2+)	4	6,78
Negativo (escore 1+)	4	6,78
Negativo (escore 0)	44	74,58

Invasão vascular estava presente em 18,64% dos casos, não sendo especificado se era invasão vascular linfática ou sanguínea (Tabela 14). A invasão perineural estava presente em 6,78% dos casos (Tabela 15).

Tabela 14 – Invasão vascular nas pacientes com carcinoma invasivo da mama

Invasão Vascular	n	%
Presente	11	18,64
Ausente	27	45,76
Desconhecido	21	35,59

Tabela 15 – Invasão perineural nas pacientes com carcinoma invasivo da mama

Invasão perineural	n	%
Presente	4	6,78
Ausente	32	54,24
Desconhecido	23	38,98

No que se refere ao tipo de cirurgia realizada, 44,07% das pacientes foram submetidas à mastectomia total, enquanto 47,46% foram submetidas à cirurgia

conservadora (Tabela 16). Quanto ao tratamento, 25,42% estavam iniciando sua primeira linha de terapia, ou seja, no momento da coleta, ainda não haviam realizado cirurgia nem recebido algum tipo de tratamento (Tabela 17). Das terapias administradas, apenas a hormonioterapia foi empregada isoladamente, correspondendo a 8,47% dos casos. A maioria das pacientes recebeu uma combinação de terapias, sendo que a combinação de quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia correspondeu a 62,71% dos casos, como observado na Tabela 18.

Tabela 16 – Tipo de cirurgia realizada nas pacientes para o diagnóstico de câncer de mama

Tipo de cirurgia	n	%
Mastectomia	26	44,07
Conservadora	28	47,46
Ambas	5	8,47

Tabela 17 – Momento das coletas das amostras de sangue das pacientes com carcinoma invasivo em relação ao início da terapia

Momento da coleta	n	%
Antes do início da terapia	15	25,42
Depois do início da terapia	43	72,88
Desconhecido	1	1,69

Tabela 18 – Tipo de terapias empregadas no tratamento das pacientes com câncer de mama

Tipo de terapias	n	%
QT	0	0,00
RT	0	0,00
HT	5	8,47
QT + RT+ HT	37	62,71
QT + RT	6	10,17
QT + HT	3	5,08
RT + HT	6	10,17
Sem tratamento adjuvante	1	1,69
Desconhecido	1	1,69

QT- Quimioterapia; RT – Radioterapia; HT – Hormonioterapia

5.3 ANÁLISE CITOLÓGICA E IMUNOCITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA PREPARADAS POR CITOCENTRIFUGAÇÃO E O *CELL-BLOCK*

A metodologia para recuperação de células de câncer de mama de linhagens tumoral anteriormente descrita aqui, foi reproduzida em amostras de paciente com câncer de mama. Na análise citológica e imunocitoquímica, foram encontrados alguns contaminantes, estruturas passíveis de erro de interpretação morfológica e algumas células suspeitas para carcinoma de mama.

5.3.1 Contaminantes das amostras de pacientes

Células escamosas contaminantes e positivas para PanCK foram observadas no citocentrifugado e no *cell-block* de todas as amostras de pacientes. Essas células também foram observadas nas lâminas em que se realizou a coloração HE, como foi representado na Figura 5.

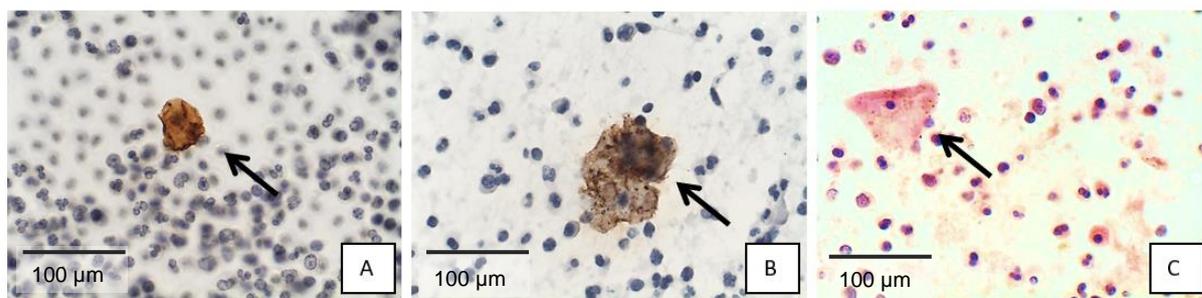


Figura 5. Imunocitoquímica para PanCK (A e B) e coloração HE (C) 400X em amostra de sangue de paciente. Células escamosas (escamas córneas) contaminantes e positivas (coradas em marrom e rosa, na seta), no citocentrifugado (A), no *cell-block* (B) e no HE (C).

Foi encontrada também contaminação fúngica, detectável por estruturas com morfologias semelhantes a leveduras e fungos filamentosos em algumas lâminas de pacientes, em sua maioria provenientes do *cell-block*. As que se assemelham a leveduras são elipsoides ou arredondadas, com parede celular realçada e agregadas. Esses contaminantes possuem um padrão de marcação semelhante em todos os cortes, independente do anticorpo utilizado (Figura 6).

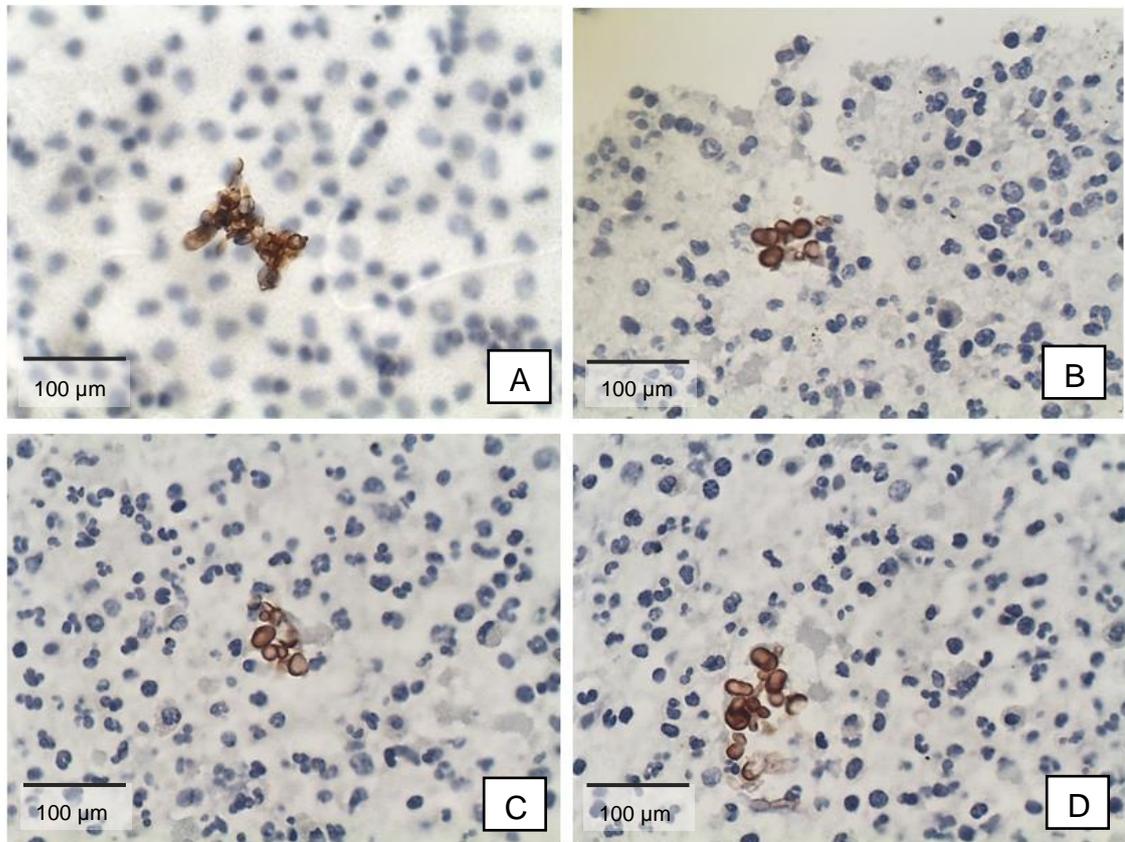


Figura 6. Imunocitoquímica (400X), estruturas fúngicas contaminantes (coradas em marrom) em amostra de sangue de paciente. A, PanCK, no citocentrifugado. B, C e D, PanCK, EpCAM e GATA-3, respectivamente, no *cell-block*.

5.3.2 Células com marcação inespecífica

Leucócitos com marcação semelhante e inespecífica no citoplasma, independente do anticorpo primário utilizado, foram observados em cinco pacientes, conforme ilustrado na Figura 7.

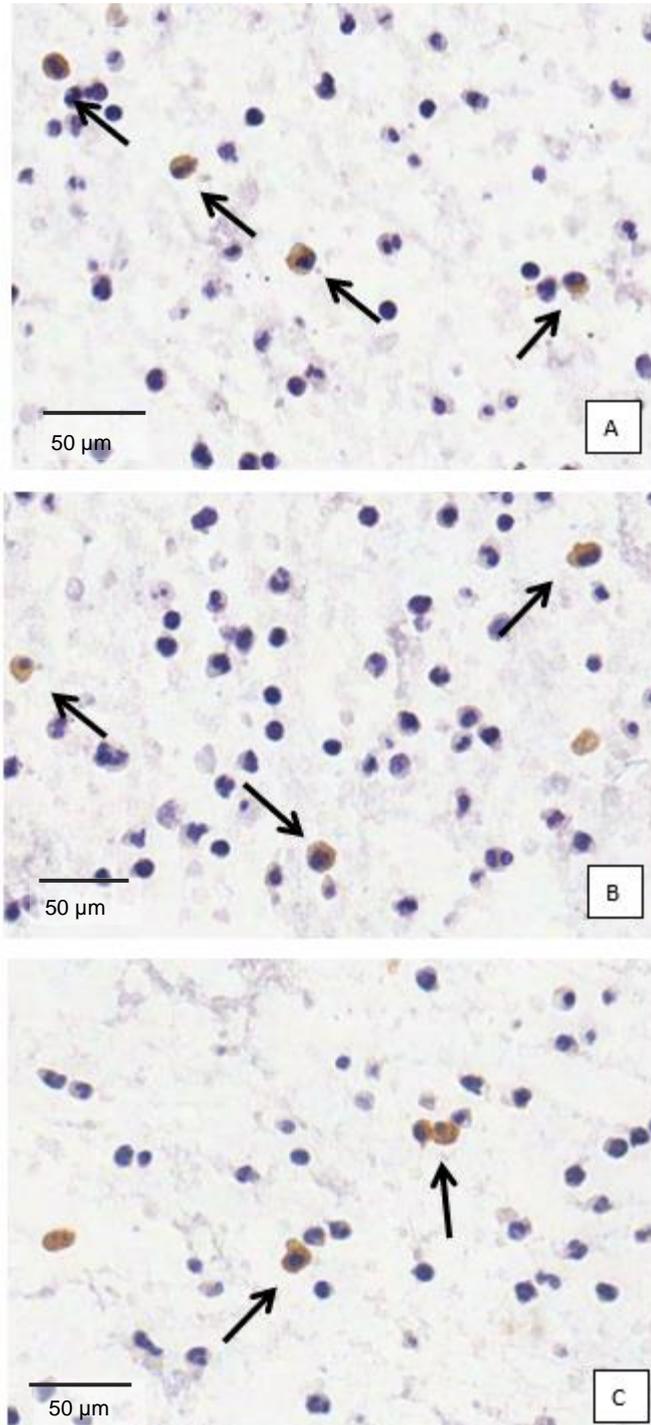


Figura 7. Imunocitoquímica em amostra de sangue de paciente (40X), leucócitos com marcação inespecífica (corados em marrom, na seta), para PanCK, EpCAM e GATA-3 (A, B, e C, respectivamente).

5.3.3 Achados citopatológicos suspeitos de Células Tumorais Circulantes no sangue de paciente com câncer de mama

Em amostra de sangue de uma paciente com carcinoma metastático, caso 63 (Apêndice I), foram observadas células que possuíam marcação positiva conforme o padrão de marcação dos anticorpos utilizados. Não foram encontrados leucócitos com marcação inespecífica nem contaminação fúngica nas lâminas dessa paciente. Nas amostras das outras pacientes com diagnóstico de carcinoma, com e sem caso de metástase à distância confirmada, não foi encontrada nenhuma célula com morfologia e marcação Imunocitoquímica suspeita para carcinoma.

Do ponto de vista morfológico, não foram observadas células com características de malignidade (aumento de volume, pleomorfismo e alterações nucleares) tanto nas amostras preparadas por citocentrifugação quanto nas de *cell-block* do caso 63. Com relação à expressão dos marcadores na amostra 63, foi encontrada, em uma das lâminas preparadas a partir da citocentrifugação, uma célula pequena e arredondada, apresentando membrana realçada e citoplasma marcado, ou seja, com o padrão de marcação esperado para o anticorpo anti-EpCAM. Foi encontrado, também, um agrupamento de três células com marcação positiva intensa em seus citoplasmas, ou seja, com padrão de marcação esperado para o anticorpo anti-PanCK. Além disso, foram detectadas células esparsas com seus núcleos marcados, portanto, com padrão de marcação esperado para o anticorpo anti-GATA3 (Figura 8).

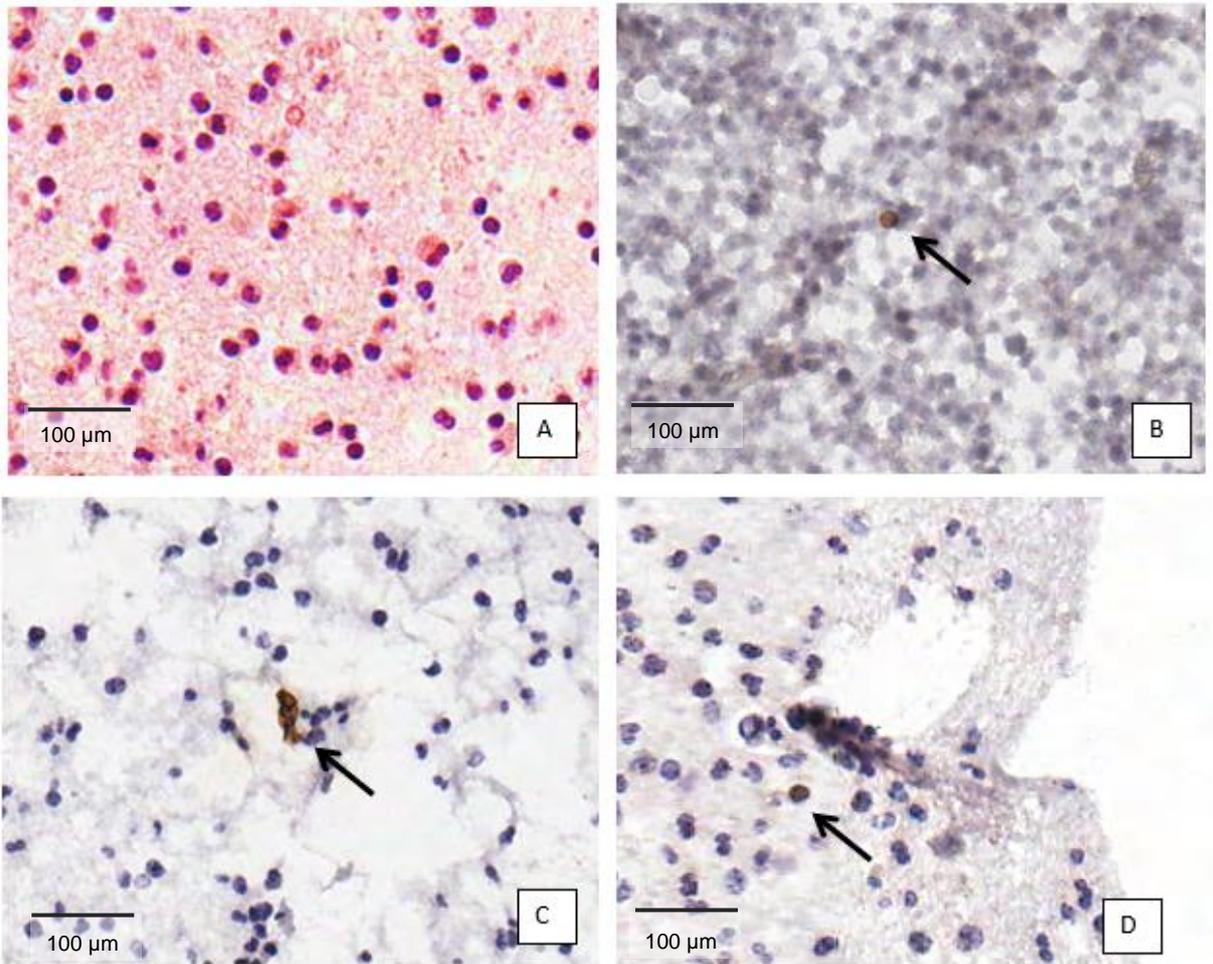


Figura 8. Amostras de sangue da paciente 63. Coloração HE em um corte de *cell-block* sem células suspeitas morfológicamente para carcinoma (A). Células suspeitas para células tumorais circulantes (nas setas) em B, C e D. Imunocitoquímica de amostra preparada por citocentrifugação com marcação para EpCAM (B). Imunocitoquímica em amostra do *cell-block* com marcação para PanCK (C) e GATA-3 (D). Aumento de 20X.

6. DISCUSSÃO

6.1 AMOSTRAS DE SANGUE COM LINHAGEM CELULAR

A detecção e caracterização molecular de células tumorais circulantes é uma das áreas mais ativas da pesquisa translacional do câncer, com muitos estudos clínicos utilizando CTCs como biomarcadores (ALIX-PANABIÈRES, PENTEL, 2012). Essas células contêm informações que podem influenciar o diagnóstico e prognóstico da doença, o tratamento e o monitoramento da doença residual (GOLD; CANKOVIC; FURTADO, 2015). Muitas tecnologias vêm sendo desenvolvidas para isso, mas ainda há a necessidade de técnicas mais baratas e acessíveis e de fácil e ampla executabilidade. Por isso, o presente estudo propôs avaliar duas técnicas bem estabelecidas e utilizadas na prática clínica, a citocentrifugação e o *cell-block*, como alternativa aos métodos convencionais de detecção de CTCs.

A técnica de citocentrifugação é utilizada para concentrar células que se encontram em suspensão em líquidos de baixa densidade celular. Através da centrifugação, essas células em suspensão se depositam sobre uma região das lâminas de vidro, formando uma monocamada de células que possibilita melhor análise citológica (CAPUTO; MOTA; GITIRANA, 2010; MULKALWAR et al., 2016).

Já a técnica de *cell-block* é um método bem utilizado para avaliação de fluidos corporais, em que pequenos fragmentos de tecido ou sedimentos em uma amostra de fluido são processados para formar um bloco de parafina (CAPUTO; MOTA; GITIRANA, 2010; MULKALWAR et al., 2016). É uma técnica comumente utilizada para preservação de células, permitindo o armazenamento mais longo do material de citologia e realização de estudos auxiliares, particularmente a imunocitoquímica, devendo ser utilizado de maneira complementar a citocentrifugação (MULKALWAR et al, 2016; DA CUNHA SANTOS, 2017).

A utilização dessas técnicas citológicas para detectar e caracterizar células tumorais circulantes vêm ganhando espaço e alguns estudos já demonstraram a viabilidade dessas técnicas na aplicação clínica da avaliação de CTCs. Lowe e seus colaboradores (2015), utilizando os métodos *ThinPrep®*, citocentrifugação e *cell-block* demonstraram que eles conseguiam recuperar células de linhagem de câncer de

mama quando adicionadas a amostras de sangue, sugerindo que as técnicas são viáveis para aplicação clínica. Nos estudos de Nam e colaboradores (2016) foi observado que o método *cell-block* com ágar permitiu a detecção das CTCs em amostras de sangue de pacientes com câncer de fígado. Haar (2018) avaliou a possibilidade de detecção de células tumorais de câncer de mama no sangue periférico através do método plasma-tromboplastina no preparo do *cell-block*, apresentando-o como um método alternativo e viável para detecção de CTCs. Mayall e seu colaboradores (2019) também observaram que as CTCs podem ser extraídas do sangue de alguns pacientes com carcinoma metastático e que a imunocitoquímica do *cell-block*, preparado através do processamento pela tecnologia Parsotix™, pode ser utilizada para demonstrar que as células tumorais circulantes têm características semelhantes às de biópsia de tumor.

Os dois métodos empregados neste trabalho resultaram em taxas de recuperação similares. A maior taxa de recuperação da citocentrifugação foi de 66% na concentração de 10 células/mL, onde eram esperadas 50 células e foram recuperadas 33 células. Já para o *cell-block*, a maior taxa de recuperação foi 73,56% para a concentração de 1.000 células/mL, onde eram esperadas 5.000 células e foram recuperadas 3.678 células. Neste trabalho, não foi possível recuperar células na menor concentração (1 célula/mL) com o uso de *cell-block*, porém pela citocentrifugação, recuperaram-se células em duas das três amostras nessa concentração: respectivamente, uma e duas células de cinco que eram esperadas em cada amostra (20-40%). Além disso, foram recuperadas células em todas as amostras com concentração de 10 células/mL ou maiores por ambas as técnicas.

Lowe e colaboradores (2015) obtiveram resultados similares, já que em baixas concentrações conseguiram recuperar as células adicionadas a algumas amostras, mas não em todas. Conseguiram recuperar 3 de 25 células que foram adicionadas à 8 mL de sangue para citocentrifugação e 2 de 100 células que foram adicionadas à 8 mL de sangue para *cell-block*. Porém, dentre as técnicas por ele utilizadas, foram recuperadas células em todas as amostras apenas nas que tiveram a adição de pelo menos 1000 células ao sangue. Comparativamente, os resultados aqui apresentados demonstram-se mais promissores e com melhor eficácia.

As taxas de recuperação aqui encontradas estão em conformidade com outros estudos que também compararam métodos utilizados para o isolamento de CTCs. As médias das taxas de recuperação foram de 33,95% para a citocentrifugação e 30,50% para o *cell-block*, valor próximo ao encontrado por Kallergi e colaboradores (2016), que recuperaram uma média de 39% de células com a citocentrifugação.

Em trabalho semelhante ao presente, Haar (2018) comparou o citocentrifugado e o *cell-block* preparado pelo método plasma-tromboplastina e observou que ocorreu um aumento de células positivas (recuperadas) à medida que a concentração de células aumentou (a concentração de células variou de 142,86 células/mL a 7.1428,57 células/mL). Porém, a recuperação de células nas duas técnicas foi baixa; a maior taxa de recuperação foi de 2,95% para amostras de citocentrifugação na concentração de 142,86 células/mL (29,5 contadas de 1.000 células esperadas), e 0,70% para as amostras de *cell-block*, na mesma concentração (7 células contadas de 1.000 esperadas). A obtenção de maior taxa de recuperação do presente estudo em relação ao estudo referido acima pode ter sobretudo origem técnica. No presente estudo, a fim de avaliar as duas técnicas quanto as taxas de recuperação, os experimentos de citocentrifugação e *cell-block* foram realizados de maneira independentes, sendo adicionadas quantidades iguais de células a 10 mL de sangue de doadores saudáveis para cada experimento e técnica, enquanto no de Haar, eram adicionadas as quantidades de células a 7 mL de sangue e então procedia-se à citocentrifugação, e sequencialmente ao *cell-block* com o volume restante da amostra processada. Outra diferença é que aqui todo o bloco obtido do *cell-block* foi seriado e cortado, sendo realizada imunocitoquímica, apenas com o anticorpo anti-PanCK, em metade das lâminas (todas as lâminas pares), enquanto Haar não analisou todo o bloco e sim apenas um corte de uma lâmina, fazendo uma extrapolação dos valores contados multiplicando por 100 para se obter a quantidade presente; além disso, ela utilizou diferentes anticorpos (RE e Claudin-4 além dos aqui utilizados), tendo diferentes marcações devido às características das linhagens.

A variação das taxas de recuperação em um mesmo experimentos deve-se principalmente à dificuldade usual de manipular e pipetar com precisão um número

baixo de células nas amostras de sangue, como também foi observado por Rierthdorf e seus colaboradores (2007) ao validarem o sistema *CellSearch*®.

6.2 AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Este estudo teve como um dos objetivos avaliar a viabilidade do uso da citocentrifugação e do *cell-block* para detectar células tumorais circulantes no sangue periférico de pacientes com câncer de mama. Embora a facilidade, o custo e o tempo de processamento sejam potencialmente uma melhor alternativa dentro da biópsia líquida para acompanhamento da doença, não foi possível gerar dados de quantificação de células tumorais circulantes nas amostras de sangue de pacientes.

Uma hipótese para a ausência de detecção de CTCs na maioria das pacientes neste trabalho é que para as amostras de sangue enriquecidas com células de linhagem, a citocentrifugação e o *cell-block* foram realizados de maneira independente, com coloração HE e imunocitoquímica em todas as lâminas obtidas do bloco. Já para as amostras de sangue de pacientes, os experimentos foram executados reproduzindo o que é feito na rotina de laboratórios clínicos de anatomia patológica, em que o *cell-block* é complementar e posterior à citocentrifugação. Na rotina de análise clínico-patológica, o bloco obtido não é totalmente seriado, sendo desgastada a parte inicial do bloco em que a amostra se encontra pequena, até chegar na parte em que a amostra está grande, proporcionando um corte maior e representativo. Faz-se então a imuno-histoquímica da lâmina com maior corte da amostra, e, havendo necessidade de reavaliação, corta-se novamente o bloco para fazer outras lâminas, como foi realizado neste estudo para os casos em que havia metástase à distância comprovada.

Outra hipótese é que, uma vez que cada mililitro de sangue contém 10^9 glóbulos vermelhos em comparação com quantidades de um ou dois dígitos de CTCs, alguns estudos apresentaram a possibilidade de que um pré-processamento das amostras de sangue, seja por centrifugação ou hemólise, poderia aumentar a pureza e capturar mais CTCs sem interferências (FERREIRA, RAMANI, JEFFREY, 2016; KALLERGI et al., 2016). Porém, também foi relatado que o uso desses métodos poderia causar perda de CTCs, diminuindo significativamente o número dessas células detectáveis em amostras de sangue (YU, 2014; FERREIRA, RAMANI, JEFFREY, 2016), podendo

então ser uma etapa dispensável, já que os eritrócitos não atrapalham a visualização e a contagem de células imunomarcadas (HAAR, 2016). Apesar de não ter sido encontrada lise importante nos testes aqui realizados com amostras de sangue enriquecidas com células de linhagem, pode ter havido uma perda de células durante o processamento das amostras das pacientes.

Por outro lado, o CellSearch® e muitas das técnicas utilizadas para a detecção de CTCs, dependem do uso de imunofluorescência para confirmar sua identificação (CRISTOFANILLI et al., 2004; LIANIDOU, MARKOU, 2011; IGNATIDIS, LEE, JEFFREY, 2015). NAM e seus colaboradores observaram que a coloração imunofluorescente pode apresentar limitações quanto a avaliação citológica de detalhes celulares, além do custo de equipamento para análise ser elevado e necessitar de treinamento para seu uso. Sendo assim, alguns estudos sugerem que a utilização de imunomarcagem sem fluorescência é uma alternativa mais barata e que permite superar essas limitações através da avaliação citomorfológica das células imunomarcadas e uma melhor caracterização de células individuais por múltiplas análises utilizando anticorpos adicionais (RIERTHDORF et al., 2007; NAM et al., 2016). Apesar de alguns estudos indicarem que o *cell-block* combinado com análise imunocitoquímica é uma técnica válida e específica para detecção de CTCs, esse método pode possuir limitações tanto na detecção de CTCs muito raras e fenotipicamente diversas, como também na quantificação dos números de CTC no sangue (HALL, VALAD, LUCCI, 2016; NAM et al., 2016), que pode ser uma justificativa para não ter sido possível detectar células na maioria das pacientes que participaram deste trabalho.

Consequentemente, como essas células ocorrem frequentemente em concentrações muito baixas, cerca de aproximadamente uma CTC por dez milhões de leucócitos em uma amostra de sangue de 7,5 mL (ALIX-PANABIÈRES, PENTEL, 2014), sua detecção e caracterização representam um desafio, semelhante a expressão “procurar uma agulha em um palheiro” (VAN-DER-TOOM, 2016). A ausência de CTCs na maioria das amostras de sangue das pacientes corrobora com ideia de que essas células estão presentes em baixíssimo número.

Cabe lembrar que enquanto o método de *CellSearch*® somente foi validado para pacientes com doença metastática, a maioria das pacientes que participaram deste estudo não estava em estágio avançado da doença, sendo que apenas quatro apresentavam metástase à distância comprovada. Além disso, apesar de 18,64% das pacientes terem apresentado invasão vascular confirmadas, não sendo especificado se invasão linfática ou sanguínea, o que seria de extrema importância para esse trabalho, não foi possível detectar células nas amostras dessas pacientes. Isso pode explicar a dificuldade de detecção dessas células no presente estudo, além de reforçar os achados de outros estudos. Liang, Hall e Lucci (2020) observaram que as CTCs podiam ser detectadas em 10 a 80% de pacientes com câncer de mama, dependendo do método de detecção escolhido e do estágio da doença. Além disso, vários estudos sugerem que as CTCs são encontradas em baixíssimo número em pacientes com câncer de mama metastático e em quantidades ainda menores em pacientes não metastáticos, saudáveis e com doença benigna da mama (CRISTOFANILLI et al., 2004, FUSI et al., 2012). Uma explicação alternativa para essa escassez de CTCs foi apresentada por TERAJ e colaboradores (2015), que concluíram que o sangue arterial, ao invés do venoso, seria o adequado para investigação de CTCs em pacientes de alguns tipos de câncer. O sangue venoso não apenas foi filtrado pelo pulmão, mas também transportado através das artérias para a rede capilar dos tecidos, antes de ser coletado (GRAY, 2015). Como as células tumorais circulantes são maiores que a maioria das células sanguíneas, menos deformáveis e frequentemente são encontradas circulando em aglomerados (ACETO et al, 2014), a passagem por esses capilares estreitos pode afetar significativamente essas células, que ali ficariam retidas. Além disso, os leitos capilares podem fornecer o ambiente adequado para a penetração do tecido por essas células, diminuindo sua quantidade circulante, e a baixa tensão de oxigênio e nutrientes no sangue venoso podem afetar as CTCs, comprometendo sua viabilidade celular (GRAY, 2015).

Outro fator que pode explicar a escassez dessas células nas amostras de pacientes, é que alguns estudos mostraram que a proporção de pacientes com CTCs detectadas no sangue antes e após a cirurgia, sem terapia adjuvante era maior quando comparada com a presença de CTCs no sangue coletado após terapia adjuvante (VAN DALUM et al., 2015). Neste estudo, apenas 25,42% das pacientes

não haviam recebido nenhum tipo de terapia até o momento da coleta, e das pacientes com diagnóstico de câncer, apenas 1,69% não haviam recebido qualquer tipo de tratamento adjuvante.

Outro objetivo deste trabalho era relacionar a quantidade de CTCs detectadas no sangue das pacientes com seus respectivos aspectos clínicos. Embora não tenha sido possível fazer essa correlação, visto que não foram gerados dados de quantificação dessas células no sangue das pacientes que participaram deste estudo, pôde-se descrever as principais características das pacientes com câncer de mama que foram atendidas no Hospital Universitário de Brasília, destacando-se aquelas mais comumente utilizadas como fatores prognósticos: tamanho do tumor, estado dos linfonodos regionais, grau do tumor, expressão dos receptores de estrogênio e progesterona e idade (PHUNG, TIN TIN, ELWOOD, 2019).

O tamanho do tumor e o estado dos linfonodos regionais se correlacionam com o risco de recorrência à distância, sendo que quanto maior o tumor e a presença de linfonodos envolvidos, maior a chance da doença se espalhar. O grau do tumor está correlacionado ao tamanho do tumor e o estado dos linfonodos, ajudando a categorizar os pacientes para melhorar a tomada de decisões terapêuticas (CIANFROCCA, GOLDSTEIN, 2004; PEIRIS et al., 2017). Neste estudo, houve o predomínio do estágio T2 (44,07%), indicando tumores com 2 cm a 5 cm de dimensão. No que se refere ao estado dos linfonodos regionais, 57,62% das pacientes apresentavam comprometimento de linfonodos axilares, prevalecendo pacientes classificadas como N1 (37,29%). Quanto ao grau, 40,68% dos carcinomas eram grau II, sendo seus tumores moderadamente diferenciados. Considerando essas três características, pode-se dizer que as estratégias adotadas pelo Ministério da Saúde nos últimos anos, como o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento de Doenças Crônicas não-transmissíveis (2011) e as Diretrizes para Detecção Precoce do Câncer de Mama (2015), têm sido eficazes, por essas pacientes estarem em estágios iniciais, representando um controle da doença e sua detecção precoce.

A presença de receptores de estrogênio e progesterona é tanto prognóstica quanto preditiva. É possível que a presença desses receptores preveja um tumor de crescimento mais lento, com longos tempos de recorrência da doença, além de ser

um poderoso fator preditivo para a probabilidade de benefício do tamoxifeno adjuvante (MAKKI, 2015). Com relação ao status dos receptores de estrogênio e progesterona, 84,75% das pacientes tinham RE positivo e 74,58% tinham PR positivo.

A taxa de incidência de câncer de mama aumenta com a idade, sendo que 95% dos novos casos ocorrem em mulheres com 40 anos ou mais (CHALASANI, 2021). As faixas de idades das pacientes com carcinomas invasivos que aqui prevaleceram foram a de 41-50 anos a de 51-60 anos de idade (30,51% e 37,29%, respectivamente).

Foram encontradas algumas estruturas passíveis de erro de interpretação morfológica, seja pela marcação pelo anticorpo ou pela reação com o cromógeno utilizado, que após diversas análises, foram classificadas como contaminantes e células com marcação inespecíficas.

Foram encontradas células epiteliais escamosas contaminantes positivas para PanCK tanto nas amostras de sangue de doadores saudáveis quanto nas amostras de sangue de pacientes. Isso pode ter acontecido por contaminação das amostras por células epiteliais da pele ou de glândulas anexas da pele no momento da coleta, que poderia ter sido evitada desprezando a primeira amostra coletada, similar ao que foi feito por Rierthdorf e colegas (2007).

Também, foram observadas estruturas fúngicas em algumas amostras de pacientes e isso pode ter ocorrido por ser um tipo de contaminação comumente encontrada na prática citopatológica (PANTANOWITZ, GOULART, MARTINEZ-GIRON, 2011; SHARMA, KUMAR, JAIN, 2014; MUZARATH et al., 2020). Uma variedade de grãos de pólen e esporos de fungos são transportados pelo ar, tendo contato com as lâminas de vidro através da contaminação de materiais de coleta ou equipamentos de laboratório (PANTANOWITZ, GOULART, MARTINEZ-GIRON, 2011). Bactérias e fungos podem crescer em corantes e em frascos de reagentes se essas áreas não forem limpas regularmente (SAMPIAS, 2021). Apesar da contaminação fúngica ser encontrada rotineiramente, devido à falta de familiaridade e experiência com esse tipo de contaminação, muitas vezes, elas passam despercebidas, são negligenciadas ou confundidas com outras estruturas de grande relevância (MUZARATH et al., 2020).

Além disso, em cinco amostras das pacientes, foram encontrados leucócitos com marcação inespecífica, o que se acredita não estar associado aos anticorpos

utilizados, devido às diferenças nos padrões de marcação dos anticorpos. O anticorpo anti-PanCK possui uma marcação intensa por todo o citoplasma da célula, obscurecendo até o núcleo, o que pode dificultar sua visualização. O anti-EpCAM (MOC-31) marca membrana, dando um realce fino a ela, podendo marcar um pouco de citoplasma. Já o anti-GATA-3 marca o núcleo das células. Em vista disso, acredita-se que essa marcação inespecífica esteja relacionada com a reação com o cromógeno utilizado na imunocitoquímica (DAB). Mesmo utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio em alta concentração para fazer o bloqueio da peroxidase endógena, pode ser que algumas dessas células marcadas tivessem um excesso de peroxidases, como foi observado por DANNENBERG e seus colegas (1994). Eles fizeram uma demonstração histoquímica da produção de peróxido por leucócitos em seções congeladas de lesões inflamatórias e observaram que os granulócitos (polimorfonucleares e eosinófilos) eram os principais tipos de células coradas pela reação do DAB. O excesso de H_2O_2 é um conhecido inibidor das peroxidases endógenas e seu efeito depende de sua concentração. Em baixas concentrações, o H_2O_2 pode aumentar o produto gerado na reação de DAB em granulócitos, uma vez que parte desse peróxido de hidrogênio permanece localmente e pode corar as células que o produziram de forma não específica, já em concentrações mais altas, reduz o produto da reação nos granulócitos por utilizar todo o H_2O_2 produzido nessas células. Uma alternativa para evitar esse fator passível de erro de interpretação morfológica pela reação com o DAB, seria substituí-lo por um cromógeno vermelho, que se liga ao anticorpo secundário que possui marcador fosfatase alcalina, ao invés da peroxidase, como feito por Jueckstock e seus colaboradores (2016) ao avaliarem a relevância prognóstica das CTCs, no sangue de pacientes com câncer de mama, realizando imunocitoquímica dos citocentrifugados obtidos.

Foram encontrados achados imunocitoquímicos suspeitos de células tumorais circulantes no sangue de uma paciente com câncer de mama metastático. Uma vez que as células tumorais circulantes em pacientes podem apresentar alterações morfológicas, incluindo células menores, com menos atipias citológicas do que as observadas em células de linhagem (LOWE et al., 2015) e morfologia de aspecto semelhante às das células do sangue, levou-se em consideração o padrão de marcação dos anticorpos utilizados. Na citocentrifugação, esses achados foram

positivos para o anticorpo anti-EpCAM (MOC-31), em que houve um realce fino de sua membrana, marcando também o citoplasma. No *cell-block*, houve positividade tanto para o anticorpo anti-PanCK, marcando o citoplasma das células, quanto para o anti-GATA-3, marcando o núcleo. Portanto, considerando os padrões de marcações que foram os esperados para estes anticorpos em carcinomas, inclusive nos metastáticos, e que não foram observadas estruturas fúngicas (como as leveduras, que poderiam ser confundidas com as células tumorais por serem arredondadas, com parede celular realçada e poderem ser encontradas em agregados), esses achados foram considerados suspeitos de serem células tumorais, havendo necessidade de mais testes em outras amostras de pacientes com câncer metastático para descrever como essas células se apresentam e poder confirmar sua detecção.

Em vista disso, a diferenciação dos contaminantes dos achados verdadeiramente positivos é extremamente importante e alguns fatores podem ser levados em consideração durante as análises, como por exemplo, morfologia, presença em todas as lâminas, localização da estrutura na borda da lâmina e um plano focal diferente do restante da amostra (PANTANOWITZ, GOULART, MARTINEZ-GIRON, 2011). Os contaminantes podem ser minimizados ou até evitados através do conhecimento das possíveis fontes intrínsecas, derivadas do próprio paciente, e fontes extrínsecas ou ambientais, seguido pelo seu rigoroso controle, além da implementação de medidas simples, como a preparação adequada do paciente antes da coleta da amostra, adesão a um protocolo operacional padrão em termos de coleta, preservação e processamento de amostras, preparação e manutenção adequadas de corantes e fixadores, manutenção da área de trabalho limpa e adesão às Boas Práticas Laboratoriais (MUZARATH et al., 2020).

Em suma, considerando-se que as CTCS ocorrem em baixas concentrações no sangue de pacientes (ALIX-PANABIÈRES, PENDEL, 2014), os achados deste trabalho sugerem que as técnicas aqui utilizadas são potencialmente viáveis para serem aplicadas na avaliação clínica de CTCs, uma vez que se obteve uma boa taxa de recuperação de células de linhagem em concentrações baixas.

Apesar do bom rendimento para a recuperação de células de linhagem, não foi possível gerar dados de quantificação de células tumorais circulantes nas amostras de pacientes, havendo necessidade de estudos adicionais. Dentre as limitações deste

estudo podemos citar, primeiramente, a quantidade de vezes que os experimentos foram realizados, necessitando de validação em amostras maiores, sendo realizadas no mínimo em quintuplicata, para uma análise comparativa com testes estatísticos. Também podemos levar em consideração que apenas quatro pacientes tinham metástase comprovada, sendo necessário um número maior de casos metastáticos para ser possível descrever essas células em pacientes. Além disso, considerando que pacientes que receberam tratamento prévio tendem a ter uma diminuição na quantidade de CTCs no sangue periférico, as pacientes que tenham sido submetidas a quimioterapia ou radioterapia deveriam ter sido excluídas, mesmo que isso diminuísse o número de amostras do estudo.

Por fim, apesar das limitações encontradas neste estudo, seus resultados podem ser considerados promissores, fornecendo incentivo para estudos adicionais e uma base para a futura aplicação de técnicas citológicas na rotina de CTCs.

7. CONCLUSÕES

Através da citologia e imunocitoquímica de amostras de sangue periférico preparadas por citocentrifugação e *cell-block* obteve-se resultados satisfatórios para a recuperação de células de linhagem de câncer de mama independentemente da técnica de preparo utilizada. A citocentrifugação e o *cell-block*, apesar de suas limitações, demonstraram serem técnicas potencialmente viáveis para sua aplicação na avaliação de sangue de pacientes com câncer metastático.

A ausência de detecção das células nas amostras de pacientes sem metástase à distância confirmada, demonstra que os métodos aqui empregados são mais apropriados para pacientes com câncer metastático, as quais apresentam maior número de células tumorais circulantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETO N., BARDIA A., MIYAMOTO D.T., DONALDSON M.C., WITTNER B.S., SPENCER J.A., YU M., PELY A., ENGSTROM A., ZHU H., BRANNIGAN B.W., KAPUR R., STOTT S.L., SHIODA T., RAMASWAMY S., TING D.T., LIN C.P., TONER M., HABER D.A., MAHESWARAN S. **Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis**. *Cell*. 2014 Aug 28;158(5):1110-1122. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.013. PMID: 25171411; PMCID: PMC4149753.

ALIMIRZAIIE S., BAGHERZADEH M., AKBARI M.R. **Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review**. *Clin Genet*. 2019 Jun;95(6):643-660. doi: 10.1111/cge.13514. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30671931.

ALIX-PANABIÈRES C., PANTEL K. **Challenges in circulating tumour cell research**. *Nat Rev Cancer*. 2014 Sep;14(9):623-31. doi: 10.1038/nrc3820. Epub 2014 Jul 31. PMID: 25154812.

ALIX-PANABIÈRES C., PANTEL K. **Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer**. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):110-8. doi: 10.1373/clinchem.2012.194258. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23014601.

ALLARD W.J., MATERA J., MILLER M.C., REPOLLET M., CONNELLY M.C., RAO C., TIBBE A.G., UHR J.W., TERSTAPPEN L.W. **Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases**. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897-904. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0378. PMID: 15501967.

AL-THOUBAITY F.K. **Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study**. *Ann Med Surg (Lond)*. 2019 Dec 6;49:44-48. doi: 10.1016/j.amsu.2019.11.021. PMID: 31890196; PMCID: PMC6926136.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <<https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp->

content/uploads/2020/09/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf>. Acesso em: 15 jul 2021.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//diretrizes_deteccao_precoce_cancer_mama_brasil.pdf>. Acesso em: 15 jul 2021.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020 Câncer: mama**. Incidência de câncer no Brasil. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>><http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 09 jul 2020.

BRAY F., FERLAY J., SOERJOMATARAM I., SIEGEL R.L., TORRE L.A., JEMAL A. **Global cancer statistics 2018**: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Lyon, França. CA Cancer Journal for Clinicians. 2018 Sep 12.

CASTRO-GINER F., ACETO N. **Tracking cancer progression**: from circulating tumor cells to metastasis. Genome Med. 2020 Mar 19;12(1):31. doi: 10.1186/s13073-020-00728-3. PMID: 32192534; PMCID: PMC7082968.

CHALASANI, P. **Breast cancer**. Medscape, 2021. Disponível em: <<https://emedicine.medscape.com/article/1947145-overview#a7>>. Acesso em: 23 de jun. de 2021.

CIANFROCCA M., GOLDSTEIN L.J. **Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer**. Oncologist. 2004;9(6):606-16. doi: 10.1634/theoncologist.9-6-606. PMID: 15561805.

CRISTOFANILLI M., BUDD G.T., ELLIS M.J., STOPECK A., MATERA J., MILLER M.C., REUBEN J.M., DOYLE G.V., ALLARD W.J., TERSTAPPEN L.W., HAYES D.F.

Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. Houston, Texas. The New England Journal of Medicine. 2004 Aug19;351(8):781-91.

CSERNI G. **Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time.** Pathologica. 2020 Mar;112(1):25-41. doi: 10.32074/1591-951X-1-20. PMID: 32202537.

CURTIS C. et al. **The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups.** Nature. 2012 Apr 18;486(7403):346-52. doi: 10.1038/nature10983. PMID: 22522925; PMCID: PMC3440846.

DA CUNHA SANTOS G., SAIEG M.A. **Preanalytic specimen triage:** Smears, cell blocks, cytopsin preparations, transport media, and cytobanking. Cancer Cytopathol. 2017 Jun;125(S6):455-464. doi: 10.1002/cncy.21850. PMID: 28609003.

DANNENBERG A.M.J.R., SCHOFIELD B.H., RAO J.B., DINH T.T., LEE K., BOULAY M., ABE Y., TSURUTA J., STEINBECK M.J.. **Histochemical demonstration of hydrogen peroxide production by leukocytes in fixed-frozen tissue sections of inflammatory lesions.** J Leukoc Biol. 1994 Oct;56(4):436-43. doi: 10.1002/jlb.56.4.436. PMID: 7930939.

EIGELIENE N., SAARENHEIMO J., JEKUNEN A. **Potential of Liquid Biopsies for Breast Cancer Screening, Diagnosis, and Response to Treatment.** Oncology. 2019;96(3):115-124. doi: 10.1159/000495615. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30654364.

EPSTEIN M., MA Y., PRESS M F. **ERBB2 TESTING:** assessment of status for targeted therapies. In: Harris J.R., Lippman M.E., Morrow M., Osbourne C.K., editors. Diseases of the breast. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins; pp. 431-42.

FERREIRA M.M., RAMANI V.C., JEFFREY S.S. **Circulating tumor cell technologies.** Mol Oncol. 2016 Mar;10(3):374-94. doi: 10.1016/j.molonc.2016.01.007. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26897752; PMCID: PMC5528969.

FERRINGER T., KO C.J. The basics: Diagnostic terms, skin anatomy, and stains. In: ELSTON, D.M. (Ed). **Dermatopathology** (Second Edition). Elsevier, 2014. P. 1-36.

FUSI A., LIU Z., KÜMMERLEN V., NONNEMACHER A., JESKE J., KEILHOLZ U. **Expression of chemokine receptors on circulating tumor cells in patients with solid tumors.** J Transl Med. 2012;10:52. Published 2012 Mar 20. doi:10.1186/1479-5876-10-52

GOLD B., CANKOVIC M., FURTADO L.V., et al. **Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility?** A report of the association for molecular pathology. Baltimore, Maryland. Elsevier. 2015; 17(3):209–224.

GOLDHIRSCH A., WOOD W.C., COATES A.S., GELBER R.D., THURLIMANN B., SENN H.J. **Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer:** highlights of the ST. Gallen International expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. Annals of Oncology. 2011 Aug 22;(8):1736-1747. DOI:

HAAR, N.V. **Detecção de células tumorais circulantes de câncer de mama pelo método *cell block*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília. 2018.

GRAY E.S. **Arterial or Venous:** Where Are the Circulating Tumor Cells? EBioMedicine. 2015 Sep 16;2(11):1596-7. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.09.029. PMID: 26870782; PMCID: PMC4740319.

HALL C., VALAD L., LUCCI A. **Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients.** Crit Rev Oncog. 2016;21(1-2):125-39. doi: 10.1615/CritRevOncog.2016016120. PMID: 27481009.

HAMMOND M.E. et al. **American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.** J Clin Oncol. 2010 Jun 1;28(16):2784-95. DOI: 10.1200/jco.2009.25.6529. EPUB 2010 Apr 19. Erratum in: j clin oncol. 2010 Jul 20;28(21):3543. Pmid: 20404251; pmcid: pmc2881855.

HOON D.S., BOSTICK P., KUO C., OKAMOTO T., WANG H.J., ELASHOFF R., MORTON D.L. **Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence.** Cancer Res. 2000 Apr 15;60(8):2253-7. PMID: 10786692.

HORTOBAGYI G.N., CONNOLLY J.L., D'ORSI C.J. **American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual**. Breast. In: Amin MB, editor. 8th edn. New York: Springer, 2017;589–28

IGNATIADIS M. et al. **Different prognostic value of cytokeratin-19 mRNA positive circulating tumor cells according to estrogen receptor and HER2 status in early-stage breast cancer**. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5194-202. doi: 10.1200/JCO.2007.11.7762. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17954712.

IGNATIADIS M. et al. **Prognostic value of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer**. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1;14(9):2593-600. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4758. PMID: 18451221.

IGNATIADIS M. et al. **Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility**. *Clin Cancer Res*. 2015 Nov 1;21(21):4786-800. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1190. PMID: 26527805.

KALINOWSKI L., SAUNUS J.M., MCCART REED A.E., LAKHANI S.R. **Breast Cancer Heterogeneity in Primary and Metastatic Disease**. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1152:75-104. doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_6. PMID: 31456181.

KALLERGI G., POLITAKI E., ALKAHTANI S., STOURNARAS C., GEORGOULIAS V. **Evaluation of Isolation Methods for Circulating Tumor Cells (CTCs)**. Héraklion, Grécia. *Cell Physiology and Biochemistry*. 2016;40(3-4):411-419.

KARACHALIOU, N.; MAYO-DE-LAS-CASAS, C.; MOLINA-VILA, M. A.; ROSELL, R. **Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment**. Barcelona, Espanha. *Annals of Translational Medicine* 2015; v. 3(3):36.

KRASINSKAS A.M., GOLDSMITH J.D. Immunohistology of the Gastrointestinal Tract. In: DABBS D.J. (Ed). **Diagnostic Immunohistochemistry**. Elsevier, 2011. P. 500–540.

KOUROS-MEHR H., SLORACH E.M., STERNLICHT M.D., WERB Z. **GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland**. *Cell*. 2006;127(5):1041-1055. doi:10.1016/j.cell.2006.09.048

KSIAZKIEWICZ M., MARKIEWICZ A., ZACZEK A.J. **Epithelial-mesenchymal transition**: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology*. 2012;79(4):195-208. doi: 10.1159/000337106. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22488297.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K; ASTER, J.C.; Robbins, **Patologia Básica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap. 5.

LAKHANI S.R., ELLIS I.O., SCHNITT S.J., TAN P.H., VAN DE VIJVER M.J. **WHO Classification of Tumours of the Breast**. International Agency for Research on Cancer: Lyon 2012. ISBN 9789283244899. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat07259a&AN=unb.EBC4661025&lang=pt-br&site=eds-live>>. Acesso em: 26 jan. 2021.

LI D., WANG B., HU Q., SHEN Y., XU D., WANG T., WEN F. **Diagnostic accuracy of MOC-31 for malignant effusions**: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014 Jun;35(6):6003-9. doi: 10.1007/s13277-014-1795-2. Epub 2014 Mar 8. PMID: 24609803.

LIANG D.H., HALL C., LUCCI A. **Circulating Tumor Cells in Breast Cancer**. *Recent Results Cancer Res*. 2020;215:127-145. doi: 10.1007/978-3-030-26439-0_7. PMID: 31605227.

LIANIDOU E.S., MARKOU A. **Circulating tumor cells in breast cancer**: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clin Chem*. 2011 Sep;57(9):1242-55. doi: 10.1373/clinchem.2011.165068. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21784769.

LIANIDOU, E.S.; STRATI, A.; MARKOU, A. **Circulating tumor cells as promising novel biomarkers in solid cancers**. Atenas, Grécia. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014; 51: 160-171.

LOWE A.C., PIGNON J.C., CARVO I., DRAGE M.G., CONSTANTINE N.M., JONES N., KROLL Y., FRANK D.A., SIGNORETTI S., CIBAS E.S. **Young investigator challenge**: Application of cytologic techniques to circulating tumor cell specimens:

Detecting activation of the oncogenic transcription factor STAT3. *Cancer Cytopathol.* 2015 Dec;123(12):696-706. doi: 10.1002/cncy.21640. PMID: 26671736.

MAKKI J. **Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance.** *Clin Med Insights Pathol.* 2015 Dec 21;8:23-31. doi: 10.4137/CPath.S31563. PMID: 26740749; PMCID: PMC4689326.

MASSIHANIA D. et al. **A headlight on liquid biopsies: a challenging tool for breast cancer management.** *Tumour Biol.* 2016 Apr;37(4):4263-73. doi: 10.1007/s13277-016-4856-x. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26790442.

MAYALL F.G., PEPPERELL J., BODGER I., HIGBEE D., STEVANATO L., HUSTLER A., MUMFORD K.M. **Cytology and cell-block immunohistochemistry of circulating tumour cells.** *Cytopathology.* 2019 Nov;30(6):620-627. doi: 10.1111/cyt.12770. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31461195; PMCID: PMC6899935.

MOTA E.M., GITIRANA L.B. **Técnicas citológicas.** In: CAPUTO, L.F.G. (Ed.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.* Rio de Janeiro, Brasil. Instituto Oswaldo Cruz, 2010. p. 190-231.

MENON S.S., GURUVAYOORAPPAN C., SAKTHIVEL K.M., RASMI R.R. **Ki-67 protein as a tumour proliferation marker.** *Clin Chim Acta.* 2019 Apr; 491:39-45. doi: 10.1016/j.cca.2019.01.011. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30653951.

MULKALWAR M., CHANDRAKAR J., KUJUR P., GAHINE R., SWARNAKAR S., BHASKAR L.V.K.S.. **Diagnostic utility of cell block method versus cytopspin method in pleural and peritoneal fluid cytology.** *Journal of Medical Science and Clinical Research.* 2016 Nov; 4(11):13726-13732. Doi:10.18535/jmscr/v4i11.37.

MUZARATH S., NANDYAL S.S., BINDU B.J., MURTHY C.N. **Contaminants and Mimickers in Cytopathology.** *J Cytol.* 2020;37(3):131-135. doi:10.4103/JOC.JOC_159_19.

NAM S.J., YEO H.Y., CHANG H.J., KIM B.H., HONG E.K., PARK J.W. **A New Cell Block Method for Multiple Immunohistochemical Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Liver Cancer.** *Cancer Res Treat.* 2016 Oct;48(4):1229-1242.

doi: 10.4143/crt.2015.500. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27034142; PMCID: PMC5080828.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **NCI Dictionary of Cancer Terms**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=779095>>. Acesso em: 29 jan 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Health Observatory**. Geneva: World Health Organization; 2018. Disponível em: <www.who.int/gho/database/en/>. Acesso em: 05 nov, 2018 10 jul, 2020.

PANTANOWITZ L., GOULART R.A., MARTINEZ-GIRON R. **Mimics and contaminants**. In: Ali Syed Z, Clark DP, Erozan SY, editors. *Cytopathology of Infectious diseases*. 2012 ed. NewYork: Springer; 2011. pp. 351–77.

PEIRIS H., MUDDUWA L., THALAGALA N., JAYATIALAKE K. **The value of Nottingham grade in breast cancer re-visited in the Sri Lankan setting**. Malays J Pathol. 2017 Aug;39(2):141-148. PMID: 28866695.

PEROU C.M. et al. **Molecular portraits of human breast tumours**. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. doi: 10.1038/35021093. PMID: 10963602.

PHUNG M.T., TIN TIN S., ELWOOD J.M. **Prognostic models for breast cancer: a systematic review**. BMC Cancer. 2019 Mar 14;19(1):230. doi: 10.1186/s12885-019-5442-6. PMID: 30871490; PMCID: PMC6419427.

POULET G., MASSIAS J., TALY V. **Liquid Biopsy: General Concepts**. Acta Cytol. 2019;63(6):449-455. doi: 10.1159/000499337. Epub 2019 May 15. PMID: 31091522.

RIETHDORF S., FRITSCHÉ H., MÜLLER V., RAU T., SCHINDLBECK C., RACK B., JANNI W., COITH C., BECK K., JÄNICKE F., JACKSON S., GORNET T., CRISTOFANILLI M., PANTEL K. **Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system**. Hamburgo, Alemanha. Clinical Cancer Research. 2007 Feb 1;13(3):920-8.

ROSEN R.D., SAPRA A. **TNM Classification** [Updated 2021 Feb 23]. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553187/>>. Acesso em: 16 abr. 2021.

SAMPIAS, C. **H&E Basics Part 4: Troubleshooting H&e**. Leica Biosystems, 2021. Disponível em: <<https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/he-basics-part-4-troubleshooting-he/>>. Acesso em: 29 jun. 2021.

SAWAKI M., SHIEN T., IWATA H. **TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group)**. *Jpn J Clin Oncol*. 2019 Mar 1;49(3):228-231. doi: 10.1093/jjco/hyy182. PMID: 30541035.

SHARMA P., KUMAR N., JAIN S. **Fungal contaminants in cytopathology specimens**. *Biomed J*. 2014 Jan-Feb;37(1):31-2. doi: 10.4103/2319-4170.117898. PMID: 24667676.

SLAMON D.J., CLARK G.M., WONG S.G., LEVIN W.J., ULLRICH A., MCGUIRE W.L. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene**. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82. doi: 10.1126/science.3798106. PMID: 3798106.

SOBECKI M., MROUJ K., COLINGE J., GERBE F., JAY P., KRASINSKA L., DULIC V., FISHER D. **Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels**. *Cancer Res*. 2017 May 15;77(10):2722-2734. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0707. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28283655.

SOUHAMI R.L., BEVERLEY P.C., BOBROW L.G., LEDERMANN J.A. **Antigens of lung cancer: results of the second international workshop on lung cancer antigens**. *J Natl Cancer Inst*. 1991 May 1;83(9):609-12. doi: 10.1093/jnci/83.9.609. PMID: 2023279.

STATHOPOULOU A. et al. **Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance**. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3404-12. doi: 10.1200/JCO.2002.08.135. PMID: 12177100.

TERAI M., MU Z., ESCHELMAN D.J., GONSALVES C.F., KAGEYAMA K., CHERVONEVA I., ORLOFF M., WEIGHT R., MASTRANGELO M.J., CRISTOFANILLI M., SATO T. **Arterial Blood, Rather Than Venous Blood, is a Better Source for**

Circulating Melanoma Cells. EBioMedicine. 2015 Sep 18;2(11):1821-6. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.09.019. PMID: 26870807; PMCID: PMC4740300.

TORRE L., BRAY F., SIEGEL R., FERLAY J., LORTET-TIEULENT J., JEMAL A. **Global cancer statistics, 2012.** CA Cancer J Clin. 2015;65(1):87–108.

TSANG J.Y.S., TSE G.M. **Molecular Classification of Breast Cancer.** Adv Anat Pathol. 2020 Jan;27(1):27-35. doi: 10.1097/PAP.000000000000232. PMID: 31045583.

URRUTICOECHEA A., SMITH I.E., DOWSETT M. **Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer.** J Clin Oncol. 2005 Oct 1;23(28):7212-20. doi: 10.1200/JCO.2005.07.501. PMID: 16192605.

VAN DALUM G., VAN DER STAM G.J., TIBBE A.G., FRANKEN B., MASTBOOM W.J., VERMES I., DE GROOT M.R., TERSTAPPEN L.W. **Circulating tumor cells before and during follow-up after breast cancer surgery.** Int J Oncol. 2015 Jan;46(1):407-13. doi: 10.3892/ijo.2014.2694. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25339612.

VAN DER TOOM E.E., VERDONE J.E., GORIN M.A., PIENTA K.J. **Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells.** Oncotarget. 2016 Sep 20;7(38):62754-62766. doi: 10.18632/oncotarget.11191. PMID: 27517159; PMCID: PMC5308763.

VODUC D., CHEANG M., NIELSEN T. **GATA-3 expression in breast cancer has a strong association with estrogen receptor but lacks independent prognostic value.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Feb;17(2):365-73. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-1090. PMID: 18268121.

VODUC D., CHEANG M., NIELSEN T. **Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse.** J Clin Oncol. 2010 Apr 1;28(10):1684-91. doi: 10.1200/JCO.2009.24.9284. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20194857.

WU S., LIU S., LIU Z., HUANG J., PU X., LI J., YANG D., DENG H., YANG N., XU J. **Classification of circulating tumor cells by epithelial-mesenchymal transition markers.** PLoS One. 2015 Apr 24;10(4):e0123976. doi: 10.1371/journal.pone.0123976. PMID: 25909322; PMCID: PMC4409386.

XENIDIS N. et al. **Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer.** *Ann Oncol.* 2003 Jun;14(6):849-55. doi: 10.1093/annonc/mdg259. PMID: 12796021.

XENIDIS N. et al. **Predictive and prognostic value of peripheral blood cytokeratin-19 mRNA-positive cells detected by real-time polymerase chain reaction in node-negative breast cancer patients.** *J Clin Oncol.* 2006 Aug 10;24(23):3756-62. doi: 10.1200/JCO.2005.04.5948. Epub 2006 Jun 12. PMID: 16769987.

XENIDIS N. et al. **Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2009 May 1;27(13):2177-84. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0497. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19332733.

YAM C., MANI S.A., MOULDER S.L. **Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field.** *Oncologist.* 2017 Sep;22(9):1086-1093. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0095. Epub 2017 May 30. PMID: 28559413; PMCID: PMC5599192.

YU M. et al. Cancer therapy. **Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility.** *Science.* 2014 Jul 11;345(6193):216-20. doi: 10.1126/science.1253533. PMID: 25013076; PMCID: PMC4358808.

ZHANG X., JU S., WANG X., CONG H. **Advances in liquid biopsy using circulating tumor cells and circulating cell-free tumor DNA for detection and monitoring of breast cancer.** *Clin Exp Med.* 2019 Aug;19(3):271-279. doi: 10.1007/s10238-019-00563-w. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31190187.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TAMPÃO DE HEMÓLISE

- Cloreto de Amônio - NH_4Cl (145 mM);
- Bicarbonato de Amônio - NH_4HCO_3 (10mM);
- Completar o volume com água destilada para 2 L;
- Autoclavar e armazenar em frasco âmbar a 4°C.

APÊNDICE B – HEMATOXILINA DE HARRIS

- Hematoxilina 0,48% (p/v);
- Álcool absoluto 4,8% (v/v);
- Alúmen de potássio - $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ (384 mM);
- Óxido de Mercúrio - HgO (11 mM);
- Completar o volume com água destilada para 1.050 mL;
- Dissolver a hematoxilina no álcool e o alúmen em água destilada, aquecendo sem ferver. Após completa homogeneização, misturar as duas soluções e aquecer essa mistura até a ebulição. Colocar o óxido de mercúrio lentamente, com a solução fora do aquecimento. Agitar bem e voltar a mistura ao aquecimento até que ele obtenha a cor púrpura. Esfriar e misturar imediatamente, em banho de água fria. Guardar a solução em frasco âmbar.

APÊNDICE C – CORANTE *ORANGE-G*

Solução estoque de *Orange-G* 10%

- *Orange-G* - 10% (m/v);
- Completar o volume com água destilada para 100 mL.

Solução de uso do *Orange-G*:

- Solução estoque 2% (v/v);
- Ácido fosfotúngstico - $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ (0,0624 mM);
- Etanol 95% - 98%(v/v).

APÊNDICE D – CORANTE EA-65

Soluções estoque eosina Y a 20%:

- Eosina Y 20% (m/v) em água destilada.

Solução estoque verde luz SF a 3%:

- Verde luz SF 3% (p/v) em água destilada.

Solução de uso do EA-65:

- Solução estoque de eosina Y - 2% (v/v);
- Solução estoque de verde luz SF- 1% (v/v);
- Ácido fosfotúngstico – $H_3P(W_3O_{10})_4$ (0,832 mM);
- Etanol 95% - 70% (v/v);
- Metanol absoluto- 25% (v/v);
- Ácido acético glacial- 2% (v/v);

APÊNDICE E – FORMOL SALINO 0,9%

- Formaldeído - 10% (v/v);
- Cloreto de sódio NaCl – 0,9% (m/v);
- Completar o volume com água destilada para 1L.

APÊNDICE F – EOSINA

Solução alcoólica a 1% (estoque):

- 1g de eosina Y, solúvel em água;
- 20 mL de água destilada;
- 80 mL de álcool 95%.

Solução de uso:

- 1 parte de eosina Y (estoque);
- 3 partes de álcool a 80%;
- Imediatamente, antes do uso, adicionar 0,5 mL de ácido acético glacial para cada 100 mL desta solução.

APÊNDICE G – SOLUÇÃO DE RECUPERAÇÃO

Tampão citrato:

- Ácido cítrico mono-hidratado - $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ (12mM);
- Completar o volume com de água destilada para 1L;
- Ajustar o pH para 6 e armazenar em geladeira.

Preparo da solução de recuperação:

- 250 mL de Tampão citrato;
- Polissorbato 20 – 0,002% v/v.

APÊNDICE H – TAMPÃO DE LAVAGEM

Preparo do Tris 0,2 M:

- Tris (hidroximetil) aminometano (200mM);
- 1 L de água destilada;
- Guardar em geladeira

Preparo do Tris pH 7,3:

- Tris (0,2 M);
- 150 mL de Água destilada;
- HCl (N/10);
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira.

Preparo do tampão TBS:

- Tris pH 7,3 – 11% v/v;
- 4,5 L de Água destilada;
- 38,25 g de Cloreto de Sódio (NaCl) (146,5 mM);
- Ajustar para pH 7,3 e conservar em geladeira.

Preparo do tampão de lavagem:

- 500 mL de TBS;
- Polissorbato 20 – 0,001% (v/v);
- Armazenar em geladeira.

APÊNDICE I – PARÂMETROS CLÍNICOS DAS PACIENTES

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
1	45	36	Invasivo	Ductal	3	T3N1M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67 90%	Pós	Mastectomia	QT + RT
2	51	35	Invasivo	Ductal	1	T3N0M0	ER 95%, PR 40%, HER2-, Ki67 25%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
3	74	34	Invasivo	Ductal	1	T2N0M0	ER 95%, PR 95%, HER2-, Ki67 20%	Sim	Não	Antes	Conservadora	RT + HT
4	63	19	<i>In situ</i>	Ductal	...	T1N0M0	ER 90%, PR 80%, HER2 3+, Ki67 40%	Antes	Ambas	HT
5	58	31	Invasivo	Ductal	1	T1N1M0	ER 90%, PR 90%, HER2-, Ki67 8%	Não	Não	Antes	Conservadora	QT + RT + HT
6	58	31	Invasivo	Ductal	2	T2N1M0	ER 95%, PR 95%, HER2 1+, Ki67 20%	Sim	Não	Antes	Conservadora	QT + RT + HT
7	51	28	Invasivo	Ductal e lobular	3	T3N1M0	ER 70%, PR 40%,	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
							HER2-, Ki67 40%					
8	41	14	Invasivo	Ductal	2	T4N2M0	ER 90%, PR 60%, HER2 +1, Ki67 30/40%	Sim	Não	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
9	54	19	Invasivo	Ductal	2	T2N2MX	ER 90%, PR 20%, HER2-, Ki67 15%	Sim	Não	Antes	Conservadora	QT + RT + HT
10	47	0	Sem malignidade	x	x	x	x	x	x	x	Conservadora	x
11	63	25	<i>In situ</i>	Ductal	2	T3N0M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67 5%	Não	Não	Antes	Ambas	Sem tratamento adjuvante
12	44	23	<i>In situ</i>	Ductal	2	T2N0M0	ER 75%, PR 99%, HER2-, Ki67 5%	Antes	Conservadora	RT + HT
13	41	26	Invasivo	Ductal	3	T4N1M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67 70%	Sim	Não	Pós	Mastectomia	QT + RT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
14	48	26	Invasivo	Ductal	3	T4N2M1	ER-, PR-, HER2-, Ki67 20%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
15	56	25	Invasivo	Ductal	3	T3N1M0	ER 90%, PR 80%, HER2-, Ki67 70%	Sim	Não	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
16	63	23	Invasivo	Ductal	...	T4N1M0	ER 100%, PR 10%, HER2 2+, Ki67 30%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
17	74	1	Invasivo	Lobular	2	T2N0M0	ER 100%, PR <1%, HER2-, Ki67 7-10%	Não	Não	...	Mastectomia	...
18	40	31	Sem malignidade	x	x	x	x	x	x	x	Outra	x
19	66	0	Sem malignidade	x	x	x	x	x	x	x	Conservadora	x
21	60	24	Invasivo	Ductal e lobular	...	T1N1MX	ER 90%, PR 35%, HER2-, Ki67 10%	Não	Não	Antes	Conservadora	RT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
22	50	21	Invasivo	Ductal	2	T1N0M0	ER 90%, PR 100%, HER2-, Ki67 15%	Antes	Conservadora	RT + HT
23	59	16	Invasivo	Ductal	2	T2N0MX	ER 90%, PR-, HER2-, Ki67 5%	Não	Sim	Antes	Conservadora	RT + HT
24	47	21	Invasivo	Ductal	3	T4N1M0	ER 10%, PR 1%, HER2-, Ki67 70%	Não	Não	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
25	46	22	Invasivo	Ductal e medular	3	T2N0M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67+	Não	Não	Antes	Conservadora	Sem tratamento adjuvante
26	60	19	Sem malignidade	x	x	x	x	x	x	x	Conservadora	x
27	63	20	Invasivo	Ductal	1	T2N0M0	ER 100%, PR 95%, HER2-, Ki67 30%	Não	Não	Antes	Mastectomia	HT
28	47	22	Invasivo	Ductal	3	T3N2M0	ER 90%, PR 5%, HER2-, Ki67 30%	Não	Não	Antes	Conservadora	QT + RT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
29	52	8	Invasivo	Ductal	3	T3N0M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67 30%	Não	Não	Pós	Mastectomia	QT + RT
30	34	0	Sem malignidade	x	x	x	x	x	x	x	Conservadora	x
31	64	19	Invasivo	Ductal	3	T4N1MX	ER 100%, PR 70%, HER2 2+, Ki67 20%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
32	41	20	Invasivo	Ductal	1	T3N0M0	ER 100%, PR 1%, HER2-, Ki67 10%	Não	Não	Pós	Mastectomia	QT + HT
33	65	7	Invasivo	Ductal e lobular	2	T4N0M0	ER 100%, PR-, HER2-, Ki67 50%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
34	63	21	<i>In situ</i>	Ductal	2	T3N0M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67 5%	Não	...	Antes	Ambas	Sem tratamento adjuvante
35	65	18	Invasivo	Ductal	...	T1N0M0	ER 90%, PR 90%, HER2-	Pós	Conservadora	RT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
36	62	15	Invasivo	Ductal	3	T2N1M0	ER 70%, PR 70%, HER2-, Ki67 30%	Sim	Não	Pós	Ambas	QT + RT
37	43	20	Invasivo	Ductal	2	T1N1M0	ER 95%, PR 30%, HER2-, Ki67 40%	Não	Não	Antes	Conservadora	QT + RT + HT
38	48	20	Invasivo	Ductal	3	T3N0MX	ER 20%, PR 60%, HER2-, Ki67 5%	Não	Sim	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
39	46	2	T2N2MX	ER-, PR 20%, HER2-, Ki67 90%	Pós	Conservadora	QT + RT
40	69	17	Invasivo	Lobular	2	T2N0MX	ER 90%, PR 60%, HER2 2+, Ki67 2%	...	Sim	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
41	49	16	Sem malignidade	x	x	x	x	x	x	x	Conservadora	x
42	41	19	Invasivo	Ductal	2	T3N1M0	ER 100%, PR 95%, HER2 3+, Ki67 20%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
43	44	0	Conservadora	...
44	64	1	Invasivo	Lobular	2	T2N0MX	ER 90%, PR 10%, HER2-, Ki67 10%	Antes	Mastectomia	HT
45	43	18	Invasivo	Ductal	3	T2N2M0	ER 10%, PR 5%, HER2 1+, Ki67 60-80%	Sim	Não	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
46	54	15	<i>In situ</i>	Ductal	...	T1N0MX	ER+, PR+, HER2 3+	Pós	Ambas	QT + RT + HT
48	58	15	Invasivo	Ductal	2	T2N2MX	ER 90%, PR 1%, HER2-, Ki67 10%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
49	36	17	Invasivo	Ductal	2	T2N1M1	ER 20%, PR 70%, HER2-, Ki67 20%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
50	56	15	Invasivo	Ductal	2	T3N0M0	ER+, PR+, HER2-	Pós	Mastectomia	QT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
51	55	12	Invasivo	Ductal	...	T2N2M0	ER 5%, PR 5%, HER2-, Ki67 10%	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
52	64	15	Invasivo	Ductal	2	T1N0MX	ER 100%, PR 100%, HER2-, Ki67 20%	Não	Não	Pós	Conservadora	RT + HT
53	62	17	Invasivo	Ductal	1	T2N1M0	ER 60%, PR 40%, HER2-, Ki67 5-10%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
54	63	12	Invasivo	Ductal	3	T1N2M0	ER 95%, PR 70%, HER2-, Ki67 30%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
55	54	0	Invasivo	Ductal	...	T2N2M0	ER-, PR-, HER2-	Pós	Ambas	QT + RT + HT
56	42	15	Invasivo	Ductal	2	T2N0M0	ER 50%, PR 50%, HER2-, Ki67 25%	Sim	Sim	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
57	45	11	Invasivo	Ductal	1	T3N3M0	ER 95%, PR 70%, HER2-, Ki67 60%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
58	63	16	Invasivo	Ductal	...	T4N2M0	ER 90%, PR-, HER2 3+, Ki67 30%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
59	48	5	Invasivo	Micropapilar	2	T2N1M0	ER 100%, PR 100%, HER2-, Ki67 10%	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
60	53	16	Invasivo	Ductal	3	T2N1M0	ER 80%, PR 40%, HER2-, Ki67 80%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
61	44	12	<i>In situ</i>	Ductal	2	N0	Antes	Mastectomia	Sem tratamento adjuvante
62	52	11	Invasivo	Ductal	1	T2N0MX	ER 5%, PR-, HER2-, Ki67 25%	Não	Não	Antes	Mastectomia	HT
63	49	17	Invasivo	Ductal e lobular	1	T1N2M1	ER-, PR-, HER2-, Ki67 40%	Pós	Ambas	QT + RT + HT
64	57	14	Invasivo	Ductal	2	T2N0M0	ER 97%, PR 60%, HER2 3+, Ki67 60%	Não	Não	Pós	Mastectomia	QT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
65	77	16	Invasivo	Ductal	2	T2N1M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67 30%	Pós	Mastectomia	QT + RT
66	51	0	<i>In situ</i>	Ductal	Antes	Mastectomia	Sem tratamento adjuvante
67	56	14	Invasivo	Lobular	1	T2N0M0	ER 95%, PR 90%, HER2-, Ki67 5%	Não	Não	Pós	Conservadora	QT + RT + HT
68	37	15	Invasivo	Ductal	Não avaliado	T3N1M1	ER 15%, PR 20%, HER2 3+, Ki67 10%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
69	51	15	Invasivo	Ductal	3	T3N1M0	ER 90%, PR-, HER2 3+, Ki67 20%	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
70	54	5	Invasivo	Ductal	2	M0	ER 90%, PR 70%, HER2 2+, Ki67 30%	Não	...	Antes	Mastectomia	HT
71	71	14	Invasivo	Ductal	3	T2N1M0	ER 30%, PR-, HER2	Sim	...	Pós	Conservadora	QT + RT + HT

Paciente	Idade	Seguimento (meses)	Histopatologia	Tipo histológico	Grau	TNM	Expressão dos receptores	Invasão vascular	Invasão perineural	Coleta	Cirurgia	Terapia
							3+, Ki67 70%					
72	60	14	Invasivo	Ductal e lobular	2	T2N0M0	ER 40%, PR-, HER2-, Ki67 50%	Sim	Não	Pós	Mastectomia	QT + RT + HT
73	51	14	Invasivo	Ductal e lobular	2	T2N0MX	ER 80%, PR 100%, HER2 3+, Ki67 50%	Pós	Ambas	QT + RT + HT
74	51	12	Invasivo	Ductal	2	T1N0M0	ER 90%, PR 40%, HER2 1+, Ki67 15%	Antes	Conservadora	QT + RT + HT
75	43	12	Invasivo	Ductal	2	T4N0M0	ER 90%, PR 90%, HER2-, Ki67 2%	Não	...	Pós	Mastectomia	HT
76	32	13	Invasivo	Ductal	3	T3N1M0	ER-, PR-, HER2-, Ki67 98%	Não	Não	Pós	Ambas	QT + RT

ANEXOS

ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO TNM NO CÂNCER DE MAMA

Tamanho do tumor (T)	
Tx	Tumor não pode ser avaliado
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com até 2 cm em sua maior dimensão
T1 mic	Carcinoma microinvasor (até 1 mm)
T1a	Tumor com até 0,5 cm em sua maior dimensão
T1b	Tumor com mais de 0,5 e até 1 cm em sua maior dimensão
T1c	Tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 e até 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4	Qualquer T com extensão para pele ou parede torácica
T4a	extensão para a parede torácica
T4b	Edema (incluindo peau d'orange), ulceração da pele da mama, nódulos cutâneos satélites na mesma mama
T4c	Associação do T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório
Linfonodos regionais (N)	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase
N1	Linfonodo(s) homolateral(is) móvel(is) comprometido(s)
N2	Metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), fixos uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas ou metástase clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral
N2a	Metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas
N2b	Metástase clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral, sem evidência clínica de metástase axilar
N3	Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es), ou para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral clinicamente aparente na presença de evidência clínica de metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), ou metástase para linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es) ou da cadeia mamária interna
N3a	Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is)
N3b	Metástase para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral e para linfonodo(s) axilar(es)
N3c	Metástase para linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is)
Metástase (M)	
Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância (incluindo LFN supraclaviculares)

ANEXO B – ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA POR AGRUPAMENTO

Estágio 0	Tis N0 M0
Estágio I	T1 N0 M0
Estágio II A	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0
Estágio II B	T2 N1 M0 T3 N0 M0
Estágio III A	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
Estágio III B	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
Estágio III C	Tqq N3 M0
Estágio IV	Tqq Nqq M1

ANEXO C -AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Saúde

 Informe o E-mail

 Informe a Senha

LOGIN

[Esqueceu a senha?](#)

[Cadastre-se](#)



Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:

34710214.9.0000.5558

Número do Parecer:

[Pesquisar](#)

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:

genética para descoberta de biomarcadores

Número do CAAE:

34710214.9.0000.5558

Número do Parecer:

2406278

Quem Assinou o Parecer:

Antônio Carlos Rodrigues da Cunha

Pesquisador Responsável:

Andréa Barretto Motoyama

Data Início do Cronograma:

01/09/2014

Data Fim do Cronograma:

01/04/2016

Contato Público:

Andréa Barretto Motoyama

[Voltar](#)

Este sistema foi desenvolvido para os navegadores Internet Explorer (versão 7 ou superior),
ou Mozilla Firefox (versão 9 ou superior).

ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTE

Projeto de Pesquisa: Células Tumorais Circulantes (CTCs): valor prognóstico em câncer metastático e análise genética para descoberta de biomarcadores”,

Coordenação: Professora Dra. Andréa Barretto Motoyama da Universidade de Brasília (UnB).

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo como parte de um projeto de pesquisa que integra médicos do HUB e pesquisadores da Universidade de Brasília. Abaixo, há informações que descrevem o estudo, intitulado: “Células Tumorais Circulantes (CTCs): valor prognóstico em câncer metastático e análise genética para descoberta de biomarcadores”, coordenado pela professora Dra. Andréa Barretto Motoyama da Universidade de Brasília (UnB).

Além das informações contidas neste documento, os médicos e a coordenadora da pesquisa estão e estarão sempre disponíveis para esclarecer quaisquer outras dúvidas que o(a) senhor(a) ainda tiver a respeito do estudo e deste termo de consentimento.

O(A) senhor(a) está ciente de que há uma suspeita de acometimento com uma doença grave chamada câncer, o que requer tratamento e acompanhamento médico. Para se ter certeza da presença da doença, bem como o estágio na qual se encontra, será necessária a realização de exames que lhes foram indicados pelo(s) médico(s), tais como biópsia, exame de sangue, exame de ressonância magnética e ecografia, entre outros. Em estágios iniciais, a doença pode ser mais facilmente tratada, enquanto que em estágios avançados, o câncer pode se espalhar pelo corpo, afetando outros órgãos diferentes do originalmente afetado e podendo comprometer seriamente a sua saúde.

Se a(o) senhor(a) concordar, no caso em que, através dos exames acima mencionados, haja diagnóstico de câncer de pulmão, ou de mama, ou no caso em que se encontre um tumor benigno, o(a) senhor(a) poderá participar desta pesquisa. Esta pesquisa irá ajudar os médicos a escolher o melhor tratamento para os pacientes.

Se os resultados dos seus exames clínicos forem negativos ou indicarem a presença de tumor benigno, a sua participação será no grupo “controle”, ou seja, pacientes que não tem a doença. Caso os resultados apontem para a presença de tumor maligno, de estágio avançado, o(a) senhor(a) será convidado(a) a participar como paciente do estudo.

Em ambos os casos, será solicitado que o(a) senhor(a) nos forneça três amostras de 3 mL cada, de sangue do seu braço. O(A) sr(a) terá apenas o desconforto da coleta de sangue. Seu sangue será estudado para entender sua doença. Será estudado se ocorreu alguma mudança no tumor que possa ajudar a esclarecer o diagnóstico e prognóstico da sua doença.

Os resultados obtidos durante a pesquisa poderão ser publicados em revistas médicas e/ou científicas, sempre mantendo o seu anonimato e dos demais pacientes doadores.

A participação neste projeto de pesquisa é voluntária, portanto, o(a) senhor(a) poderá se recusar a participar ou descontinuar a sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios a que tenha direito. Como não são previstos procedimentos experimentais ou não padronizados na prática clínica, o(a) senhor(a) não estará se submetendo a riscos adicionais, caso decida participar. Dependendo dos resultados obtidos, pode ser recomendado um acompanhamento mais detalhado do seu tratamento, que poderá vir a contribuir para a sua saúde. Além disso, dependendo dos resultados aqui obtidos, os pesquisadores poderão recomendar o desenvolvimento de novos medicamentos, o que pode ser benéfico ao(a) senhor(a) no futuro, ou a outros pacientes. De todas as formas, no final do estudo, o(a) senhor(a) será informado(a) sobre a conclusão aqui obtida.

Caso surjam dúvidas, os pesquisadores poderão ser contactados via telefone. Professora Dra. Andréa Motoyama: 3107-1937 ou -1998 ou 9948-7346. O Comitê de Ética em Pesquisa pode ser contactado no telefone: 3107-1947.

Declaro que li e entendi este TERMO que é fornecido em duas vias, sendo que uma ficará em meu poder e outra irá para a pesquisadora, e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Brasília, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do paciente

Assinatura do(a) pesquisador

Responsável: Dra Andréa Barretto Motoyama